# ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

# Efficiency of Actinomyceste for Controlling *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

ร่มสุรีย์ มนตรีภักดี[1/] สรัญยา ณ ลำปาง*[1/]
Romsuree Motreepukdee[1/] Sarunya Nalumpang*[1/]

## ABSTRACT

A total of one hundred and twenty-six isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* were successfully isolated from tomato plants showing *Fusarium* wilt symptoms from commercial fields at Doi Inthanon national park, Chiang Mai. The isolate FolCK__117 was the most virulent isolate due to plant showing wilting or death and selected as representative strain. After that, six strains of soil actinomycetes namely NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6 isolate from the Doi Suthep-Pui national park, Chiang Mai. were tested for ability of growing on glucose yeast malt agar (GYM) mixed with fungicides by the manufacturer recommeded dose include Brodeaux mixture, captan, etridiazole + quintozene, iprodione, mancozeb, metalaxyl and prochloraz. The result showed that all actinomycetes could be able grown on GYM mixed with metalaxyl at recommended concentration (1,000 mg/kg). Moreover, they showed significantly higher on inhibiting the growth of pathogen than actinomycetes growing on GYM. The highest efficacy was given from isolate NSP3, which inhibited mycelial growth and sporulation of fungal pathogen at 84.11 and 94.44%, respectively. In addition, The non-filtrate culture (NF) of actinomyces isolate NSP3 showed the efficiency of 93.89% inhibiting the conidial germination of pathogen at 6 hr. In all experiments, 2 factorial in completely randomized design was conducted.

**Key words:** actinomycetes, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, Tomato

[1/] ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200 โทร 08 7103 5359

[1/] Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai 50200 Tel 08-7103-5359

* Corresponding author: Sarunya Nalumpang; e-mail: sarunyav@gmail.com

## บทคัดย่อ

แยกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* จากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเหี่ยว ในแปลงปลูกของเกษตรกร บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่ ได้จำนวน 126 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อสาเหตุไอโซเลท FolCK__117 สามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวได้รุนแรงที่สุดในระดับ 5 คือต้นมะเขือเทศเหี่ยวและตาย ภายหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุเป็นเวลา 21 วัน จึงนำมาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast malt agar (GYM) ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา Brodeaux mixture, captan, etridiazole+quintozene, iprodione, mancozeb, metalaxyl และ prochloraz ในอัตราส่วนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxy ที่ความเข้มข้น 1,000 มล./กก. และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการยับยั้งการสร้างสปอร์เชื้อราเท่ากับ 84.11 และ 94.44% นอกจากนี้เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ (Enzyme production medium; EPM) ชนิดที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (non-filtrate culture; NF) มาทดสอบพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด 93.89 % ที่เวลา 6 ชม. วางแผนการการทดลองแบบ 2 factorial in completely randomized design



**คำหลัก:** แอกติโนไมซีสต์, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, มะเขือเทศ


## คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและอุตสาหกรรม ผลผลิตมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชทั่วไป มะเขือเทศนอกจากจะบริโภคสดแล้ว ยังสามารถทำเป็นการค้าส่งโรงงานเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ แต่ในปัจจุบันการผลิตมะเขือเทศประสบปัญหาเกี่ยวกับเรื่องของการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืชอยู่เป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถเพาะปลูกได้ทั้งปี (จุฑามาศ, 2558) จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งทางด้านปริมาณ และคุณภาพ โดยทั่วไปมะเขือเทศจะมีการปลูกเป็นพื้นที่จำนวนมาก และปลูกในพื้นที่เดิมอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้เกิดการระบาดของโรคในดินอย่างรุนแรง โดยเฉพาะโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (Fusarium wilt) ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

(Watterson,1986) ในการควบคุมโรคเหี่ยว โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช และใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จึงทำให้เกิดผลกระทบตามมา คือเชื้อราจะเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ ทำให้ไม่สามารถใช้สารเคมีนั้น ๆ ในการควบคุมโรคได้อีกในคราวต่อไป (ธรรมศักดิ์, 2543) นอกจากนี้สารเคมียังทำลายจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในดิน รวมถึงก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เช่น การใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากดินทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืช (Alabouvette *et al*., 1993) เชื้อแอกติโนไมซีสต์ (Actinomyceste) เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ และสารทุติยภูมิที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (Johnson and Sangchote, 1994) มีประสิทธิภาพในการควบคุมและป้องกันกำจัดปริมาณเชื้อสาเหตุโรค สามารถลดการใช้สารเคมีได้ Saengnak *et al.* (2013) รายงานว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก ไอโซเลท FoC4 อยู่ในช่วง 75.7 – 81.0% นอกจากนี้การควบคุมโรคโดยชีววิธียังทำให้เกิดความปลอดภัย สร้างความมั่นใจกับผู้บริโภค และเกษตรกรผู้อาศัย บริเวณใกล้เคียง รวมทั้งสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ ด้วย ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการคัดเลือกแอกติโนไมซีสต์ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ

## อุปกรณ์และวิธีการ

**1. การแยกเชื้อราและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)**

ศึกษาลักษณะอาการโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พร้อมเก็บตัวอย่างต้นที่เป็นโรคจากแปลงของเกษตรกร บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ เพื่อแยกเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากต้นพืชโดยวิธี tissue transplanting method จากนั้นเลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 – 10 วัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นมะเขือเทศพันธุ์บอนนี่เบสท์ อายุ 15 วัน ด้วยวิธี root dip โดยการแช่รากในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อสาเหตุที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์/มล. เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำต้นมะเขือเทศไปปลูกลงในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประเมินผลการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุ 21 วัน โดยวัดระดับการแสดงการเกิดโรค 5 ระดับ ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการของโรค; 2 = ใบซีด และเหี่ยว; 3 = ใบซีด และเหี่ยว ต้นแคระแกร็น; 4 = ใบเหลือง เหี่ยวมาก ต้นแคระแกร็น และ 5 = ต้นมะเขือเทศเหี่ยวตาย (Marlatt *et al*., 1996) หลังจากที่บันทึกผลระดับการแสดงการเกิดโรค นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาจัดกลุ่ม

ระดับความรุนแรง Disease Severity Index (DSI) เป็น 4 กลุ่มดังนี้ DSI 1 คือ ไม่สามารถก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic), DSI 3.50 คือ เกิดโรคในระดับต่ำ (low virulent), DSI > 3.50-4.50 คือ เกิดโรคในระดับปานกลาง (moderate virulent) และ DSI > 4.50 คือ เกิดโรคในระดับที่รุนแรง (high virulent) (Sibounnavong, 2012) จากนั้นคัดเลือกเชื้อราสาเหตุไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวได้รุนแรงที่สุด เป็นตัวแทนเชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**2. การทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการเจริญร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

การทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติ สุเทพ-ปุย จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการเจริญร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ซึ่งเป็นสารที่ใช้จริงในแปลงของเกษตรกร (ติดต่อส่วนบุคคล) โดยการเตรียมสารความเข้มข้นตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จำนวน 7 ชนิด ประกอบด้วยสารประเภทสัมผัส 5 ชนิด ได้แก่ Brodeaux mixture (1,775 มก./กก.), captan (1,250 มก./กก.), etridiazole+ quintozene (450 มก./กก.), iprodione (750 มก./กก.) และ mancozeb (3,200 มก./กก.) และสารประเภท ดูดซึม 2 ชนิด ได้แก่ metalaxyl (1,000 มก./กก.) และ prochloraz (500 มก./กก.) ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Malt Agar (GYM) เทอาหารที่ผสมแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารแห้งแล้วเกลี่ยสารแขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ระดับความเข้มข้น $10^4$ cfu/ml. บนผิวหน้าอาหาร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 - 10 วัน ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ/ชนิดสาร สังเกตความสามารถในการเจริญ และสีโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เชื้อแอกติโนไมซีสต์แต่ละไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ที่ไม่ได้ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา) จากนั้น เก็บเชื้อแอกติโนไมซีตส์ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราไว้ใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลง จาก วรณิมาและเพชรรัตน์, 2554)

**3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ด้วยวิธี dual culture method โดยมี 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ เชื้อแอกติโนไมซีสต์ชุดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ปกติ (ชุดทดสอบ 1)

และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่สามารถเจริญได้บนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2 (ชุดทดสอบ 2) จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM อย่างเดียว) วัดรัศมีโคโลนีของเชื้อรา แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Lokesha and Benagi, 2007) ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราบริเวณปลายสุดของโคโลนีทั้งในชุดทดสอบ 1 และชุดทดสอบ 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นตรวจนับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดยเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารในชุดทดสอบที่มีเชื้อราอยู่ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม ขูดโคโลนีของเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วใช้ผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กรองเอาเส้นใยของเชื้อราออก นับจำนวนสปอร์เชื้อราด้วย haemacytometer วางแผนการทดลองแบบ 6X2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้ ปัจจัย A คือ ที่มาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญ, A1 = เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ปกติ และ A2 = เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และ ปัจจัย B คือ เชื้อแอกติโนไมซีสต์, 6 ไอโซเลท NSP1 NSP2 NSP3 NSP4 NSP5 และ NSP6 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์ ตามสูตรดังนี้ (percent inhibition of radial growth; PIRG)

$$\% \text{ IRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = รัศมีโคโลนี หรือจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = รัศมีโคโลนี หรือจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2535)

> 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

> 61 - 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

> 51 - 60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

≤ 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

**4. การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1 – NSP6 โดยเลี้ยงแต่ละไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF; non-filtrate culture) ส่วนที่สองกรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ที่มี

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 μm จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่กรองเอาเชื้อออก (F. filtrate culture) (วิลาสินี, 2555) นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ด้วยเทคนิค slide culture โดยเตรียมเชื้อราในรูปสารแขวนลอยสปอร์ ที่ความเข้มข้น $10^6$ สปอร์/มล. ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NF หรือ F อัตราส่วน 100 : 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือสารแขวนลอยสปอร์ ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นวุ้น ขนาด 1x1 ซม. นำไปวางในชุด slide culture บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับจำนวนสปอร์ ที่งอก ที่ เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชม. ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ 2x6 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้ ปัจจัย A คือ ระยะเวลาการทดสอบ 6 12 18 และ 24 ชม. และ ปัจจัย B คือ เชื้อแอกติโนไมซีสต์ 6 ไอโซเลท NSP1 NSP2 NSP3 NSP4 NSP5 และ NSP6 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราตามสูตรการคำนวณในข้อ 3 โดยสปอร์ที่ถือว่างอกนั้นต้องงอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของสปอร์ ซึ่งการตรวจนับการงอกของสปอร์นั้น จะสุ่มตรวจ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณขอบชิ้นวุ้น 4 ตำแหน่ง และตรงกลางวุ้น 1 ตำแหน่ง

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

สามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเหี่ยว ได้ทั้งหมด 126 ไอโซเลท และแบ่งตามสีของโคโลนี ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ สีม่วงอมชมพู สีขาวอมเหลือง และสีขาวอมส้ม ซึ่งทั้งสามกลุ่มนี้มีลักษณะเส้นใยหยาบ ฟูคล้ายสำลีไม่แตกต่างกัน ขณะที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยมีผนังกั้น สีใส และพบโคนิเดีย 3 ชนิด คือ chlamydospores, microconidia และ macroconidia ซึ่งจัดจำแนกว่าเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ตามหลักเกณฑ์ของ Snyder and Hans (2003) เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ภายหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุเป็นเวลา 21 วัน พบว่าเชื้อราสาเหตุสามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวได้ โดยต้นมะเขือเทศแสดงอาการในระดับ 1 คือไม่แสดงอาการของโรคมีจำนวน 59 ไอโซเลท (46.83%) ต้นมะเขือเทศแสดงอาการในระดับ 2 คือใบซีดและเหี่ยวมีจำนวน 57 ไอโซเลท (45.24%) ต้นมะเขือเทศแสดงอาการในระดับ 3 คือ ใบซีดและเหี่ยว ต้นแคระแกร็นมีจำนวน 6 ไอโซเลท (4.76%) ต้นมะเขือเทศแสดงอาการในระดับ 4 คือใบเหลืองเหี่ยวมาก ต้นแคระแกร็นมีจำนวน 3 ไอโซเลท (2.38%) และ ต้นมะเขือเทศแสดงอาการในระดับ 5 คือต้นมะเขือเทศเหี่ยวตายมี

จำนวน 1 ไอโซเลท (0.79%) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่แสดงอาการผิดปกติเลย แล้วนำมาจัดกลุ่มระดับความรุนแรงได้ดังนี้ กลุ่มที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic) มีจำนวน 28 ไอโซเลท (22.22%) กลุ่มที่เกิดโรคในระดับต่ำ (low virulent) มีจำนวน 88 ไอโซเลท (69.85%) กลุ่มที่เกิดโรคในระดับปานกลาง (moderate virulent) มีจำนวน 9 ไอโซเลท (7.14%) และกลุ่มที่เกิดโรคในระดับรุนแรง (high virulent) มีจำนวน 1 ไอโซเลท (0.79%) ซึ่งเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวที่รุนแรงที่สุดคือเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลท FoICK__117 และนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

**2. ความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการเจริญร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

การทดสอบความสามารถในการเจริญได้ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1 – NSP6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา Brodeaux mixture, captan, etridiazole+quintozene, iprodione mancozeb และสาร prochloraz แต่แอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราสามารถ metalaxyl เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาจนถึงสีดำ และจำนวนโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไม่แตกต่างจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่ได้ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (Table 1)

**Table 1** Number colonies of actinomycetes growing on Glucose Yeast Malt Agar (GYM) mixed with fungicide

| Fungicides | Number colonies of actinomycetes (cfu/g)* | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NSP1 | NSP2 | NSP3 | NSP4 | NSP5 | NSP6 |
| control | $2.5x10^6$ | $2.6x10^6$ | $1.8x10^6$ | $2.0x10^6$ | $1.5x10^6$ | $1.3x10^5$ |
| Brodeaux mixture[c/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| captan[c/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| etridiazole+quintozene[c/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| iprodione[c/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| mancozeb[c/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| metalaxyl[s/] | $2.8x10^6$ | $2.4x10^6$ | $1.4x10^6$ | $2.3x10^6$ | $1.8x10^6$ | $1.6x10^5$ |
| prochloraz[s/] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

[c/]contact fungicide, [s/]systemic fungicide

* Average from three replications

**3. ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเลี้ยง GYM ปกติ (ชุดทดสอบ 1) และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl (ชุดทดสอบ 2) มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง แอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 และ NSP5 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ไอโซเลท FoICK__117 ได้มากกว่า 75% โดยแอกติโนไมซีตสไอโซเลท NSP3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย ได้สูงสุดทั้งชุดทดสอบ 1 และชุดทดสอบ 2 คิดเป็น 82.56 และ 84.11% รองลงมาได้แก่ไอโซเลท NSP5 เท่ากับ 76.41 และ 80.00% ตามลำดับ (Table 2) ขณะที่ประสิทธิภาพของแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่า แอกติโนไมซีตส์ไอโซเลท NSP3 จากทั้งสองชุดที่ทดสอบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ ได้ดีที่สุดเช่นกัน คือ 88.93 และ 94.44% สำหรับ ชุดทดสอบที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนไมซีสต์ชุดที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสม metalaxyl มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ดีกว่าแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหาร GYM เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Saengnak *et al.* (2013) รายงานว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์ชุดเดียวกันนี้ได้แก่ NSP1 - NSP6 มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก ไอโซเลท FoC4 ได้ โดยไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุสูงสุด (81.0%) แต่ไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุต่ำสุด นอกจากนี้ พรนภาและคณะ (2554) รายงานว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อเดียวกันกับการทดสอบนี้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริกได้ และสอดคล้องกับการรายงานของ Tang-um and Niamsup (2012) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ที่เจริญร่วมกับเชื้อ *Streptomyces* sp. P4 ภายใต้กล้อง Scanning Electron Micoscopic (SEM) พบว่าผนังเซลล์ของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* มีลักษณะถูกย่อยสลาย และแตกหักเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยปกติ

**4. ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ชนิดไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) และชนิดกรองเอาเชื้อออก (F) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลท FoICK__117

**Table 2** Efficiency of 2 sets of Actinomycetes on inhibiting of mycelia growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FolCK__117) at 7 day after incubation

| Actinomycetes (isolate) | Mycelia inhibition (%)[1/] | | | Conidial inhibition (%)[1/] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Test1[2/] | Test2 | Diff.[4/] | Test1[2/] | Test2 | Diff. |
| NSP1 | 74.35 c | 78.46 bc | -4.11 * | 77.16 c[3/] | 89.59 b | 12.43 * |
| NSP2 | 78.46 b | 78.97 bc | -0.51[ns] | 82.96 b | 89.37 b | 6.41 * |
| NSP3 | 82.56 a | 84.11 a | -1.55[ns] | 88.93 a | 94.44 a | 5.51 * |
| NSP4 | 72.30 c | 77.43 c | -5.03 * | 59.56 d | 77.02 c | 17.46 * |
| NSP5 | 76.41 bc | 80.00 b | -3.59* | 78.76 bc | 90.36 ab | 11.60 * |
| NSP6 | 73.33 c | 68.72 d | 4.61* | 61.26 d | 66.98 d | 5.72 * |
| $LSD_{0.05}$ | | 2.28 | | | 4.67 | |
| CV (%) | | 1.77 | | | 3.48 | |

[1/] Average of three replicates.

[2/] Test 1 = actinomycetes growing on GYM, Test 2 = actinomycetes growing on GYM mixed with metalaxyl

[3/] Means in the same column, followed by common letter are not significantly different at 5% level by LSD

[4/] Difference between two tests for each isolate compared at 5% level by LSD: * significant, ns = non significant

พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่เวลา 6 ชม. หลังการทดสอบไอโซเลท NSP3 NSP2 NSP4 NSP1 NSP5 และ NSP6 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ 93.89 92.14 91.27 90.39 89.08 และ 87.77% ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 18 และ 24 ชม. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ของแอกติโนไมซีสต์ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ลดลง (Table 3) โดยไอโซเลท NSP3 มีเปอร์เซ็นต์ลดลงเป็น 81.41 67.69 และ 42.13% ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ของ NSP3 เมื่อเวลา 12 และ 18 ชม. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ลดลงเหลือ 56.16 และ 22.90% และที่เวลา 24 ชม. พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ของแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลท FolCK__117 ได้ เพราะสปอร์ของเชื้อราสามารถงอกเป็นเส้นใยจนไม่สามารถวัดความงอกของสปอร์ได้ แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดของไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย นอกจากนี้พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการรายงานของวิลาสินี (2555) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ

**Table 3** Efficiency of Actinomyces culture media (Non-Filtrated, Filtrated) on inhibiting conidial germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopesici* isolate FolCK__117 at various time after treatment

| Actinomyces (isolate) | conidial germinate inhibition (%)[1/] | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 h | | | 12 h | | | 18 h | | | 24 h | |
| | NF[2/] | F | Diff[4/] | NF | F | Diff. | NF | F | Diff. | NF | F |
| NSP1 | 90.39 a | 58.09 cd | 32.30* | 65.86 cd | 33.94 d | 31.92* | 42.38 d | 12.45 c | 29.93* | 26.29 c | -[3/] |
| NSP2 | 92.14 a | 72.93 b | 19.21* | 75.76 b | 52.53 ab | 23.23* | 63.36 b | 15.53 b | 47.83* | 41.53 a | - |
| NSP3 | 93.89 a | 83.41 a | 10.48* | 81.41 a | 56.16 a | 25.25* | 67.69 a | 22.90 a | 44.79* | 42.13 a | - |
| NSP4 | 91.27 a | 70.75 bc | 20.52* | 70.30 c | 50.30 b | 20.00* | 59.16 c | 16.03 b | 43.13* | 38.14 b | - |
| NSP5 | 89.08 a | 50.67 d | 38.40* | 61.82 d | 20.00 e | 41.82* | 36.65 e | 7.17 d | 29.48* | 21.61 d | - |
| NSP6 | 87.77 b | 64.64 c | 23.13* | 47.68 e | 39.19 c | 8.49* | 31.89 f | 14.04 bc | 17.85* | 7.76 e | - |
| $LSD_{0.05}$ | | 7.72 | | | 4.65 | | | 2.95 | | 3.51 | |
| % CV | | 5.82 | | | 5.06 | | | 5.39 | | 14.07 | |

[1/] Average of three replicates.

Means in the same column, followed by common letter are not significantly different at 5% level by LSD

[2/] NF = non-culture medium filtrate, F = culture medium filtrate

[3/] can not be measured. (all conidia germinated and growing to mycelium)

[4/] Difference between two cultured medium for each isolate compared at 5% level by LSD: * significant,

อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับการทดสอบ ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ยังมีเชื้อแอกติโนไมซีสต์เจริญอยู่ ทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมาได้อย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้สูงกว่า

## สรุปผลการทดลอง

เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1 NSP2 NSP3 NSP4 NSP5 และ NSP6 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl มีประสิทธิภาพของในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลท FolCK__117 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ก่อโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้รุนแรงที่สุด โดยไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์เชื้อราได้สูงที่สุด (84.11 และ 94.44%) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท NSP3 ทั้งชนิด NF และ F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลท FolCK__117 ได้ดีที่สุดเช่นกัน ที่เวลา 6 ชม. สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้

93.89 และ 83.41% โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ดังนั้น รายงานฉบับนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชแบบผสมผสานระหว่างการใช้สารเคมีร่วมกับชีววิธี

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือในการทำงานวิจัย และงานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## เอกสารอ้างอิง

จุฑามาศ รุ่งเกรียงสิทธิ์. 2558. *มะเขือเทศ*. รายงานสถานการณ์มะเขือเทศสินค้าเกษตร 2558. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year%202016/019__yvopersion%20esculentum.pdf. ค้นเมื่อ 25 พฤษภาคม 2559.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. *สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช*. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ลินคอล์น, กรุงเทพฯ. 317 หน้า.

พรนภา โทตรี ชาติชาย โขนงนุช และสรัญยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. *ว. วิทยาศาสตร์เกษตร.* (พิเศษ) 42(1): 163-166.

พิภพ ลำยอง และบรรเจิด อินสว่าง. 2527. การใช้สารเคมีบางชนิดป้องกันกำจัดโรคราแป้ง และรากเน่าของถั่วลันเตา. หน้า 1-3. *ใน: โครงการศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร 2527.* คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วรณิมา ชุดพิมาย และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2554. ผลกระทบของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีผลต่อการเจริญ และประสิทธิภาพของเชื้อรา *Streptomyces*-PR87. *ว. แก่นเกษตร* 39: 196-201.

วิลาสินี แสงนาค. 2555. *ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ โรคแอนแทรคโนสมะม่วง.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 201 หน้า.

Alabouvette, C., P Lemanceau, and C. Steinberg. 1993. Recent advances in the biological control of Fusarium wilts. *J. Pesticide Science* 37: 365–373.

Johnson, G. I and S. Sangchote. 1994. Control of postharvest diseases of tropical fruits: challenges for the 21st century. Pages 140-167. *In: Post-harvest Handling of Tropical Fruit.* (ed.). Champ, B. R., Highley,

E., and Johnson, G. I. Australian Center for International Agricultural Research, Canberra.

Lokesha, N.M. and V.L Benag. 2007. Biocontrol management of pigeonpea dry root caused by Macrophomina phaseolina. Karnataka *J. Agricultural Science* 20: 54-56.

Marlatt, M.L., J.C Correll, P. Kaufmann, and P.E. Cooper. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race3 in the united States. *J. Plant Diseases* 80 (12): 1336-1342.

Saengnak, V. Chaisiri, C. and Nalumpang, S. 2013. Antagonistic Streptomyces species can protect chili plants against wilt disease caused by Fusarium. *J. Agricultural Technology* 9(7):1895-1908.

Sibounnavong, P. 2012. Screening of *Emericella nidulans* for biological control of tomato Fusarium wilt in Lao PDR. *J. Agricultural Technology* 8(1): 241-260.

Snyder, W. C. and Hans, H. N. 2003. *Fusarim oxysporium* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) and Prepared by Mui-Yun Wong. 728 p. Soilborne Plant Pathogen Class Project, Spring.

Tang-um, J. and Niamsup, H. 2012. Chitinase production and antifungal potential of endophytic Streptomyces stain P4. Maejo Int. *J. Sci. Technol.* 6(1): 95-104

Watterson, J.C. Atherton, J.G. and Rudhich, J. 1986. *The tomato crop Disease*. Pages 444-484. Chapman & Hall, London.