

ประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบของแบคทีเรีย *Streptomyces* spp.
ในการควบคุมโรคใบจุดชุม (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc.) ในยางพาราชำถุง
Efficiency of Crude Extracts from *Streptomyces* spp. for *Colletotrichum*
Leaf Spot Disease *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc.
Control in Poly Bag Para Rubber

อรวรรณ ปิยะบุญ^{1/} ตติยะ ศิริลือสาย^{1/} ศิริวิทย์ หอสูติสิมา^{1/}
ณัชชารีย์ องค์กรกาญจนา^{1/} เมธาวิ โฉมทอง^{1/}
Orawan Piyaboon^{1/} Tatiya Siriluesai^{1/} Siriwit Horsutisima^{1/}
Natcharee Ongkanchana^{1/} Methawi Chomthong^{1/}

ABSTRACT

Colletotrichum leaf spot disease from *Colletotrichum gloeosporioides* is the major diseases in para rubbers, important economic plants in Thailand. In the present study, *C. gloeosporioides* were collected in soil from Ratchaburi, Surat Thani and Nakhon Pathom provinces and 25 isolates of *Streptomyces* spp. were investigated to determine the inhibitory effect on the growth of *C. gloeosporioides* using dual culture tests. The result showed that *Streptomyces* sp. SC-1 had an ability to inhibit the growth of *C. gloeosporioides*. Then, 5 concentrations of the crude extract from *Streptomyces* sp. SC-1 which are 346.15 (100%), 259.61 (75%), 173.08 (50%), 86.54 (25%) and 43.27 (12.5%) mg/ml were tested using the paper-disc agar-plate method. 86.54 mg/ml crude extract was the lowest concentration that had no significant difference from of 7.5 mg/ml benomyl. Therefore, 86.54 mg/ml of crude extract from *Streptomyces* sp. SC-1 was applied to the leaf of poly bag para rubber. The result was found that the percentage of inhibition was 65.28, 76.85 and 88.43 for 200, 400 and 600 μ l of the curde extract, respectively. The percentage of inhibition of 200 μ l had no significant difference from that of 7.5 mg/ml benomyl.

Key-words: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Streptomyces* sp., *Colletotrichum* leaf spot disease, poly bag para rubber

^{1/} สาขาวิชาชีววิทยา โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

^{1/} Department of Biology, Mahidol Wittayanusorn School, Phutthamonthon district, Nakhon Pathom province 73170

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ประสบปัญหาการเกิดโรคใบจุดนูนซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในงานวิจัยนี้ได้แยก *C. gloeosporioides* จากดินในจ.ราชบุรี สุราษฎร์ธานีและนครปฐม ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท โดยใช้วิธี Dual cultures พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* หลังจากนำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 มาสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำส่วนสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 346.15 (100%) 259.61 (75%) 173.08 (50%) 86.54 (25%) และ 43.27 (12.5%) มก./มล. มาทดสอบด้วยวิธี Paper-disc agar-plate พบว่าส่วนสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 86.54 มก./มล. เป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยไม่แตกต่างจากสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้น ทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคใบจุดนูนในยางพาราชำถุง ส่วนสกัดหยาบของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ที่ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. พบว่าการใช้ส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. ปริมาตร 200 400 และ 600 ไมโครลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคเป็น

65.28 76.85 และ 88.43 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคในยางพาราชำถุงที่ได้รับส่วนสกัดหยาบ 86.54 มก./มล. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไม่แตกต่างจากสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำหลัก: *Colletotrichum gloeosporioides* *Streptomyces* sp. โรคใบจุดนูน ยางพาราชำถุง

คำนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และได้รับความนิยมในการปลูกในพื้นที่การผลิตประมาณ 15.2 ล้านไร่ โดยเป็นยางเปิดกรีดได้แล้วจำนวน 10.9 ล้านไร่ (นิรนาม, 2550) นอกจากน้ำยางแล้ว ทั้งลำต้น ใบ แม้กระทั่งเมล็ด ยังสามารถนำไปทำประโยชน์ได้ทั้งสิ้น ในอดีตยางพารานิยมปลูกในของภาคใต้และบางจังหวัดทางภาคตะวันออกเท่านั้น แต่ในปัจจุบันอันเนื่องจากตลาดโลกต้องการปริมาณน้ำยางเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จึงได้มีการขยายพื้นที่ในการปลูกยางพาราไปทั่วประเทศ (แหลมทองและคณะ, 2548) ทำให้รัฐบาลมีนโยบายในการเพิ่มพื้นที่ในการปลูกยางพารา ส่งผลให้มีความจำเป็นต้องใช้ยางพาราชำถุงเป็นจำนวนมาก แต่ในการปลูกกล้ายางพารามักประสบปัญหาทั้งโรคหรือศัตรูในต้นยางพาราเป็นผลให้ยางพาราชำถุงไม่สมบูรณ์เพียงพอสำหรับการติดตาม

โรคใบจุดนูนที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum*

gloeosporioides Penz.Sace. ทำให้เกิดปัญหาในภาคใต้ในเขตฝั่งตะวันตก ได้แก่ จ.ระนอง ภูเก็ต พังงา และส่วนใหญ่ของจ.กระบี่ ตอนเหนือของ จ.ตรัง และทางตอนใต้ของ จ.สุราษฎร์ธานี นอกจากนี้ยังก่อปัญหาในภาคเหนือ 17 จังหวัด ได้แก่ จ.เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา น่าน ลำปาง แพร่ ลำพูน พิชณุโลก แม่ฮ่องสอน กำแพงเพชร ตาก สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานีและเพชรบูรณ์ รวมทั้งบางจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มักพบโรคดังกล่าวในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนมากกว่า 1,600 มม./ปี (นิรนาม, 2548) ในการระบาดของโรคใบจุดบนที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีผลกระทบต่อการปลูกต้นยางพาราในระยะต้นยางเล็กในแปลงต้นกล้ายาง แปลงกิ่งตาขยายพันธุ์ยาง และแปลงยางชำถุง (นริสา, 2544) โดยเชื้อราเข้าทำลายที่ใบอ่อน ทำให้ปลายใบบิดงอ เทียวเน่าดำและหลุดร่วง พบจุดแผลสีน้ำตาล ขอบแผลสีเหลือง ขนาดประมาณ 1-2 มม. เมื่อใบมีอายุมากขึ้น เนื้อตรงกลางแผลอาจทะลุเป็นรู ถ้าระบาดรุนแรงอาจพบแผลบนกิ่งอ่อนหรือยอดอ่อน และทำให้เกิดอาการตายจากยอดได้ โดยการแพร่ระบาดเกิดรุนแรงกับยางที่แตกใบอ่อนในช่วงที่ฝนตกชุก ความชื้นสูง เชื้อแพร่ระบาดโดยน้ำฝน ลมและแมลง (นิรนาม, 2548)

ในปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคดังกล่าว เช่น สารเคมีกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมในกลุ่ม benzimidazole fungicides เช่น mancozeb, captan, benomyl, propineb, chlorothalonil,

prochloraz และ copper oxychloride (ธนวัฒน์, 2549) ซึ่งการใช้สารเคมีปริมาณมากและติดต่อกันเป็นเวลานาน ส่งผลให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ทำให้ต้านทานต่อสารเคมี ส่งผลให้เกษตรกรเพิ่มต้นทุนค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีในการควบคุมโรคเพิ่ม อีกทั้งสารเคมียังสะสมในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (สิริวรรณและศานิต, 2553)

ดังนั้นเกษตรกรจึงได้มาสนใจชีววิธีในการกำจัดโรคใบจุดบนหลายวิธี ได้แก่ สารสกัดด้วยเอทานอลจากมะรุม(ใบ) และฟ้าทะลายโจร (ลำต้นเหนือดิน) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* (สิริวรรณและศานิต, 2553) และ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยเฉพาะการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ที่สามารถผลิตสารในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น สาร Jingga mycin เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราโดยเป็นสารในกลุ่ม hydrophilic และเป็นสารละลาย antibiotic-glucosidase ที่มีคุณสมบัติในการสลายเซลลูโลสและไคตินจึงสามารถควบคุมเชื้อราได้ (Wan et al., 2008) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้มีการนำสารสกัดของเชื้อรา *S. aureofaciens* LJK109 มาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อรา *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. และ *Sclerotium rolfsii* (Taechowisan et al., 2012)

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. และส่วน

สกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดนูนในต้นกล้วยพารา

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. และส่วนสกัดหยาบของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดนูนในกล้วยพาราซ่า ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. และเชื้อรา *C. gloeosporioides*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท ที่แยกจากดินใน จ.ราชบุรี และสุราษฎร์ธานี และที่ได้จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 19 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. แยกมาจากดินใน จ.นครปฐม ที่ได้จากมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จำนวน 6 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 (International Streptomyces Project-2) ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน เพื่อจำแนกลักษณะสีและลักษณะรูปร่างโคโลนี และการย้อมสีแบบแกรม เพื่อศึกษาลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจากต้นกล้วยพาราที่เป็นโรคใบจุดนูนในเกาะลันตา

จ.กระบี่ ของสถาบันวิจัยยาง จ.ฉะเชิงเทรา มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน สังเกตสีของเส้นใยและสปอร์ พร้อมทั้งลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในแต่ละไอโซเลทในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร ISP-2 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ในแต่ละไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. เป็นกรรมวิธีทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture tests) ตามวิธีของศิริทิพย์และคณะ (2549) โดยใช้เข็มเขี่ยจุดเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ลงบนบริเวณซ้ายมือของอาหารเพียงจุดเดียว โดยให้มีระยะห่างระหว่างขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำ cork borer เจาะชิ้นส่วนของเชื้อรา *C. gloeosporioides* วางบริเวณขวามือของอาหาร โดยให้มีระยะห่างระหว่างขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. และเป็นแนวที่ตรงข้ามกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. บ่มที่ 28 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน โดยกรรมวิธีควบคุมคือการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บน ISP-2 โดยที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. หลังจากนั้นคำนวณดัชนีการยับยั้ง

(inhibition index) โดยใช้สูตร

$$\text{ดัชนีการยับยั้ง (I)} = \frac{C}{D}$$

เมื่อ C = ความยาวของบริเวณที่มีการยับยั้ง

D = ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ศรีสกุล, 2553)

หาค่าเฉลี่ยดัชนีการยับยั้งและสัมประสิทธิ์ของความผันแปร แล้วนำค่าดัชนีการยับยั้งที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) และหาความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีทดลองด้วยวิธี DMRT

3. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากทั้งหมด 25 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP-2 นำไปเขย่าที่ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน แล้วแยกเซลล์แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ความเร็ว 10,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายคือ ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วเลือกของเหลวชั้นบนและกลางที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และชั่งน้ำหนักสารที่สกัด

ได้แล้วทำการละลายด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 5% โดยสารละลายที่ได้จัดเป็นส่วนสกัดหยาบความเข้มข้นคิดเป็น 100%

4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มีทั้งหมด 8 กรรมวิธี แบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธีทดลอง และ 3 กรรมวิธีควบคุม ในแต่ละความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบของเชื้อแบคทีเรียทำการเจือจางด้วย DMSO ความเข้มข้น 5% ได้แก่ กรรมวิธีทดลองที่ 1 มีความเข้มข้น 346.15 มก./มล. (100%) กรรมวิธีทดลองที่ 2 มีความเข้มข้น 259.61 มก./มล. (75%) กรรมวิธีทดลองที่ 3 มีความเข้มข้น 173.08 มก./มล. (50%) กรรมวิธีทดลองที่ 4 มีความเข้มข้น 86.54 มก./มล. (25%) และกรรมวิธีทดลองที่ 5 มีความเข้มข้น 43.27 มก./มล. (12.5%) ส่วนกรรมวิธีควบคุมมี 3 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีควบคุมที่ 1 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ กรรมวิธีควบคุมที่ 2 DMSO ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกรรมวิธีควบคุมที่ 3 สารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. โดยแต่ละกรรมวิธีจะหยดสารลงในกระดาษ paper disc ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นวาง paper disc ที่เตรียมไว้ลงบนผิวหน้าของอาหารโดยมีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. และ

นำ cork borer เจาะชั้นวงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* วางบนผิวอาหารที่มี paper disc โดยให้มีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. ไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน แล้วบันทึกผลเมื่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent inhibition of diameter growth = PIDG)

$$\text{โดยใช้สูตร PIDG} = \frac{(D1 - D2)}{D1} \times 100$$

D1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีควบคุมที่ 1

D2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides*; ในกรรมวิธีควบคุมที่ 2 3 และกรรมวิธีทดลอง (บรรเจิดและจิระเดช, 2529)

หลังจากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตมาหาค่าเฉลี่ยและสัมประสิทธิ์ของความผันแปร และนำค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกรรมวิธีด้วยวิธี DMRT

5. การทดสอบปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ ส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุม เชื้อรา *C. gloeosporioides* ในยางพาราชำถุง

นำยางพาราชำถุงสายพันธุ์ RRIM 600 ที่เพาะด้วยการติดตา (ต้นตออายุ 1 ปี และกิ่งตา อายุ 1 เดือน) มาปรับสภาพแวดล้อมโดยเพาะลงดินปลูกใต้ตาข่ายตาห่างกรองแสง 50% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ

CRD จำนวน 3 ซ้ำ หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ ปลอดภัยขีดให้เกิดรอยแผลความยาว 1 ซม. กึ่งกลางใบที่ยอดของยางพาราชำถุง แล้วทำการ ฉีดพ่นใบในแต่ละต้น โดยกรรมวิธีทดลอง เป็นการเตรียมส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 3 กรรมวิธีทดลอง คือกรรมวิธีทดลองที่ 1 ฉีดพ่นสารสกัดจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กรรมวิธีทดลองที่ 2 ฉีดพ่นสารสกัดจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และกรรมวิธีทดลองที่ 3 ฉีดพ่นสารสกัดจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ส่วน กรรมวิธีควบคุมมี 2 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธี ควบคุมที่ 1 ฉีดพ่นน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และกรรมวิธีควบคุมที่ 2 ฉีดพ่นสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

หลังจากนั้น 1 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 ซม. เจาะชั้นวงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* วางบริเวณรอยแผลบน ต้นกล้ายางพาราในกรรมวิธีควบคุมที่ 1-2 และ กรรมวิธีทดลองที่ 1-3 หลังจากนั้นฉีดพ่นด้วย ส่วนสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง ซ้ำทุก 3 วัน หลังจากนั้นบันทึกผลการทดลองเมื่อมียางพาราชำถุงแสดงอาการใบหลุด โดยบันทึกลักษณะของ

รอยแผลและลักษณะของใบ แล้วให้คะแนน ความรุนแรงของโรคตามระดับลักษณะอาการดังนี้

- 0 = ใบปกติ
- 1 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลมี 0.5-0.6 ซม.
- 2 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลมี 0.6-0.7 ซม.
- 3 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลมี 0.7-0.8 ซม.
- 4 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลมี 0.8-0.9 ซม.
- 5 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลมี 0.9-1.0 ซม.
- 6 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง
- 7 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง มีจุดกระจายทั่วใบ
- 8 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง มีจุดกระจายทั่วใบ มีอาการใบเหลืองร่วม
- 9 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง มีจุดกระจายทั่วใบ มีอาการใบสีน้ำตาล เส้นใบสีขา
- 10 = ใบมีรอยแผลสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลือง มีจุดกระจายทั่วใบ มีอาการใบสีน้ำตาล เส้นใบสีขา ใบหลุด

แล้วนำคะแนนแต่ละต้นมาคำนวณดัชนี ความรุนแรงของโรคในแต่ละกรรมวิธีทดลอง (วีระศักดิ์, 2540)

ดัชนีความรุนแรงของโรค

$$= \frac{\text{ผลรวม (ระดับอาการ} \times \text{จำนวนต้นที่เป็นโรคระดับนั้น)}}{\text{ระดับอาการสูงสุด} \times \text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

และนำค่าดัชนีความรุนแรงของโรคในแต่ละกรรมวิธีทดลองมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคในต้นกล้วยพารา โดยใช้สูตร

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

R1 = ดัชนีความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุมที่ 1

R2 = ดัชนีความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุมที่ 2 และกรรมวิธีทดลอง

และนำค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตที่ได้มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และสัมประสิทธิ์ของความผันแปรและความแปรปรวน หาคความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีด้วยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สันฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. และเชื้อรา *C. gloeosporioides*

การย้อมสีแบบแกรมและนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. เป็นแกรมบวก มีรูปร่างแบบ streptococcus และลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. โดยลักษณะผิวโคโลนีในระยะแรกจะมีผิวเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นลักษณะผิวโคโลนีจะมีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ โดยมีลักษณะคล้ายกันทั้ง 25 ไอโซเลท สีของโคโลนีที่พบแบ่งเป็น 6 สีคือ ขาว เทาขาว เทาดำ แดง เหลืองและส้ม

เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีลักษณะของเส้นใยสีขาว มีสปอร์สีส้ม และเมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเส้นใยมีผนังกันและพบสปอร์เป็นแบบ conidia ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1992)

2. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. จำนวน 25 ไอโซเลท มีค่าดัชนีการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ระหว่าง 0-4.03 (Table 1) โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้สูงสุด มีค่า 4.03 เพราะเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารและเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา ทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ เช่น มีลักษณะบวมและรูปร่างเส้นใยผิดปกติ (Prapagdee *et al.*, 2008) เช่น เอนไซม์ chitinase สามารถย่อยสลาย chitin ในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Felse and Panda, 1999) และเอนไซม์ β -1, 3-glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucan ในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Noronha and Ulhoa, 2000)

3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ

ส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ที่ความเข้มข้น 346.15 259.61 173.08 86.54 และ 43.27 มก./มล. มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่ากับ 9.38 46.81 57.44

Table 1. Inhibition index on controlling *C. gloeosporioides* of *Streptomyces* spp.

<i>Streptomyces</i> spp.	Inhibition index (cm)
Control	0.00k
SC - 1	4.03 a
SC - 5	3.50 b
SC - 2	3.27 bc
CH - 8	3.07 cd
SC - 3	2.97 cde
KU - 15	2.93 cde
SC - 4	2.83 def
SC - 6	2.77 defg
CH - 2	2.70 defg
KU - 5	2.53 efgh
KU - 19	2.47 fgh
CH - 15	2.37 gh
KU - 17	2.23 h
CH - 3	1.37 i
CH - 19	0.80 i
KU - 8	0.77 j
CH - 13	0.67 j
CH - 18	0.40 jk
CH - 12	0.00 k
CH - 14	0.00 k
KU - 2	0.00 k
KU - 4	0.00 k
KU - 13	0.00 k
KU - 14	0.00 k
KU - 18	0.00 k
CV (%)	10.20

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

58.63 และ 70.96 ตามลำดับ (Table 2) และ ส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ความเข้มข้น 86.54 มก./มล เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ไม่แตกต่างจากสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) จากผลการทดลองแสดงว่าส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 สามารถควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. มีการสร้างสาร extracellular antifungal metabolite ในระยะ exponential phase และ stationary phase แล้วมีการหลั่งสารยับยั้งการเจริญของรา ดังกล่าวออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Prapagdee *et al.*, 2008)

4. ปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในยางพาราชำถุง

ยางพาราชำถุงที่ได้รับส่วนสกัดหยาบ ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. ในปริมาณที่ต่าง ๆ กันคือ 200 400 และ 600 ไมโครลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคเป็น 65.28 76.85 และ 88.43 ตามลำดับ โดยต้นยางพาราชำถุงที่ได้รับส่วนสกัดหยาบปริมาณ 200 ไมโครลิตร มีค่าดัชนีความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างจากต้นที่ได้รับสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) เมื่อเปรียบเทียบ

Table 2. Concentration of crude extracts from *Streptomyces* sp. SC-1 on controlling *C. gloeosporioides*

Material	Percent inhibition
Sterile water	0.00 e
DMSO 5%	3.07 e
Benomyl 7.5 mg/ml	47.45 c
Crude extracts 43.27 mg/ml	9.38 d
Crude extracts 86.54 mg/ml	46.81 c
Crude extracts 173.08 mg/ml	57.44 b
Crude extracts 259.61 mg/ml	58.63 b
Crude extracts 346.15 mg/ml	70.96 a
CV (%)	7.24

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Table 3. Volume of crude extracts from *Streptomyces* sp. SC-1 for control in poly bag para rubber

Material	Percent inhibition
Sterile water 200 ml	0.00 d
Benomyl 7.5 mg/ml 200 ml	65.29 c
Crude extracts 200 ml	65.28 c
Crude extracts 400 ml	76.85 b
Crude extracts 600 ml	88.43 a
CV (%)	2.36

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

ปริมาณของส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีที่สุด และการทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าที่ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากสารเคมี benomyl ที่ความเข้มข้น 7.5 มก./มล. เมื่อนำส่วนสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SC-1 ที่ความเข้มข้น 86.54 มก./มล. ไปทดสอบประสิทธิภาพของพาราชา่ดงสภาพดินปลูก พบว่าพาราชา่ดงที่ได้รับส่วนสกัดหยาบ ปริมาตร 200 400 และ 600 ไมโครลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคเป็น 65.28 76.85 และ 88.43 ตามลำดับ โดยพาราชา่ดงที่ได้รับส่วนสกัดหยาบปริมาณ 200 ไมโครลิตร มีค่าดัชนีความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากต้นที่ได้รับสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 7.5 มก./มล.

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมยางพารา” ในโครงการ ยุววิจัยยางพารา สถาบันกองทุนสนับสนุนการ

วิจัย (สกว.) ซึ่งเอื้อเพื่อเงินทุนในการทำโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล ที่ให้คำปรึกษาในรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ขั้นตอนการทดลอง และขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบ พร้อมทั้งขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนที่ได้ให้ ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. สถาบันวิจัยยาง จ.ฉะเชิงเทรา ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากต้นยางพาราที่เป็นโรคใบจุดนูนในเกาะลันตา จ.กระบี่ และดร.บัวหลวง ฝ่ายเยื่อ สาขาวิชาชีววิทยา โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ องค์การมหาชนในการให้คำแนะนำและปรับปรุงต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- ธนวัฒน์ อัมรามร. 2549. พริกผักกินผลร้อนแรง แห่งปี. *เคหการเกษตร* 30(4): 70-90.
- นริสา จันท์เรือง. ความต้านทานโรคของยางพารา 2544 พันธุ์สถาบันวิจัยยาง 250 และสถาบันวิจัยยาง 251. หน้า 90-110. ใน: *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการยางพารา ประจำปี 2544*. 20 - 22 กุมภาพันธ์ 2544 เชียงใหม่.
- นรินาม 2548. *เอกสารวิชาการ: ยางพารา*. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน. (เอกสารที่ไม่ได้ตีพิมพ์)
- นรินาม. 2550. *ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2550*. อรุณการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 110 หน้า.

- บรรเจิด อินหว่าง และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2529. การควบคุมโรครากเน่าของมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* Kuenhn.) โดย จุลินทรีย์ดินเกษตรกรรม. หน้า 173-175. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการ สาขาพืช ครั้งที่ 24. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 27-29 มกราคม 2529 กรุงเทพฯ.
- วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2540. การจัดการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 175 หน้า.
- ศิรินทิพย์ แดงตีบ จิระเดช แจ่มสว่าง วรณวิไล อินทนู และปราโมทย์ สฤกษ์นรินทร์. 2549. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis asparagi* Bubak ในแปลงปลูก. ว. วิทย กษ. 36(5): 1211-1214.
- ศรีสกุล ชนะพันธ์. 2553. การคัดแยกและการกรองเชื้อเอ็นโดไฟติกแอนติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. 132 หน้า.
- สิริวรรณ สมิตธิอาภรณ์ และศานิต สวัสดิกาญจน์. 2553. ผลของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของค่น้ำ. ว. วิทย. กษ. 41(3/1)(พิเศษ): 305-308.
- แหลมทอง ร่มสนธิ มนพัทธ์ สีขาว ปิยวรรณ พึ่งโพธิ์ทอง มยุรีย์ งามวงษ์ และสิริลักษณ์ บุญมาก. 2548. การปลูกและบำรุงรักษา ยางพารา. สำนักพิมพ์ประสานมิตร กรุงเทพฯ. 64 หน้า.
- Felse, P.A., and T. Panda. 1999. Studies on application of chitin and its derivatives. *Bioproc. Eng.* 20: 505-512.
- Noronha, E. F. and C. J. Ulhoa. 2000. Characterization of a 29-KDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* 183: 119-123.
- Prapagdee, B., U. Akrapikulchart and S. Mongkolsuk. 2008. Potential of a soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of Anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. *Bio. Sci.* 8(7): 1187-1192.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In Pages 1-27. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger (eds.) CAB International, Wallingford, UK.
- Taechowisan, T., S. Chanaphat, W. Ruensamran, and W. S. Phutdhawong. 2012. Antifungal activity of 3-methylcarbazoles from *Streptomyces*

sp. LJK109; an endophyte in
Alpinia galangal. *J. of Applied
Pharmaceutical Sci.* 2(3): 124-128.

Wan, M., L. Guoqing, Z. Jibin, J. Daohong
and C. H. Hung. 2008. Effect of

volatile substances of *Streptomyces
platensis* F-1 on control of plant
fungal diseases. *Biol. Control* 46:
552-559.