

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. แผนงานวิจัย** : แผนบูรณาการการพัฒนากระบวนการผลิตพืชสู่เกษตรกรที่เป็นมิตรกับสภาพภูมิอากาศ
- 2. โครงการวิจัย** : ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย
กิจกรรม : การศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
- 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาศักยภาพของแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Potential of actinomycetes isolated from areas affected by climate change in Pai river basin
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอมรรัตน์ ใจยะเสน
สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวจิตรา เกาะแก้ว
2. นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์
สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- 5. บทคัดย่อ**

การศึกษาศักยภาพของแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากดินพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน ซึ่งมีอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่างฤดูร้อนและฤดูหนาว 4 แห่ง คือ 1) พื้นที่ป่าปลายน้ำ 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ 3) พื้นที่ป่าต้นน้ำ และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ ใน 3 ฤดู คือ ฤดูหนาว (เดือนธันวาคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) โดยการทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การทดสอบการสร้าง siderophore การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการทดสอบการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (IAA) พบว่า *Streptomyces* sp. WF 4-1 มีความสามารถในการสร้าง siderophore สูงที่สุด *Streptomyces* sp. WF 10-1 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงที่สุด ส่วนแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากดิน

ในฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝนที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซีติกมีจำนวนทั้งหมด 42 32 และ 29 ไอโซเลทตามลำดับ ทำการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 10 ไอโซเลทเพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช พบว่า *Streptomyces* sp. WF 4-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุดในส่วน *Streptomyces* sp. WA 20-3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. campestris* pv. *campestris* ได้ดีที่สุดในด้านการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia* sp. และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า *Streptomyces* sp. RF 23-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทดสอบได้ทุกชนิด การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีสมบัติไม่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ (non-antagonistic) ต่อไรโซเบียม พบว่า *Streptomyces* sp. WF 3-1, WF 4-1, WF 10-1, RF 12-4 และ RF 23-1 ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อไรโซเบียมทั้ง 3 ชนิด คือ *Bradyrhizobium japonicum* DASA 02006, *B. liaoningense* DASA 03018 และ *B. daqingense* DASA 03084 ดังนั้นจึงสามารถใช้แอกติโนมัยซีทไอโซเลทดังกล่าวร่วมกับการใช้ไรโซเบียมทั้ง 3 ชนิดได้ จากการทดลองในระดับโรงเรือนพบว่า ต้นกล้าถั่วเขียวมีอาการเน่าตายเมื่อได้รับการปลูกเชื้อราก่อโรคพืช *S. rolfsii* แม้จะปลูกเชื้อแอกติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. WF 4-1 ร่วมด้วย ส่วนต้นกล้าที่มีการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. RF 12-4 มีการเกิดโรคปานกลางในระดับ 2 ส่วนการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *E. carotovora* pv. *carotovora* ทำให้ต้นกล้าถั่วเขียวเกิดโรคเล็กน้อยในระดับ 1 โดยความสูงของต้น น้ำหนักสด ความยาวรากและจำนวนปมรากของแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Abstract: The potential of actinomycetes isolated from Pai river basin, Mae Hong Son Province that affected by different temperatures between summer and winter, was studied in 4 areas: 1) downstream forest 2) downstream agricultural area 3) upstream forest and 4) upstream agricultural area in three seasons: winter (December), summer (April) and rainy (July). Plant growth promoting properties including siderophore production, phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) production were tested. The results showed that *Streptomyces* sp. WF 4-1 has the highest siderophore production, while *Streptomyces* sp. WF 10-1 has the highest phosphate solubility. Actinomycetes isolated from soil in winter, summer and rainy season with the production of indole acetic acid were 42, 32 and 29 isolates, respectively. Ten actinomycete isolates with highest plant growth promoting activity were selected to test against plant pathogens. It was found that *Streptomyces* sp. WF 4-1 was highest effective in inhibiting bacterial plant pathogens including *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum*,

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. *Streptomyces* sp. WA 20-3 was the most effective isolate for inhibiting *X. campestris* pv. *campestris*. In vitro growth inhibition of fungal plant pathogens including *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia* sp. and *Sclerotium rolfsii* showed that *Streptomyces* sp. RF 23-1 was effective in fungal growth inhibition of all tested fungal plant pathogens. The result of non-antagonistic with rhizobium showed that *Streptomyces* sp. WF 3-1, WF 4-1, WF 10-1, RF 12-4 and RF 23-1 were non-antagonistic to three rhizobium species: *Bradyrhizobium japonicum* DASA 02006, *B. liaoningense* DASA 03018 and *B. daqingense* DASA 03084. Therefore, these actinomycetes can be used with the use of those three rhizobium species. In greenhouse experiment, mungbean seedlings were found to be rotten when planted with plant pathogenic fungi: *Sclerotium rolfsii*, even with *Streptomyces* sp. WF 4-1. In addition, *Streptomyces* sp. RF 12-4 was showed moderate disease occurrence at level 2. *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* caused mungbean seedlings to the mild disease at level 1 but plant height, fresh weight, root length and root number among all treatments was no statistical difference.

6. คำนำ :

จุลินทรีย์ดินเป็นแหล่งของสารประกอบธรรมชาติที่น่าสนใจสำหรับเภสัชภัณฑ์ เกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอื่น ๆ จุลินทรีย์ดินที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่ง คือ แอคติโนมัยสีทซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แพร่กระจายอย่างกว้างขวางในธรรมชาติและสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการใช้แอคติโนมัยสีทเป็นสารควบคุมทางชีวภาพในการทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006; Law et al., 2017) เนื่องจากแอคติโนมัยสีท สร้างสารควบคุมทางชีวภาพที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชและไม่มีผลต่อสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายอื่น ๆ การศึกษาเกี่ยวกับแอคติโนมัยสีทในทางการเกษตรได้รับความสนใจอย่างมากเมื่อมีความเป็นไปได้ว่า สามารถป้องกันรากจากการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคพืช โดยการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรีย หรือการผลิตสารต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น IAA ช่วยในการเจริญเติบโตของราก การผลิต siderophores เพื่อเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชของแอคติโนมัยสีทที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาพพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันของสภาพภูมิอากาศระหว่างกลางวัน (เฉลี่ยย้อนหลัง 10 ปี

ตั้งแต่ 2548 ถึงปัจจุบัน เท่ากับ 38.4 องศาเซลเซียส) และกลางคืน (เฉลี่ยย้อนหลัง 10 ปี ตั้งแต่ 2548 ถึงปัจจุบัน เท่ากับ 9.8 องศาเซลเซียส) ในปัจจุบันมีการบุกรุกพื้นที่ป่าบริเวณลุ่มน้ำปายที่เคยเป็นป่าอุดมสมบูรณ์มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ดินที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเศษซากอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ให้เป็นดินที่อุดมสมบูรณ์ โดยการบุกรุกเข้าทำลายพื้นที่ป่าเพื่อทำการเกษตร และสร้างเป็นที่อยู่อาศัย รวมทั้งการพัฒนาเป็นพื้นที่ท่องเที่ยวเพื่อรองรับนักท่องเที่ยวจำนวนมาก โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพของแอคติโนมัยสีทระหว่างพื้นที่ป่ากับพื้นที่ที่ถูกรบกวนจากการเกษตรกรรม ในแต่ละฤดูในรอบ 1 ปี รวมถึงแนวทางการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพื้นที่ทำการศึกษ ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่ผ่านการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เพื่อนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จำนวน 641 ไอโซเลท

7.1.2 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่

2.1 *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

2.2 *Ralstonia solanacearum*

2.3 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

2.4 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

2.5 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

7.1.3 ตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 6 ชนิด ได้แก่

3.1 *Collectotrichum* sp.

3.2 *Fusarium* sp.

3.3 *Phytophthora palmivora*

3.4 *Rhizoctonia solani*

3.5 *Rhizoctonia* sp.

3.6 *Sclerotium rolfsii*

7.1.4 ตัวอย่างเชื้อไรโซเบียม จำนวน 3 ชนิด ได้แก่

4.1 *Bradyrhizobium japonicum* DASA 02006

4.2 *B. liaoningense* DASA 03018

4.3 *B. daqingense* DASA 03084

7.1.5 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง Salkowski reagent L-tryptophane อาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome azurol S-modified Gaus No.1 agar, Yeast malt agar เป็นต้น

7.2 วิธีการ

7.2.1 การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

การเก็บตัวอย่างดินในฤดูหนาว (ช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม) ฤดูร้อน (ช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน) และฤดูฝน (ช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ โดยขุดดินลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร ขุดอย่างน้อย 5 หลุม ในพื้นที่ 25 ตารางเมตร ตักดินมาหลุมละ 1 กิโลกรัม นำดินที่ได้มาผสมให้เข้ากัน ตักใส่ถุงพลาสติกประมาณ 2 กิโลกรัม ปิดปากถุงให้แน่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บดและร่อนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-3} ถึง 10^{-6} ดูดสารแขวนลอยดินในแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารคัดเลือก Starch Casein Agar (SCA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อโคโลนีของแอสคิโนมัยสีทนำมา ทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร Glucose Yeast Extract Agar (GYE) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

7.2.2 การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

7.2.2.1 ทดสอบการสร้าง siderophore โดยเลี้ยงแอสคิโนมัยสีทที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปายในช่วงฤดูหนาว ฤดูร้อนและฤดูฝนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt agar (YM) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแอสคิโนมัยสีทและนำไปวางบนอาหาร Chrome azurol S-modified Gaus No.1 (CAS-MGs-1) agar (You *et al.*, 2004) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีส้มที่เชื้อสร้างขึ้นรอบโคโลนี ซึ่งแสดงว่าเชื้อแอสคิโนมัยสีทมีการสร้าง siderophore (Milagres *et al.*, 1999)

7.2.2.2 ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยเลี้ยงแอสคิโนมัยสีทที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปายในช่วงฤดูหนาว ฤดูร้อนและฤดูฝนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt agar (YM) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแอสคิโนมัยสีทและนำไปวางบนอาหาร Pikovskaya เป็นเวลา 10 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสบริเวณรอบโคโลนี (Rao Subba, 1993)

7.2.2.3 ทดสอบการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (IAA) โดยเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยสีทที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปายในช่วงฤดูหนาว ฤดูร้อนและฤดูฝนบนอาหาร tryptone yeast extract agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร tryptone yeast extract broth ที่เติม L-tryptophane 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายแขวนลอยเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง เติม Salkowski reagent 4 มิลลิลิตร การทดสอบเชื้อแต่ละไอโซเลททำจำนวน 3 ซ้ำ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย หากสารละลายเกิดสีชมพูแสดงว่ามีการสร้าง กรดอินโดลอะซีติก (Bric *et al.*, 1991) นำผลที่ได้จากการทดสอบไปประเมินร่วมกับไอโซเลทแอสคิโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติในการสร้าง siderophore และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต

7.2.3 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช

7.2.3.1 การคัดเลือกแอสคิโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสำหรับทดสอบโดยเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.25 ทดสอบความสามารถของแอสคิโนมัยสีทในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้วิธีเททับ (agar overlay) ซึ่งเป็นวิธีดัดแปลงของ Anand *et al.* (2006) จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยของแอสคิโนมัยสีท โดยเลี้ยงแอสคิโนมัยสีทให้เจริญบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) medium 3 จากนั้นขูดสปอร์และเซลล์ผสมลงในสารละลาย ¼ Ringer's solution ให้เข้ากัน หยดสปอร์แขวนลอย 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ISP medium 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดสารแขวนลอย

ของแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปเทราดทับโคโลนีของแอกติโนมัยสีท ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยดูจากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่อยู่รอบโคโลนีของแอกติโนมัยสีท นำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแอกติโนมัยสีท และคำนวณหาค่าการยับยั้ง ตามสูตรดังนี้

$$\text{ค่าการยับยั้ง} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแอกติโนมัยสีท}}$$

7.2.3.2 การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ใช้วิธีทดสอบของ Yuan and Crawford (1995) โดยเตรียมสปอร์แขวนลอยของแอคติโนมัยสีท ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น หยดสปอร์แขวนลอยให้ห่างจากขอบจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนจานอาหารแข็ง PDA จนเจริญดี จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 2 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) เจาะบริเวณปลายเส้นใยรา นำมาวางบริเวณกลางจานอาหารและห่างจากโคโลนีแอคติโนมัยสีทอายุ 7 วัน เป็นระยะ 3 เซนติเมตร ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ส่วนจานอาหารควบคุมให้วางเส้นใยราที่เจาะด้วย cork borer เบอร์เดียวกัน บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ขึ้นอยู่กับการเจริญของเส้นใยเชื้อราทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ จำนวนการทดลองยับยั้งการเจริญของเส้นใยราเมื่อรัศมีการเจริญของเส้นใยราในจานอาหารควบคุมมีขนาด 3 เซนติเมตร และคำนวณหาค่าการยับยั้ง ตามสูตรดังนี้

$$\text{ค่าการยับยั้ง} = 1 - \frac{\text{รัศมีการเจริญของราในจานอาหารควบคุม}}{\text{รัศมีการเจริญของราในจานอาหารควบคุม}}$$

7.2.4 การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีสมบัติไม่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อไรโซเปียม

เตรียมเชื้อไรโซเปียมสำหรับทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Yeast Extract Mannitol (YEM) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.2 วิธีการทดสอบทำได้โดยหยดสปอร์แขวนลอยของแอคติโนมัยสีท 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ISP medium 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูเชื้อไรโซเปียมที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร YEM ที่มีผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน นำมาเทราดทับโคโลนีแอคติโนมัยสีท ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแอคติโนมัยสีท และคำนวณหาค่าการยับยั้ง ตามสูตรดังนี้

$$\text{ค่าการยับยั้ง} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแอคติโนมัยสีท}}$$

7.2.5 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชในระดับโรงเรือน

7.2.5.1 คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้มากที่สุดในจานอาหารทดลอง คือ *Streptomyces* sp. WF 4-1 และ *Streptomyces* sp. RF 12-4 โดยใช้ถั่วเขียวพันธุ์ชยันนาท 84-1 เป็นพืชทดสอบร่วมกับการปลูกเชื้อไรโซเปียมในทุกกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Rhizobium

กรรมวิธีที่ 2 Rhizobium + WF 4-1

กรรมวิธีที่ 3 Rhizobium + RF 12-4

กรรมวิธีที่ 4 Rhizobium + *Sclerotium rolfsii*

กรรมวิธีที่ 5 Rhizobium + *S. rolfsii* + WF 4-1

กรรมวิธีที่ 6 Rhizobium + *S. rolfsii* + RF 12-4

กรรมวิธีที่ 7 Rhizobium + *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

กรรมวิธีที่ 8 Rhizobium + *E. carotovora* pv. *carotovora* + WF 4-1

กรรมวิธีที่ 9 Rhizobium + *E. carotovora* pv. *carotovora* + RF 12-4

7.2.5.2 เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลทในอาหารเหลวของ ISP medium 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-12 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แยกน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทออกจากชีวมวลของเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรอง Millipore (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมครอน)

7.2.5.3 ผสมดินปลูกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 12 ลิตร กับชีวมวลเชื้อราสาเหตุโรคพืชปริมาณ 200 กรัม คลุกให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งดินใส่ถุงปลูกละ 1 ลิตร

7.2.5.4 นำชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้มาผสมกับน้ำเกลือ (น้ำกลั่นที่เติม NaCl 9 กรัมต่อลิตร) เพื่อทำเป็นหัวเชื้อ โดยให้มีปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีท 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร นำรากต้นกล้าแช่ใน 10 มิลลิลิตรของหัวเชื้อแอคติโนมัยสีท เป็นเวลา 30 นาที ชุดควบคุมชนิดบวก (positive control) ให้แช่รากด้วยน้ำกลั่นหลังจากนั้นย้ายต้นกล้ามาปลูกในถุงปลูกที่มีดินติดเชื้อราสาเหตุโรคอยู่

7.2.5.5 วางกระถางไว้ในโรงเรือน รดน้ำทุกวันเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 18 วัน เก็บเกี่ยวต้นโดยบันทึกน้ำหนักสดต้นกล้า ความสูงของต้น และความยาวราก บันทึกอัตราการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี โดยใช้ดัชนีความรุนแรงของโรค ดังนี้ 0 = 2% (ต้นกล้าที่แข็งแรง) 1 = 3 - 30% (โรคเล็กน้อย) 2 = 31 - 60% (โรคปานกลาง) 3 = 61 - 90% (โรคร้ายแรง) และ 4 = มากกว่า 91% (พืชตาย) (Errakhi *et al.*, 2007)

7.2.5.6 บันทึกน้ำหนักสดต้นกล้า ความสูงของต้น และความยาวรากอัตราการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี โดยใช้ดัชนีความรุนแรงของโรค

เวลาและสถานที่: 1 ตุลาคม 2559 – 30 กันยายน 2562

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลสภาพแวดล้อมขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างดินในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) พบว่า เมื่อทำการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของดินและอากาศในขณะที่เก็บตัวอย่างดินในปี 2560 พื้นที่ป่าปลายน้ำและพื้นที่เกษตรปลายน้ำมีอุณหภูมิดินและอุณหภูมิอากาศต่ำกว่าพื้นที่ป่าต้น

น้ำและพื้นที่เกษตรต้นน้ำ (Table 1) เมื่อนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสืทและทำเชื้อให้บริสุทธิ์พบว่า แอกติโนมัยสืทที่แยกได้จากดินในปี 2560 ช่วงฤดูหนาวมีจำนวน 76 ไอโซเลท ช่วงฤดูร้อนมีจำนวน 127 ไอโซเลท และช่วงฤดูฝนมีจำนวน 92 ไอโซเลท ส่วนแอกติโนมัยสืทที่แยกได้จากดินในปี 2561 ช่วงฤดูหนาวมีจำนวน 123 ไอโซเลท ช่วงฤดูร้อนมีจำนวน 93 ไอโซเลท และช่วงฤดูฝนมีจำนวน 130 ไอโซเลท และได้้นำไอโซเลททั้งหมดไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอกติโนมัยสืทต่อไป

Table 1 Weather data of soils collected from Pai river basin in various seasons in 2017

Source	Winter		Summer		Rainy	
	Soil	Air	Soil	Air	Soil	Air
	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Temp. (°C)
1. Upstream forest	22	27	25	31	27	32
2. Upstream agricultural area	22	29	27	33	28	34
3. Downstream forest	19	24	23	29	26	31
4. Downstream agricultural area	19	24	26	31	26	33

Note: Soil temperature at 0-15 centimeter depth and air temperature at sampling date

8.1 การทดสอบคุณสมบัติของแอกติโนมัยสีท

8.1.1 ทดสอบการสร้าง siderophore

เชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บในปี 2559/2560 ในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม 2559) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน 2560) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม 2560) ที่มีความสามารถในการสร้าง siderophore มีจำนวนทั้งหมด 54 59 และ 63 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บในปี 2560/2561 ช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม 2560) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน 2561) และฤดูฝน (เดือนสิงหาคม 2561) ที่มีความสามารถในการสร้าง siderophore มีจำนวนทั้งหมด 85 60 และ 84 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยพบว่าแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งจัดเป็นสมาชิกจิ้นสำคัญที่มีมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยสีททั้งหมด *Streptomyces* sp. WF 4-1 มีการสร้าง siderophore ได้สูงที่สุด โดยมีค่าการสร้างวงสีส้มรอบโคโลนี เท่ากับ 5.63 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินที่เก็บในฤดูร้อน พบว่า *Streptomyces* sp. HF 37-1 มีการสร้าง siderophore ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces* sp. HF 36-1, HF 35-1 และ HF 33-1 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าการสร้างวงสีส้มรอบโคโลนี เท่ากับ 3.10 2.97 2.47 และ 2.37 เซนติเมตร ตามลำดับ (Figure 1) ด้านแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินที่เก็บในฤดูฝน พบว่า *Streptomyces* sp. RF 10-1 สร้าง siderophore ได้สูงที่สุด โดยมีค่าการสร้างวงสีส้มรอบโคโลนี เท่ากับ 3.07 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างจาก *Streptomyces* sp. RF 23-1, RF 22-1 และ RF 12-4 ซึ่งมีค่าการสร้างวงสีส้มรอบโคโลนี เท่ากับ 2.50 2.43 และ 2.33 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Formation of orange zone from siderophore production of *Streptomyces* spp. isolated from Pai river basin soils in winter, summer and rainy seasons

Isolates from winter	Diameter of orange zone* (cm)	Isolates from summer	Diameter of orange zone* (cm)	Isolates from rainy	Diameter of orange zone* (cm)
WF 4-1	5.63 a	HF 37-1	3.10 a	RF 10-1	3.07 a
WF 3-1	3.73 b	HF 36-1	2.97 a	RF 23-1	2.50 ab
WA 20-3	3.20 b	HF 35-1	2.47 ab	RF 22-1	2.43 ab
WA 22-3	3.13 b	HF 33-1	2.37 abc	RF 12-4	2.33 ab
WA 21-3	3.00 b	HF 10-1	2.10 bc	RA 1-3	1.70 b
WF 6-1	1.08 c	HF 26-1	2.00 bc	RF 10-4	1.67 b
WA 22-2	1.02 c	HA 24-3	1.90 bc	RF 19-1	1.63 b
WF 7-1	0.72 c	HF 21-1	1.73 bc	RA 2-2	1.60 b
WF 7-4	0.67 c	HF 9-1	1.67 bc	RA 7-3	1.53 b
WF 1-4	0.63 c	HF 29-4	1.57 c	RF 25-1	1.50 b
CV. (%)	12.93	CV. (%)	12.77	CV. (%)	22.56

* Diameter of orange zone within the same season, means in a column followed by the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison test.

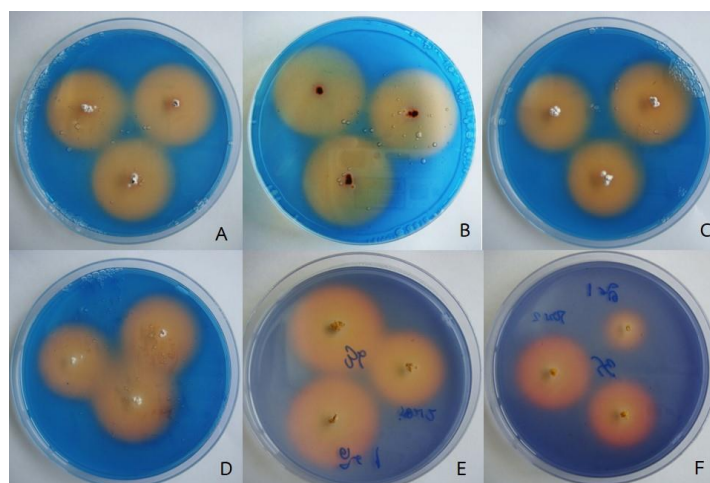


Figure 1 Characteristics of actinomycetes that produce siderophore by creating orange rings around the colonies: A)-B) front and back of petri dishes of *Streptomyces* sp. WA 20-3, C) WA 21-3, D) WA 22-3, E) HF 36-1, and F) HF 35-1

8.1.2 ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

เชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บในฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝน ทั้งในปี 2560 และ 2561 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอยู่ในระดับ 1-3 (ระดับกิจกรรมการละลายตะกอน CaHPO_4 ของเชื้อแอกติโนมัยสีทตามความกว้างของวงใส) โดยมีค่าน้อยกว่า 6 มิลลิเมตร โดยการประเมินระดับกิจกรรมการละลายตะกอน CaHPO_4 ของจุลินทรีย์ตามความกว้างของวงใส (กรมวิชาการเกษตร, 2551) ประเมินได้ ดังนี้

ระดับ 1	0	มิลลิเมตร
ระดับ 2	0-3	มิลลิเมตร
ระดับ 3	3-6	มิลลิเมตร
ระดับ 4	6-9	มิลลิเมตร
ระดับ 5	มากกว่า 9	มิลลิเมตร

เมื่อเปรียบเทียบไอโซเลทแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินที่เก็บในฤดูหนาวต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต พบว่า ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีช่วงการสร้างความกว้างของวงใสตั้งแต่ 1.8-4.0 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม พบว่า *Streptomyces* sp. WF 10-1 สามารถสร้างความกว้างของวงใสได้มากที่สุดเท่ากับ 4.0 มิลลิเมตร ส่วนแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินที่เก็บในฤดูร้อน พบว่า ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ไม่แตกต่างกัน โดยมีช่วงการสร้างความกว้างของวงใสตั้งแต่ 2.7-3.3 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม พบว่า *Streptomyces* sp. HF 23-1 สามารถสร้างความกว้างของวงใสได้มากที่สุดเท่ากับ 3.3 มิลลิเมตร และเมื่อพิจารณาแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินที่เก็บในฤดูฝน พบว่า มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน โดย *Streptomyces* sp. RA 15-3 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุด โดยมีค่าการสร้างความกว้างของวงใสสูงสุด เท่ากับ 3.3 มิลลิเมตร แตกต่างจาก *Streptomyces* sp. RA 5-2 ซึ่งมีค่าการสร้างความกว้างของวงใสที่น้อยที่สุด เท่ากับ 1.0 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับไอโซเลทอื่น ๆ (Table 3) ผลการทดลองทั้งหมดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sahu *et al.* (2007) ที่พบว่า แอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดินน้ำเค็มมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเช่นกัน และพบว่ากิจกรรมการละลายฟอสเฟตมีค่าสูงสุดที่ pH 7 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารทดสอบ Pikovskaya (PVK) ที่ใช้ในการทดลองนี้อยู่ในช่วง 7.2 ± 0.2 เช่นกัน

Table 3 Production of clear zone from phosphate solubilization activity of *Streptomyces* spp. isolated from Pai river basin soils in winter, summer and rainy seasons

Isolates from winter	Diameter of clear zone* (mm)	Isolates from summer	Diameter of clear zone* (mm)	Isolates from rainy	Diameter of clear zone* (mm)
WF 10-1	4.0 a	HF 23-1	3.3 a	RA 15-3	3.3 a
WF 6-4	3.0 a	HF 35-1	3.2 a	RF 12-4	2.7 ab
WA 23-3	3.0 a	HF 37-1	3.0 a	RF 7-1	2.3 ab
WA 2-2	3.0 a	HF 26-4	3.0 a	RF 18-4	2.3 ab

WA 21-3	2.7 a	HF 24-1	3.0 a	RF 1-1	2.0 ab
WA 22-2	2.3 a	HA 23-2	3.0 a	RF 22-1	1.7 ab
WF 5-4	2.3 a	HF 8-1	2.8 a	RA 1-2	1.7 ab
WA 17-3	2.3 a	HF 19-1	2.7 a	RF 23-1	1.3 ab
WF 1-4	2.3 a	HA 7-3	2.7 a	RA 16-3	1.3 ab
WA 18-2	1.8 a	HF 5-4	2.7 a	RA 5-2	1.0 b
CV. (%)	52.0	CV. (%)	15.40	CV. (%)	39.38

* Diameter of clear zone within the same season, means in a column followed by the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison tests.

8.1.3 ทดสอบการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (IAA)

เมื่อนำสารละลายส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลทที่แยกได้มาทำปฏิกิริยากับ Salkowski reagent พบว่า เชื้อแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีการสร้าง IAA และเมื่อนำผลการทดสอบการสร้าง IAA ของเชื้อแอกติโนมัยสีทไปพิจารณาพร้อมกับคุณสมบัติในการสร้าง siderophore และการละลายฟอสเฟต พบว่า เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่มีการสร้าง siderophore ได้ดี ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการสร้าง IAA ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการสร้าง IAA ได้ด้วย เช่นกัน (Table 4) ดังนั้นผลการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นจึงสามารถเป็นข้อมูลในการคัดเลือกไอโซเลทเพื่อนำไปศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชและเชื้อไรโซเบียมต่อไป เนื่องจากมีข้อมูลของ Sreevidya *et al.* (2016) ที่พบว่า แอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักเศษซากพืชและดินรอบรากถั่วลูกไก่ สามารถสร้าง siderophore, indole acetic acid, cellulase, lipase, protease, chitinase, hydrocyanic acid และ β -1,3-glucanase และยังช่วยเพิ่มจำนวนปมราก น้ำหนักลำต้น และผลผลิตถั่วด้วย

Table 4 Indole acetic acid (IAA) production of *Streptomyces* spp. isolate that have the ability to produce siderophore and phosphate solubility

Isolates	Diameter of siderophore production (cm)	IAA production*	Isolates	Diameter of phosphate solubility (mm)	IAA production*
WF 4-1	5.63	-	WF 10-1	4.0	+
WF 3-1	3.73	+	HF 23-1	3.3	-
WA 20-3	3.20	+	RA 15-3	3.3	-
WA 22-3	3.13	+	HF 35-1	3.2	+
HF 37-1	3.10	+	HF 37-1	3.0	+

RF 10-1	3.07	+	HF 26-4	3.0	+
WA 21-3	3.00	+	HF 24-1	3.0	+
HF 36-1	2.97	+	HA 23-2	3.0	+
RF 23-1	2.50	-	WF 6-4	3.0	+
HF 35-1	2.47	+	WA 23-3	3.0	+

* + = appearance of pink color indicated IAA production, - = pink color not appear indicated no IAA production

8.2 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช

8.2.1 การคัดเลือกแอสติโนมัยสีที่สามารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

การคัดเลือกแอสติโนมัยสีที่สามารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Streptomyces* sp. WF 4-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุดเกือบทุกชนิด ส่วน *Streptomyces* sp. WA 20-3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. campestris* pv. *campestris* ได้ดีที่สุดใน แต่ไม่แตกต่างจาก *Streptomyces* sp. WF 4-1, WA 21-3 และ WA 22-3 (Table 5, Figure 2) เนื่องจากแอสติโนมัยสีแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะจำพวก gentamycin streptomycin หรือ nocardicin ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียในระดับที่แตกต่างกัน

Table 5 Average plant pathogenic bacterial growth inhibition of selected *Streptomyces* spp.*

Isolates	Erw	Ral	Xag	Xcc	Xoo
WF 3-1	0.00 c	0.00 c	1.08 d	1.32 b	0.00 b
WF 4-1	3.93 a	3.99 a	2.22 a	2.22 a	2.83 a
WF 10-1	0.00 c	0.00 c	0.00 e	0.00 c	0.00 b
WA 20-3	1.09 b	1.66 b	1.65 b	2.44 a	0.00 b
WA 21-3	1.08 b	0.00 c	1.08 d	2.22 a	0.00 b
WA 22-3	0.00 c	0.00 c	1.35 c	2.35 a	0.00 b
RF 10-1	0.00 c	0.00 c	1.09 d	1.31 b	0.00 b
RF 12-4	0.00 c	0.00 c	1.11 d	1.08 b	0.00 b
RF 22-1	0.00 c	0.00 c	1.05 d	2.01 a	0.00 b
RF 23-1	0.00 c	0.00 c	0.00 e	0.00 c	0.00 b
CV. (%)	8.98	23.72	6.65	14.66	25.00

Note: Erw = *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, Ral = *Ralstonia solanacearum*, Xag = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, Xcc = *X. campestris* pv. *campestris*, Xoo = *X. oryzae* pv. *oryzae*

* Average plant pathogenic bacteria inhibition within the same plant pathogenic bacterial species, means followed by the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison tests.

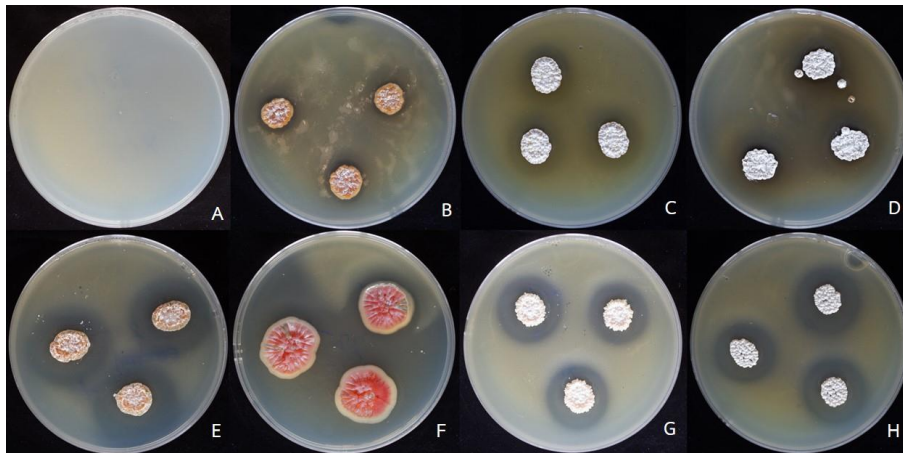


Figure 2 Antagonistic test of actinomycetes with plant pathogenic bacteria: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causes of black rot disease of cauliflower. A) control, *Streptomyces* sp. B) WF 3-1, C) RF 12-4, D) RF 10-1, E) WA 22-3, F) RF 22-1, G) WA 21-3, and H) WF 4-1

8.2.2 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

การคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มโรคพืชทั้ง 6 ชนิด พบว่า *Streptomyces* sp. RF 23-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มโรคพืชได้ทุกไอโซเลท รองลงมาคือ *Streptomyces* sp. WF 4-1 และ RF 12-4 (Table 6, Figure 3) เนื่องจากแอกติโนมัยสีทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (lytic enzymes) จำพวก α หรือ β -glucanases, proteases, peptidases, cellulases, chitinases และ lipases (El-Gammal *et al.*, 2014) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khamna *et al.* (2009) ซึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากรอบรากพืชสมุนไพร 16 ชนิดในพื้นที่จังหวัดลำพูน และพบว่า แอกติโนมัยสีทกลุ่ม *Streptomyces* สามารถต้านการเจริญของเชื้อรากลุ่มโรคพืชอย่างน้อย 1 ใน 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* และ *Sclerotium rolfsii* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Soltanzadeh *et al.* (2016) การใช้แอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินสามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของถั่วลูกไก่ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* f.sp. *pisi* ได้

Table 6 Average plant pathogenic fungal growth inhibition of selected *Streptomyces* spp. *

Isolates	Rhizoc	Rhizoc sol	Sclero	Collecto	Phytoph	Fusarium
WF 3-1	0.00 d	0.00 g	0.00 b	0.00 g	0.00 g	0.00 e

Isolates	Rhizoc	Rhizoc sol	Sclero	Collecto	Phytoph	Fusarium
WF 4-1	0.69 b	0.66 b	0.00 b	0.70 c	0.23 f	0.11 d
WF 10-1	0.00 d	0.00 g	0.00 b	0.00 g	0.00 g	0.00 e
WA 20-3	0.00 d	0.47 f	0.00 b	0.54 e	0.84 b	0.00 e
WA 21-3	0.00 d	0.00 g	0.00 b	0.53 e	0.76 c	0.00 e
WA 22-3	0.00 d	0.53 e	0.00 b	0.63 d	0.90 a	0.00 e
RF 10-1	0.00 d	0.53 e	0.00 b	0.56 e	0.52 e	0.28 b
RF 12-4	0.63 c	0.60 d	0.00 b	0.48 f	0.69 d	0.20 c
RF 22-1	0.71 b	0.65 c	0.00 b	0.76 b	0.54 e	0.00 e
RF 23-1	0.84 a	0.91 a	0.80 a	0.90 a	0.67 d	0.73 a
CV. (%)	2.91	0.73	9.68	2.89	3.69	2.38

Note: Rhizoc = *Rhizoctonia* sp., Rhizoc sol = *Rhizoctonia solani*, Sclero = *Sclerotium rolfsii*, Collecto = *Colletotrichum* sp., Phytoph = *Phytophthora palmivora*, Fusarium = *Fusarium* sp.

* Average plant pathogenic fungi inhibition within the same plant pathogenic fungal species, means followed by the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison tests.

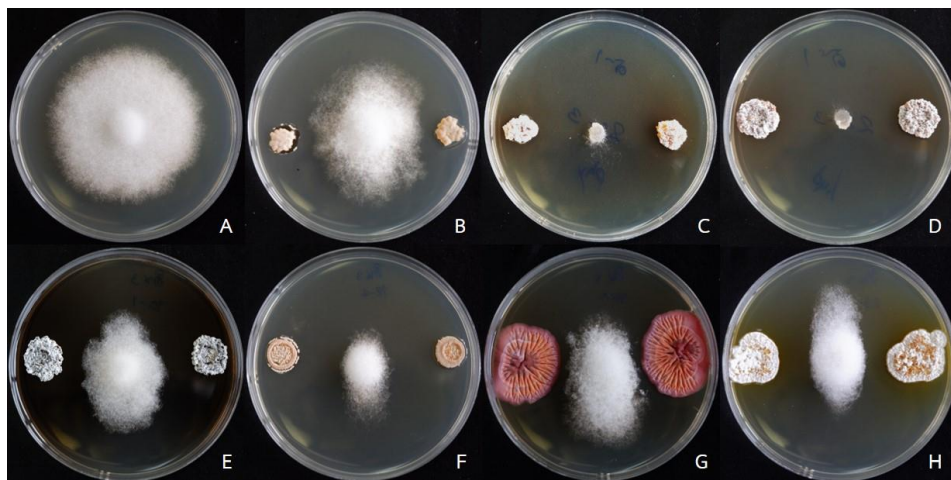


Figure 3 Antagonistic test of actinomycetes with plant pathogenic fungi: *Phytophthora palmivora*, causes of root and stem rot disease. A) control, *Streptomyces* sp. B) WF 4-1, C) WA 20-3, D) WA 22-3, E) RF 10-1, F) RF 12-4, G) RF 22-1, and H) RF 23-1

8.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีสมบัติไม่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ (non-antagonistic) ต่อไรโซเบียม

การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีสมบัติไม่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ (non-antagonistic) ต่อไรโซเบียม พบว่า *Streptomyces* sp. WF 3-1, WF 4-1, WF 10-1, RF 12-4 และ RF 23-1 ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อไรโซเบียมทั้ง 3

ชนิด คือ *Bradyrhizobium japonicum* DASA 02006, *B. liaoningense* DASA 03018 และ *B. daqingense* DASA 03084 (Table 7, Figure 4) ในขณะที่ *Streptomyces* sp. WA 21-3 ไม่เป็นปฏิปักษ์กับ *B. japonicum* DASA 02006 และ *B. daqingense* DASA 03084 ส่วน *Streptomyces* sp. RF 10-1 ไม่เป็นปฏิปักษ์กับ *B. liaoningense* DASA 03018 และ *B. daqingense* DASA 03084 ดังนั้นจึงสามารถใช้แอกติโนมัยสีทไอโซเลทดังกล่าวร่วมกับการปลูกเชื้อไรโซเบียมได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับการเพิ่มความถี่ของการเกิดปมรากจากเชื้อ *Rhizobium* sp. ในการปลูกเชื้อร่วมกับแอกติโนมัยสีท *Streptomyces lydicus* พบว่า *S. lydicus* เข้าสู่รากและสร้างสปอร์ภายในชั้นผิวของปมราก (Mukerji *et al.*, 2006) การเข้าสู่รากตัวของแอกติโนมัยสีทตามธรรมชาติ ทำให้ขนาดของปมรากโดยเฉลี่ยใหญ่ขึ้น และเพิ่มความแข็งแรงของแบคทีเรียในปมรากโดยการเสริมการดูดใช้ธาตุเหล็กและสารอาหารอื่น ๆ ในดิน (Tokala *et al.*, 2002)

Table 7 Average rhizobium growth inhibition of selected *Streptomyces* spp. *

Isolates	<i>B. japonicum</i>	<i>B. liaoningense</i>	<i>B. daqingense</i>
	DASA 02006	DASA 03018	DASA 03084
WF 3-1	0.00 a	0.00 a	0.00 a
WF 4-1	0.00 a	0.00 a	0.00 a
WF 10-1	0.00 a	0.00 a	0.00 a
WA 20-3	1.94 c	2.07 c	1.70 d
WA 21-3	0.00 a	1.27 b	0.00 a
WA 22-3	1.38 b	1.40 b	1.36 c
RF 10-1	1.34 b	0.00 a	0.00 a
RF 12-4	0.00 a	0.00 a	0.00 a
RF 22-1	1.22 b	1.91 c	1.17 b
RF 23-1	0.00 a	0.00 a	0.00 a
CV. (%)	15.17	19.05	12.94

* Average rhizobium inhibition within the same rhizobium species, means followed by the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison tests.

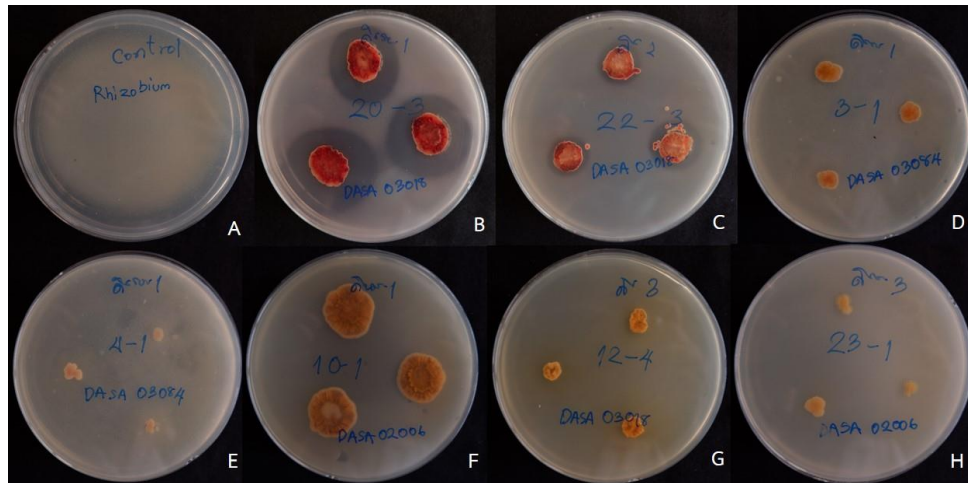


Figure 4 Antagonistic test of actinomycetes with rhizobium: A) control, rhizobium inhibition of *Streptomyces* sp. B) WA 20-3, C) WA 22-3, D) WF 3-1, E) WF 4-1, F) WF 10-1, G) RF 12-4, and H) RF 23-1

8.4 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชและเชื้อไรโซเบียมในระดับโรงเรียน

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ของ *Streptomyces* sp. WF 4-1 และ *Streptomyces* sp. RF 12-4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron

Microscopy, SEM) พบว่ามีการสร้างสปอร์แบบเวียนเกลียว (spiral) (Figure 5) เมื่อนำ *Streptomyces* sp. WF 4-1 และ *Streptomyces* sp. RF 12-4 มาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรครดคือ รา *Sclerotium rolfsii* และแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ร่วมกับการปลูกเชื้อโรโซเบียม พบว่า ต้นกล้าถั่วเขียวมีอาการเน่าตายเมื่อได้รับการปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* แม้จะปลูกเชื้อแอกติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. WF 4-1 ร่วมด้วย ส่วนต้นกล้าที่มีการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. RF 12-4 มีการเกิดโรคปานกลางในระดับ 2 ส่วนการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครด *E. carotovora* pv. *carotovora* ทำให้ต้นกล้าถั่วเขียวเกิดโรคเล็กน้อยในระดับ 1 แต่ความสูงของต้น น้ำหนักสด ความยาวรากและจำนวนปมรากของแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 8) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ara *et al.* (2012) พบว่า เมื่อทำการทดลองในกระถางประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรครดของเชื้อแอกติโนมัยสีทมีความแปรผัน จึงต้องทำการทดสอบการปลูกเชื้อในรูปแบบน้ำเลี้ยง หรือสารสกัดแบบหยาบร่วมด้วย เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแอกติโนมัยสีทให้ครอบคลุมมากกว่าขึ้นว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ในส่วนน้ำเลี้ยง สารสกัดแบบหยาบ หรือชีวมวลของเชื้อแอกติโนมัยสีท

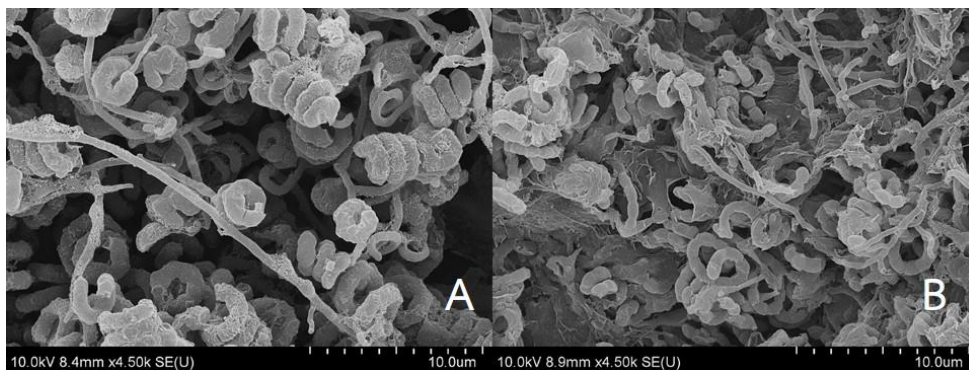


Figure 5 Characteristics of hyphae and spores of actinomycetes A) *Streptomyces* sp. WF 4-1 and B) *Streptomyces* sp. RF 12-4 under scanning electron microscope.

Table 8 Antagonistic testing of plant pathogens and rhizobium in greenhouse

Treatment	Height (cm)	Fresh weight (gram)	Root length (cm)	Number of root nodule	Disease severity index*
1. Rhizobium	17.94	1.01	5.52	17.78	0
2. Rhizobium + WF 4-1	19.33	1.04	6.64	14.22	0
3. Rhizobium + RF 12-4	18.31	1.00	6.87	16.11	0
4. Rhizobium + Sclerotium	0	0	0	0	4
5. Rhizobium + Sclerotium + WF 4-1	0	0	0	0	4
6. Rhizobium + Sclerotium + RF 12-4	14.50	0.76	6.32	8.55	2
7. Rhizobium + Erwinia	17.31	0.91	6.37	13.78	1
8. Rhizobium + Erwinia +	17.68	0.90	5.58	12.00	1

Treatment	Height (cm)	Fresh weight (gram)	Root length (cm)	Number of root nodule	Disease severity index*
WF 4-1					
9. Rhizobium + Erwinia + RF 12-4	17.89	0.91	4.66	16.00	1
CV. (%)	16.8	15.0	26.6	40.19	-
Sig.	ns	ns	ns	ns	-

Note: Sclerotium = *Sclerotium rolfsii*, Erwinia = *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, ns = means are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's post hoc multiple mean comparison tests

* Disease severity index: 0 = 2% (Healthy seedling), 1 = 3 - 30% (Mild), 2 = 31 - 60% (Moderate), 3 = 61 - 90% (Severe) and 4 = > 91% (Dead plants)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

Streptomyces sp. WF 4-1 มีความสามารถในการสร้าง siderophore ดีที่สุด *Streptomyces* sp. WF 10-1 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตดีที่สุด ส่วนแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝนที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซีติกมีจำนวนทั้งหมด 42 32 และ 29 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 10 ไอโซเลทมาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช พบว่า *Streptomyces* sp. WF 4-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *E. carotovora* pv. *carotovora*, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุด ส่วน *Streptomyces* sp. WA 20-3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. campestris* pv. *campestris* ได้ดีที่สุด การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช พบว่า *Streptomyces* sp. RF 23-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวได้ทุกชนิด และพบว่า *Streptomyces* sp. WF 3-1, WF 4-1, WF 10-1, RF 12-4 และ RF 23-1 ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรโซเบียมทั้ง 3 ชนิด คือ *B. japonicum* DASA 02006, *B. liaoningense* DASA 03018 และ *B. daqingense* DASA 03084 ดังนั้นจึงสามารถใช้ *Streptomyces* sp. WF 3-1, WF 4-1, WF 10-1, RF 12-4 และ RF 23-1 ร่วมกับการใช้โรโซเบียมทั้ง 3 ชนิดได้ เมื่อคัดเลือกแอกติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. WF 4-1 และ *Streptomyces* sp. RF 12-4 ไปทำการทดสอบในระดับโรงเรือนพบว่า ต้นกล้าถั่วเขียวมีอาการเน่าตายเมื่อได้รับการปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* แม้จะปลูกเชื้อแอกติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. WF 4-1 ร่วมด้วย ส่วนต้นกล้าที่มีการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. RF 12-4 มีการเกิดโรคปานกลางในระดับ 2 ส่วนการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *E. carotovora* pv. *carotovora* ทำให้ต้นกล้าถั่วเขียวเกิดโรคเล็กน้อยในระดับ 1 แต่ความสูงของต้น น้ำหนักสด ความยาวรากและจำนวนปมรากของแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ข้อมูลจากการทดลองนี้สามารถนำไปพัฒนาและทดสอบรูปแบบของการ

นำแอคติโนมัยสีทไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชหรือการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลองต่อไปได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและสามารถทำงานร่วมกับไรโซเบียมได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำแอคติโนมัยสีท ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : ขอขอบคุณ ดร.ติยากร ฉัตรนภารัตน์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราก่อโรคพืช ขอขอบคุณกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ

12. เอกสารอ้างอิง :

กรมวิชาการเกษตร. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 หน้า.

Anand, T.P., A.W.Bhat, Y.S.Shouche, U. Roy, J. Siddharth, and S.P. Sarma. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* 161(3): 252-262.

Ara, I., N.A. Bukhari, K. Perveen, and M.A. Bakir. 2012. Antifungal activity of some actinomycetes isolated from Riyadh soil, Saudi Arabia: An evaluation for their ability to control *Alternaria* caused tomato blight in green house pot trail. *African Journal of Agricultural Research* 7(3): 2042-2050.

Bric, J.M., R.M. Bostock, and S.E. Silverstone. 1991. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538.

El-Gammal, E.W., H.A. Shalaby, H.M. Ashry, and A.I. El-Diwany. 2014. In vitro action of *Streptomyces griseolus* proteases as bio-control on *Fasciola gigantica* Eggs. *Journal of Bacteriology and Parasitology* 5: 192. doi: 10.4172/2155-9597.1000192.

El-Tarabily, K.A. and K. Sivasithamparam. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38(7): 1505-1520.

Errakhi R., F. Bouteau, A. Lebrihi, M. Barakate. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal Microbiology Biotechnology* 23:1503-1509.

Khamna, S., A. Yokota and S. Lumyong. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 649-655.

Law, J.W.F., H.L. Ser, T.M. Khan, L.H. Chuah, P. Pusparajah, K.G. Chan, B.H. Goh, and L.H. Lee. 2017. The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology* 8: 3. doi: 10.3389/fmicb.2017.00003.

Milagres, A.M.F., M. Angela, and N. Diovana. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37: 1-6.

- Mukerji, K.G., C. Manoharachary, and J. Singh. 2006. *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 349 p.
- Rao Subba, N. S. 1993. *Biofertilizers in Agriculture and Forestry 3rd ed.*, Oxford & IBH Publishing Company, Delhi, 242 p.
- Sahu, M.K., K. Sivakumar, T. Thangaradjou, and L. Kannan. 2007. Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: an inventory. *Journal of Environmental Biology* 28(4): 795-798.
- Soltanzadeh, M., M.S. Nejad, and G.H.S. Bonjar. 2016. Application of soil-borne actinomycetes for biological control against *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum*) caused by *Fusarium solani* fsp *psii*. *Journal of Phytopathology* 194: 967–978.
- Sreevidya, M., S. Gopalakrishnan, H. Kudapa, and R.K. Varshney. 2016. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology* 47(1): 85–95.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey, and M.J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2161-2171.
- You, J.L., L.X. Cao, G.F. Liu, S.N. Zhou, H.M. Tan, and Y.C. Lin. 2004. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiological Biotechnology* 21: 679–682.
- Yuan, W.M. and D.L. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 3119-3128.