การแยกและคัดเลือก *Streptomyces* sp. ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน

Isolation and selection of *Streptomyces* sp. producing antifungal compounds for control of *Ganoderma boninense* causing basal stem rot disease in oil palm

ธีระ ชูแก้ว ยิ่งนิยม ริยาพันธ์ วรกร สิทธิพงษ์ เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข
Teera Chookaew Yingniyom Riyapan Worakorn Sittipong Therdsak Sawatsuk

บทคัดย่อ

โรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* เป็นโรคที่กำลังระบาดในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทางภาคใต้ของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาศักยภาพของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. ต่อการควบคุมเชื้อรา *G. boninense* ดำเนินการทดลองเดือนตุลาคม 2562 ถึงกันยายน 2564 โดยแยก *Streptomyces* sp. จากดินรอบลำต้นปาล์มน้ำมันในพื้นที่ภาคใต้จำนวน 21 ตัวอย่าง ได้ *Streptomyces* sp. จำนวน 167 ไอโซเลท คัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *G. boninense* ด้วยวิธี dual culture พบว่า 4 ไอโซเลท (CW2 CW5 CW9 และ KS1) ยับยั้งร้อยละ 100.00 และไอโซเลท KS10 ยับยั้งร้อยละ 93.52 เมื่อทดสอบการยับยั้งโดยใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อพบว่า ไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 ให้การยับยั้งร้อยละ 100.00 ทั้งจากการทดสอบด้วย dual culture และการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 จัดจำแนกเป็น *S. morookaense* ไอโซเลท CW2 คือ *S. atratus* และไอโซเลท KS10 คือ *S. luteireticuli* การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจาก *S. morookaense* CW5 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยวิธี poisoned food technique พบว่า ทุกระดับความเข้มข้น (0.01-100 mg/ml) สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้ร้อยละ 24.67–100.00 โดยความเข้มข้น 10 mg/ml ยับยั้งได้สูงสุดร้อยละ 100.00 และให้ผลการยับยั้งเทียบเท่ากับ hexaconazole ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *S. morookaense* CW5 ที่คัดเลือกได้สามารถควบคุมเชื้อรา *G. boninense* อย่างมีประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการและเป็นแนวทางนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการพัฒนาเชื้อ *S. morookaense* มาใช้ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันที่เกิดจากเชื้อรา *G. boninense*

คำสำคัญ: เชื้อ *Streptomyces* sp. ปาล์มน้ำมัน โรคลำต้นเน่า การควบคุมทางชีวภาพ

Abstract

Basal stem rot disease in oil palm caused by *Ganoderma boninense* is now a threatening disease in oil palm cultivation in southern Thailand. The objective of this study was to isolate, screen, and investigate the antifungal potential of the crude extract

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร
Suratthani Oil Palm Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture

from the selected *Streptomyces* sp. for their antagonistic ability against *G. boninense*. The experiment was studied from October 2019 to September 2021. A total of 167 strains were obtained from 21 samples of oil palm rhizosphere soil in southern Thailand. All strains were tested for antagonistic properties against *G. boninense* using the dual culture test. The results exhibited that four strains (namely CW2, CW5, CW9, and KS1) achieved the highest activity at 100.00% followed by the strains KS10 gave the inhibitory activity at 93.52%. Furthermore, the strains CW5, CW9, and KS1 demonstrated the strongest inhibition (100.00%) from the dual culture test and exhibited greater activity in the culture filtrate test. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis indicated that the strains CW5, CW9, and KS1 were belonging to the *S. morookaense*. Whereas the strain CW2 was *S. atratus*, while the strain KS10 was *S. luteireticuli*. Crude ethyl acetate extract from *S. morookaense* CW5 were employed using the poisoned food technique. It was found that different concentrations (0.01-100 mg/ml) were able to inhibit *G. boninense* from 24.67–100.00%. Crude ethyl acetate extract at 10 mg/ml exhibited the highest activity at 100.00% as well as can be competed with hexaconazole (1 mg/ml). The results showed that the selected *S. morookaense* CW5 was able to effectively control *G. boninense in vitro* and may have potential as bio-fungicides in order to regulate the target spot of basal stem rot disease in the future. Moreover, this is the first study to develop *S. morookaense* for the biological control of basal stem rot disease in oil palm caused by *G. boninense*.

Keyword: *Streptomyces* sp., oil palm, basal stem rot disease, biological control

คำนำ

จากข้อมูลในช่วงต้นปี 2565 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 6.18 ล้านไร่ มีผลผลิตปาล์มน้ำมันประมาณ 17.59 ล้านตัน พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันและผลผลิตปาล์มน้ำมันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในปี 2564 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันและผลผลิตปาล์มน้ำมันประมาณ 6.06 ล้านไร่ และ 16.79 ล้านตัน ตามลำดับ พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่อยู่ทางภาคใต้คิดเป็นร้อยละ 86.00 ของพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั่วประเทศ ที่เหลือร้อยละ 14.00 กระจายอยู่ในภาคอื่น ๆ (คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลปริมาณการผลิตสินค้าเกษตร, 2565)

โรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* (*G. boninense*) ทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย (Yurnaliza et al., 2020) เมื่อเป็นโรครุนแรงปาล์มน้ำมันจะยืนต้นตาย พบการระบาดของโรคอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทางภาคใต้ของประเทศไทย ความเสียหายส่วนใหญ่พบในปาล์มน้ำมันอายุ 10 ปีขึ้นไป อย่างไรก็ตาม จากการลงพื้นที่สำรวจโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันพบว่า การระบาดของโรคมีแนวโน้มพบในปาล์มน้ำมันอายุน้อยลงเรื่อย ๆ สร้างความกังวลให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก สาเหตุดังกล่าวเนื่องจากการปลูกปาล์มน้ำมันแทนพื้นที่เดิมที่แปลงปลูกก่อนหน้านั้นเป็นปาล์มน้ำมันอายุมาก และมีการทิ้งตอปาล์มน้ำมันไว้ในแปลง ซึ่งเป็นการสร้างแหล่งสะสมเชื้อสาเหตุของโรคไว้ เชื้อรา *G. boninense* จัดเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน (soil-borne plant pathogen) สามารถแพร่ผ่านทางสปอร์ของเชื้อรา (basidiospores) หรือแพร่กระจายผ่านทางระบบ

ราก (Siddiqui et al., 2021) การพบดอกเห็ดบนต้นปาล์มน้ำมันแสดงว่าเส้นใยของเชื้อราได้เข้าไปทำลายท่อน้ำเลี้ยงภายในต้นปาล์มน้ำมันเป็นจำนวนมากแล้ว หลังจากนั้นต้นปาล์มน้ำมันจะยืนต้นตาย อาการดังกล่าวเป็นอาการระยะสุดท้ายของการเกิดโรคที่สามารถสังเกตได้ แต่การสังเกตอาการของโรคในระยะแรกก่อนพบดอกเห็ดนั้น ทำได้ยาก

การจัดการโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันโดยการใช้สารเคมี ให้ผลการยับยั้งหรือควบคุมการเกิดโรคไม่คงที่ เนื่องจากเชื้อรา *G. boninense* มีระยะพักตัวหลายระยะ และการแพร่กระจายเข้าทางระบบรากจากดินที่มีเชื้อรา *G. boninense* เป็นข้อจำกัดทำให้สารเคมียากต่อการเข้าถึง (Hushiarian et al., 2013) เมื่อพิจารณาพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้น้อย พบว่า ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *G. boninense* อาจถูกยับยั้งหรือขึ้นอยู่กับระบบทางชีววิทยาในบริเวณนั้น ๆ ดังนั้นการควบคุมเชื้อรา *G. boninense* โดยชีววิธีจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถควบคุมโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Streptomyces sp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* มีรายงานผลการยับยั้งในระดับห้องปฏิบัติการที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่น ๆ (Shariffah Muzaimah et al., 2020) เช่น *Pseudomonas putida* (Shui et al., 2021) *Burkholderia* spp. (Yurnaliza et al., 2020) *Trichoderma asperellum* (Muniroh et al., 2019) และ *Bacillus cereus* BKA 10 (Mardiah et al., 2018) อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในดินระหว่างตัวอย่างดินที่ได้จากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันที่เกิดและไม่เกิดโรคลำต้นเน่าด้วยเทคโนโลยี Next Generation Sequencing พบว่า จุลินทรีย์กลุ่มที่มีบทบาทในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ คือกลุ่มแอคติโนมัยสีท (Anothai and Chairin, 2022) โดยเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Streptomyces* sp. มากถึงร้อยละ 70.00 – 90.00

อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* และมีการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ทางการค้าส่วนใหญ่อยู่ในประเทศมาเลเซีย เนื่องจากได้ประสบปัญหาการระบาดของโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันมาก่อน แต่ชีวภัณฑ์ดังกล่าวพัฒนาให้ยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สายพันธุ์ที่แยกได้จากการระบาดภายในประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นพัฒนาการใช้ชีววิธีสำหรับควบคุมโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันที่เกิดขึ้นในประเทศไทย การแยกและคัดเลือก *Streptomyces* sp. ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันจึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ปากกาเคมี กระดาษบันทึก
2. สารเคมี ได้แก่ ethyl alcohol 75% dimethyl sulfoxide (DMSO) ethyl acetate
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) glucose yeast-extract malt-extract agar (GYMA) international *Streptomyces* project medium no. 2 (ISP2)
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้อบฆ่าเชื้อ เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินรอบต้นปาล์มน้ำมันจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ อายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป และไม่มีการแสดงอาการของโรคลำต้นเน่าในพื้นที่ต่าง ๆ ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา โดยขุดที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินต้นละ 2 จุด จุดละ 100 กรัม เก็บแปลงละ 3 จุด คลุกให้เข้ากัน จากนั้นผึ่งดินให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ก่อนนำไปแยกเชื้อ

2. การแยกเชื้อ *Streptomyces* sp.

ตัวอย่างดินที่ผึ่งจนแห้ง นำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. ด้วยวิธี soil dilution spread plate เริ่มจากชั่งตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัม ผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร และเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) หยดสารแขวนลอยดินที่ระดับการเจือจาง 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหาร glucose yeast-extract malt-extract agar (GYMA) (เติม nalidixic acid ปริมาตร 25 μg/ml และ cycloheximide ปริมาตร 50 μg/ml เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา) เกลี่ยดินแขวนลอยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เก็บโคโลนีของ *Streptomyces* sp. ที่มีลักษณะแตกต่างกัน เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพของ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* (Shariffah-Muzaimah et al., 2015)

3. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense*

นำแต่ละไอโซเลทของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* (*G. boninense* แยกและเก็บรวมรวบอยู่ในห้องปฏิบัติการโรคพืช ณ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี) ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อรา *G. boninense* บนอาหาร international *Streptomyces* project medium no. 2 (ISP2) เป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดแยกได้โดยการขีดเชื้อบนอาหาร ISP2 ในแนวตรงและห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบเชื้อรา *G. boninense* แล้วนำไปวางในจานอาหารเดียวกับเชื้อ *Streptomyces* sp. ในแนวตรงข้ามกับเชื้อ *Streptomyces* sp. และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเฉพาะเชื้อรา *G. boninense* (Shariffah-Muzaimah et al., 2015) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดของรัศมีเชื้อรา *G. boninense* ในชุดควบคุมและชุดทดสอบ นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาร้อยละการยับยั้ง (percent inhibition of radial growth; PIRG) จากร้อยละการยับยั้ง = $(R_1 - R_2)/R_1 \times 100$ โดย R_1 คือ รัศมีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม และR_2 คือ รัศมีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ (Lim et al., 2018) คัดเลือกไอโซเลท *Streptomyces* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense*

4. การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้

นำไอโซเลทของ *Streptomyces* sp. ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุด 5 อันดับแรกมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบผลกับ dual culture ซึ่งจะคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุดตรงกันทั้ง dual culture และการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ สำหรับการทดสอบด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากตัดเส้นใยของเชื้อ *Streptomyces* sp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง ISP2 นาน 7 วัน เติมในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่า 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนน้ำใสด้วยเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน นำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อผสมรวมกับอาหาร PDA ในอัตราส่วน 2:1 เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณรวม 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร) รอให้ผิวอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบเชื้อรา *G. boninense* ที่เลี้ยงไว้นาน 7 วัน แล้วนำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (positive control) ที่ผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในอาหาร PDA และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ที่ผสม cycloheximide ปริมาตร 50 μg/ml ในอาหาร PDA วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดรัศมีเชื้อรา *G. boninense* ของชุดควบคุมและชุดทดสอบ นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาร้อยละการยับยั้ง คัดเลือกไอโซเลทของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุด (Muniroh et al., 2019)

5. การจัดจำแนกชนิด *Streptomyces* sp. โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

จัดจำแนก *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้ในระดับชนิด (species) โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. แต่ละไอโซเลทด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของบริษัท QIAGEN (Bacteria Genomic DNA Kit) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' (Hamid et al., 2020) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, USA) แล้วนำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ the national center for biotechnology information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อจำแนกชนิดของ *Streptomyces* sp. และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปแกรม MEGA version 7.0

6. การสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense*

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดทั้งจากการทดสอบด้วย dual culture และทดสอบด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อ *Streptomyces* sp. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าที่ 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แยกเซลล์ *Streptomyces* sp. ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนของเหลวที่แยกได้สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แยกส่วนเอทิลอะซิเตทออก ทำซ้ำ 3 ครั้ง เลือกของเหลวชั้นบนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ที่ความดัน 45 mbar อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที (Lim et al., 2018) เก็บสารสกัดที่ได้ไว้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยวิธี poisoned food technique (Samarak and Tedsree, 2016) เริ่มจากละลายสารสกัดหยาบด้วย 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 0.01 0.1 1 และ 10 mg/ml จากนั้นเตรียมอาหาร PDA แล้วนำสารสกัดที่ระดับความเข่มข่นต่าง ๆ ผสมกับอาหาร PDA เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณรวม 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร) รอให้ผิวอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบเชื้อรา *G. boninense* ที่เลี้ยงไว้ 7 วัน แล้วนำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (positive control) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและ10%DMSO และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ที่ผสม hexaconazole ความเข้มข้น 1 mg/ml ในอาหาร PDA วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดของรัศมีเชื้อรา *G. boninense* ของชุดทดสอบและชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาร้อยละการยับยั้ง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2562 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2564

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการโรคพืช ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินรอบต้นปาล์มน้ำมันในพื้นที่ต่าง ๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทยพบว่า ได้ตัวอย่างดินในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันสำหรับใช้ในการแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 21 ตัวอย่าง (Table 1)

Table 1 Sampling locations, number of soil samples, and number of isolated *Streptomyces* sp. and order of isolates

Sampling locations	Number of soil samples	Number of isolated *Streptomyces* sp.	Isolate codes
Nakhon Si Thammarat			
Pak Phanang	1	9	PN1-PN9
Thung Song	1	6	TG1-TG6
Chawang	1	11	CW1-CW11
Surat Thani			
Mueang Surat	1	4	MS1-MS4
Kanchanadit	2	15	KD1-KD15
Phrasaeng	1	11	PS1-PS11
Krabi			
Klong Thom	2	13	KT1-KT13
Plai Phraya	1	9	PY1-PY9
Khao Phanom	1	6	KN1-KN6
Chumphon			
Tha Sae	1	8	TS1-TS8

Trang			
Mueang Trang	1	10	MT1-MT10
Huai Yot	1	7	HY1-HY7
Ratsada	1	8	RD1-RD8
Phatthalung			
Mueang Phatthalung	1	10	MP1-MP10
Khao Chaison	1	11	KS1-KS11
Pa Bon	1	7	PB1-PB7
Songkhla			
Rattaphum	1	9	RP1-RP9
Hat Yai	1	5	HD1-HD5
Khlong Hoi Khong	1	8	KK1-KK8
Total	21	167	

2. การแยกเชื้อ *Streptomyces* sp.

ตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่จำนวน 21 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. พบว่า ได้เชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 167 ไอโซเลทที่มีความหลากหลาย โคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. มีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ สีขาว เทา น้ำตาล ส้ม เหลือง และดำ แตกต่างกัน นอกจากนี้บางไอโซเลทสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น น้ำตาล ดำ และเหลือง การพบ *Streptomyces* sp. ในทุกตัวอย่างดินที่นำมาแยกเชื้อ และได้เชื้อที่มีความหลากหลายเนื่องจาก *Streptomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในระบบนิเวศในฐานะผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ อีกทั้งสปอร์ที่ *Streptomyces* sp. สร้างขึ้นมีความทนทานสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

3. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense*

จากการนำไอโซเลทของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดิน ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* พบว่า การยับยั้งที่ได้จาก 167 ไอโซเลทอยู่ในช่วงร้อยละ 10.20 – 100.00 จำนวน 50 ไอโซเลท ให้ผลการยับยั้งต่ำกว่าร้อยละ 50.00 จำนวน 110 ไอโซเลทให้ผลการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 50.00 – 80.00 และจำนวน 7 ไอโซเลทให้ผลการยับยั้งมากกว่าร้อยละ 80.00 ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุด 4 ไอโซเลท (CW2 CW5 CW9 และ KS1) มีค่าการยับยั้งร้อยละ 100.00 และไอโซเลท KS10 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 93.52

ไอโซเลท CW2 CW5 CW9 และ KS1 ที่แยกได้พบว่า มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยวิธีการทางชีวภาพที่มีรายงานก่อนหน้านี้ งานวิจัยของ Irma *et al*. (2018) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ร้อยละ 75.00 ในขณะที่ Mardiah (2018) คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (anti-fungal activity) โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และผลปาล์มน้ำมัน ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อ *Bacillus cereus* BKA 10 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุด และมีความสามารถในการยับยั้งร้อยละ 62.22 งานวิจัยของ Muniroh *et al*. (2019) ใช้ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Trichoderma asperellum* ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* พบว่า ให้ค่าการยับยั้ง

เชื้อรา *G. boninense* ร้อยละ 71.42 และ 76.85 ตามลำดับ Yurnaliza *et al*. (2020) แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *G. boninense* โดยแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินในแปลงปาล์มน้ำมันจากประเทศอินโดนีเซีย ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้คือ *Burkholderia* spp. และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ร้อยละ 55.00 Shui *et al*. (2021) คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ protease และ glucanase ซึ่งสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับควบคุมเชื้อรา *G. boninense* โดยแยกเชื้อจากดินบริเวณแปลงปาล์มน้ำมันในประเทศมาเลเซีย ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยวิธี dual culture พบว่า *Pseudomonas putida* นอกจากสามารถผลิตเอนไซม์ protease และ glucanase แล้วยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ร้อยละ 86.30

4. การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้

การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* จากไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุด 5 อันดับแรกด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อพบว่า ไอโซเลท CW5 CW9 KS1 และ KS10 สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* โดยให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 100.00 เชื้อรา *G. boninense* ไม่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อจากไอโซเลท CW5 CW9 KS1 และ KS10 ตั้งแต่วันที่ 1 ของการวางเชื้อราทดสอบ ส่วนน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท CW2 ให้ค่าการยับยั้งรองลงมาคือร้อยละ 69.23 (Table 2, Figure 1) โดยไอโซเลท CW5 CW9 KS1 และ KS10 ให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่าการใช้ cycloheximide (50 μg/ml) ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา โดยให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 93.76 ในส่วนของการทดสอบ dual culture พบว่า ไอโซเลท CW2 CW5 CW9 และ KS1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* โดยให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 100.00 ส่วนไอโซเลท KS10 ให้ค่าการยับยั้งรองลงมาคือร้อยละ 84.42 (Table 2, Figure 2) อย่างไรก็ตาม ไอโซเลท CW2 ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ร้อยละ 100.00 เมื่อทดสอบด้วย dual culture แต่ให้ผลการยับยั้งที่ลดลงเหลือร้อยละ 69.23 เมื่อทดสอบโดยการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Shariffah-Muzaimah *et al*. (2015); Jung *et al*. (2018) ที่รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เมื่อใช้ในรูปแบบต่างกัน ให้ผลการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปแบบเหลวและแข็งส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน จากผลการทดลอง ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุดตรงกันทั้ง dual culture และการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อคือ ไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 จึงถือได้ว่าทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพต่อการควบคุมเชื้อรา *G. boninense*

Table 2 Antagonistic activity of the five *Streptomyces* strains against *G. boninense in vitro*

Isolates	Dual culture test (%)	Culture filtrate test (%)
CW2	100.00±0[a]	69.23±1.04[c]
CW5	100.00±0[a]	100.00±0[a]
CW9	100.00±0[a]	100.00±0[a]
KS1	100.00±0[a]	100.00±0[a]
KS10	84.42±1.22[b]	100.00±0[a]
Cycloheximide (50 μg/mL)	-	93.76±0.5[b]

* Means followed by different letters in the same column are significantly different at P<0.05 by DMRT

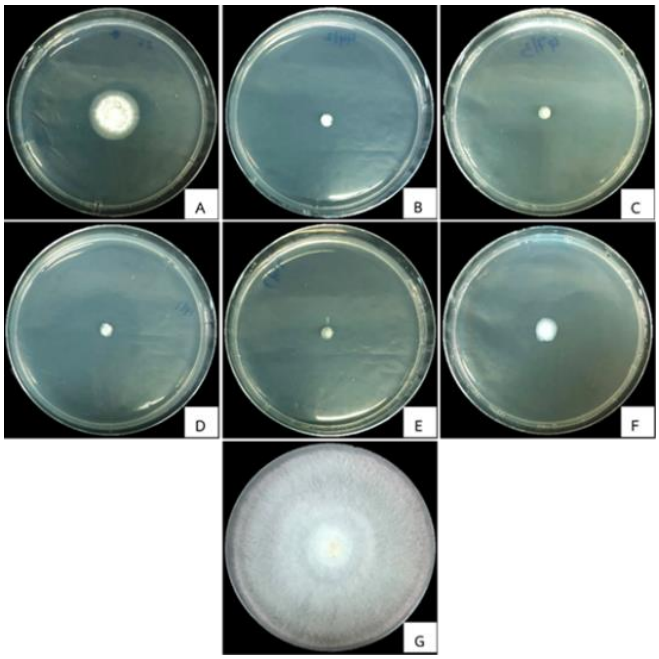

Figure 1 Inhibition of *G. boninense* in the culture filtrate test after 9 days of incubation with the selected *Streptomyces* strains. Strain CW2 (A); strain CW5 (B); strain CW9 (C); strain KS1 (D); strain KS10 (E); *G. boninense* colony with cycloheximide (50 μg/mL (F), and *G. boninense* colony in control plate (G).

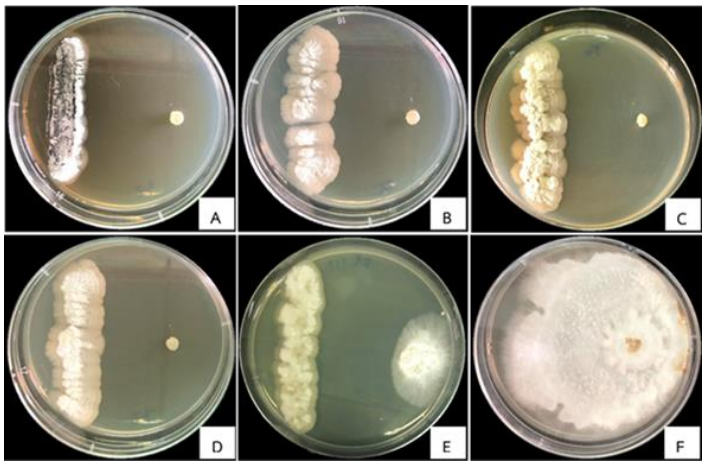

Figure 2 Inhibition of *G. boninense* in the dual culture test after 9 days of incubation with the selected *Streptomyces* strains. Strain CW2 (A); strain CW5 (B); strain CW9 (C); strain KS1 (D); strain KS10 (E), and *G. boninense* colony on control plate (F).

5. การจัดจำแนกชนิด *Streptomyces* sp. โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (1450 bp) ทั้ง 5 ไอโซเลท แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 มีความเหมือนกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ NR112529 ในฐานข้อมูล GenBank ร้อยละ 99.86

99.93 และ 99.93 ตามลำดับ ไอโซเลท CW2 มีความเหมือนกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ NR043490 ในฐานข้อมูล GenBank ร้อยละ 99.45 และไอโซเลท KS10 มีความเหมือนกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ HQ650809 ในฐานข้อมูล GenBank ร้อยละ 99.39 (Table 3) เมื่อนำข้อมูลลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้าง phylogenetic tree แบบ neighbor-joining แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทั้ง 5 ไอโซเลทพบว่า ไอโซเลท CW2 และ KS10 มีความสัมพันธ์ต่างกับไอโซเลทอื่น ๆ อย่างชัดเจน โดยไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 คือ *S. morookaense* ไอโซเลท KS10 คือ *S. luteireticuli* และไอโซเลท CW2 คือ *S. atratus* (Figure 3)

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* โดยใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อพบว่า มี 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สูงสุดตรงกันทั้ง dual culture และการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อโดยให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 100 จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 ที่ได้จากการตรวจสอบการเจริญบนอาหารแข็ง ISP2 และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA พบว่า ไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 คือ *S. morookaense* โดยไอโซเลท CW5 และ CW9 มาจากแหล่งเดียวกันคืออำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนไอโซเลท KS1 คัดแยกมาจากดินในพื้นที่อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงไอโซเลท CW5 CW9 และ KS1 ในระยะเวลาสั้น ๆ พบว่า ไอโซเลท CW5 เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีการผลิตตัวเซลล์ได้สูงกว่าไอโซเลท CW9 และ KS1 ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลท CW5 (*S. morookaense* CW5) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Table 3 Identification of the selected *Streptomyces* strains based on 16S rRNA sequence analysis

Strains	Length (bp)	Similarity Rate (% Identities)	Species
CW2	1487	99.45	*Streptomyces atratus*
CW5	1477	99.86	*Streptomyces morookaense*
CW9	1477	99.93	*Streptomyces morookaense*
KS1	1477	99.93	*Streptomyces morookaense*
KS10	1531	99.39	*Streptomyces luteireticuli*

Figure 3 Phylogenetic relationships of the five *Streptomyces* strains based on 16S rRNA gene sequence analysis. The branching pattern was constructed by the neighbor-joining method. The number at each node refers to the bootstrap support value (%) based on 1000 replicates (greater than 50% are shown). The scale bar indicates 0.01 nucleotide substitutions per nucleotide position.

6. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจาก *S. morookaense* CW5 ทุกระดับความเข้มข้น (0.01 - 100 mg/ml) สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* โดยระดับการยับยั้งเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ และที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/ml พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้ร้อยละ 100.00 นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/ml สารสกัดหยาบจาก *S. morookaense* CW5 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี hexaconazole ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้ร้อยละ 100.00 เช่นกัน (Table 4, Figure 4) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Sujarit *et al*. (2020) ซึ่งสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *S. palmae* CMU-AB204^{T} เพื่อใช้ยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้แก่ สาร actinopyrone A สาร anguinomycin A และสาร leptomycin A และ Nur Azura *et al*. (2016) รายงานว่าแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม *Streptomyces* สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายประเภท และสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้แก่ สาร cycloheximide และสาร actiphenol Shariffah-Muzaimah *et al*. (2015) รายงานว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* sp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* ได้แก่ สาร tradimefon สาร triadimenol สาร carboxin สาร benomyl สาร hexaconazole และสาร cyproconazole นอกจากนี้ Lim *et al*. (2018) สกัดสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. A19 โดยใช้เอทิลอะซิเตทพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ได้ร้อยละ 90.59 อย่างไรก็ตาม ผล

การยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ที่ได้จาก Lim *et al*. (2018) ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่น้อยกว่าแต่ให้ผลการยับยั้งที่สูงกว่า อาจเป็นเพราะการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันก่อนนำเชื้อมาสกัดสารสกัดหยาบ โดย *Streptomyces* sp. A19 เลี้ยงในอาหาร mannitol peptone broth ในขณะที่ *S. morookaense* CW5 เลี้ยงในอาหาร ISP2 ซึ่งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน ส่งผลให้เชื้อ *Streptomyces* sp. ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากน้อยต่างกัน โดยมีรายงานว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหาร mannitol peptone broth ที่มี mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนช่วยส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้น (Islam et al., 2012)

จากรายงานของ Yang *et al*. (2020) พบว่า *S. morookaense* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ สาร fasamycin-type polyketides สาร streptovertimycins A-H ซึ่งจัดเป็นสารออกฤทธิ์กลุ่ม aromatic polyketide ที่หายาก จากรายงานของ Dos Reis *et al*. (2019) พบว่า *S. morookaense* มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ สาร alkaloids สาร streptoverticillin สาร streptoverticillinone รายงานของ Feng *et al*. (2007) พบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญอีกตัวของ *S. morookaense* คือ สาร gloeosporiocide โดยสารดังกล่าวมีองค์ประกอบของเปปไทด์ลักษณะเป็นวง (cyclic peptide) ข้อดีคือสารประกอบชนิดนี้มีความเสถียรในการจับกับกลุ่มเป้าหมายและมีความแข็งแรงมากกว่าสารที่อยู่ในรูปแบบเชิงเส้น (linear peptide) และยังมีความทนทานต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ protease โดยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เชื้อ *S. morookaense* มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ได้ดีกว่าในระดับแปลงทดสอบ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *S. morookaense* สามารถใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้เป็นอย่างดี (Zhu et al., 2021; Andargie and Li, 2019)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ *S. morookaense* ในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ *S. morookaense* ที่คัดแยกได้ต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน ซึ่งในอนาคตอาจพัฒนาเชื้อดังกล่าวเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันต่อไป

Table 4 Mycelial inhibition of each different concentration of crude ethyl acetate extract from *S. morookaense* CW5

Concentrations	Mycelial inhibition of *G. boninense* (%)
Sterile distilled water	0.00±0.00[a]
Hexaconazole 1 mg/ml	100.00±0.00[b]
Crude extract 100 mg/ml	100.00±0.00[b]
Crude extract 10 mg/ml	100.00±0.00[b]
Crude extract 1 mg/ml	73.87±0.66[c]
Crude extract 0.1 mg/ml	39.33±0.32[d]
Crude extract 0.01 mg/ml	24.67±0.21[e]
10% DMSO	0.00±0.00[a]

* Means followed by different letters in the same column are significantly different at P<0.05 by DMRT

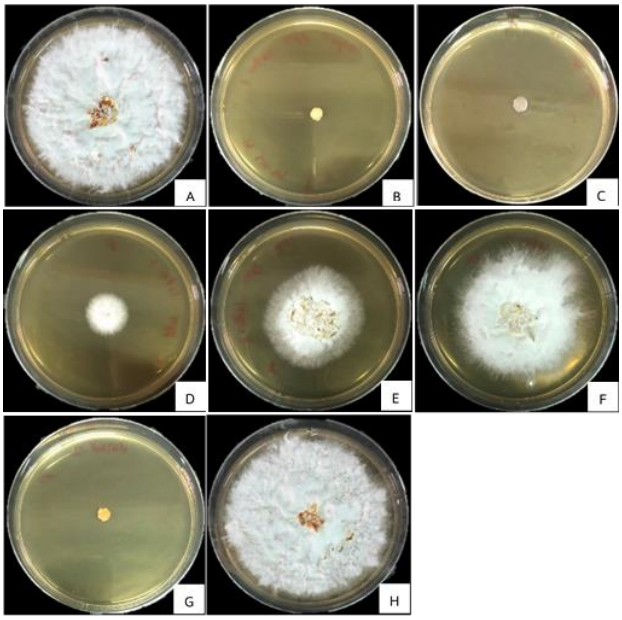

Figure 4 Mycelial growth of *G. boninense* on plates containing various crude extract concentrations of *S. morookaense* CW5 after 9 days of incubation. Sterile distilled water (A); crude extract 100 mg/ml (B); crude extract 10 mg/ml (C); crude extract 1 mg/ml (D); crude extract 0.1 mg/ml (E); crude extract 0.01 mg/ml (F); hexaconazole 1 mg/ml (G), and 10%DMSO (H).

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *S. morookaense* CW5 ที่แยกและคัดเลือกได้จากดินรอบลำต้นปาล์มน้ำมันในอำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช สามารถใช้ยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้หลายรูปแบบ เช่น การใช้ตัวเซลล์ น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ และสารสกัดหยาบ โดยยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *S. morookaense* CW5 จำเป็นต้องศึกษาหาชนิดของสาร ซึ่งอาจเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ที่นำไปสู่การใช้ประโยชน์ได้หลากหลายมากขึ้น

การนำไปใช้ประโยชน์

กรมวิชาการเกษตรมีการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชโดยใช้ชีวภัณฑ์ จนได้ชีวภัณฑ์หลายชนิดที่สามารถควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีการขยายผลสู่หน่วยงานในภูมิภาค ให้เกษตรกรนำไปใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง แต่สำหรับโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันที่กำลังระบาดในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทางภาคใต้ของประเทศไทยนั้น ยังไม่มีชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคดังกล่าว

งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน เพื่อที่จะพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ และนำมาใช้ประโยชน์ในพื้นที่ระบาดของโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน เชื้อ *S. morookaense* CW5 ที่คัดเลือกได้ จึงเป็นขั้นตอนแรกที่จะนำไปสู่การพัฒนาชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตรต่อไป ซึ่งเป็นการตอบสนองนโยบายรัฐบาลในการขับเคลื่อนการผลิตพืชโดยใช้เทคโนโลยีที่มีความปลอดภัยทั้งต่อเกษตรกร ผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลปริมาณการผลิตสินค้าเกษตร. 2565. ผลพยากรณ์ผลผลิตปาล์มน้ำมัน ปี 2565. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/.../files/forecast/situation/8S_PL.pdf สืบค้นเมื่อ: 6 พฤษภาคม 2565.

Anothai, J. and T. Chairin. 2022. Analysis of rhizobacterial community associated with the occurrence of Ganoderma basal stem rot disease in oil palm by Illumina next-generation sequencing. Arch. Microbiol. 31: 1-10.

Andargie, M. and J. Li. 2019. Antifungal activity against plant pathogens by compounds from *Streptoverticillium morookaense*. Plant Pathol. 101: 547-558.

Dos Reis, G.V., W.R. Abraham., D.F. Grigoletto., J.B. De Campos., J. Marcon., J.A. Da Silva., M.C. Quecine., J.L. De Azevedo., A.G. Ferreira and S.P. De Lira. 2019. Gloeosporiocide, a new antifungal cyclic peptide from *Streptomyces morookaense* AM25 isolated from the Amazon bulk soil. FEMS Microbiol. Lett. 366: 1-25.

Feng, N., W. Ye., P. Wu., Y. Huang., H. Xie and X. Wei. 2007. Two new antifungal alkaloids produced by *Streptoverticillium morookaense*. J. Antibiot. 60: 179-183.

Hamid, M.E., A. Mahgoub., A.J.O. Babiker., H.A.E. Babiker., M.A.I. Holie., M.M. Elhassan and M.R.P. Joseph. 2020. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from desert and savanna soils in Sudan. Int. J. Environ. Res. Public Health. 17: 1-10.

Hushiarian, R., N. Yusof and S. Dutse. 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. SpringerPlus. 2: 1-12.

Irma, A., A. Meryandini and B. Rupaedah. 2018. Biofungicide producing bacteria: an *in vitro* inhibitor of *Ganoderma boninense*. HAYATI J. Biosci. 25: 151-159.

Islam, M.R., Y.T. Jeong., Y.S. Lee and C.H. Song. 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. Mycobiology. 40: 59-65.

Jung, S.J., N.K. Kim., D.H. Lee., S.I. Hong and J.K. Lee. 2018. Screening and evaluation of *Streptomyces* species as a potential biocontrol agent against a wood decay fungus, *Gloeophyllum trabeum*. Mycobiology. 46: 138-146.

Lim, P.H., J.A. Gansau and K.P. Chong. 2018. *Streptomyces* spp. a potential biocontrol agent against *Ganoderma boninense* of basal stem rot. J. Oil Palm Res. 30: 265-275.

Mardiah, I. 2018. Identification of endophytic bacterial isolated from oil palm plants with antifungal activity against *Ganoderma boninense*. PCPR. 3: 41-49.

Muniroh, M.S., S.A. Nusaibah., G. Vadamalai and Y. Siddique. 2019. Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. Curr. Plant Biol. 20: 1-9.

Nur Azura, A.B., M. Yusoff., G.Y.A. Tan., R. Jegadeesh., D.R. Appleton and S. Vikineswary. 2016. *Streptomyces sanglieri* which colonised and enhanced the growth of *Elaeis guineensis* Jacq. seedlings was antagonistic to *Ganoderma boninense* in *in vitro* studies. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 43: 485-493.

Samarak, N. and N. Tedsree. 2016. Antifungal activity of local medicinal plant extracts in Chanthaburi province against phytopathogenic fungi *Fusarium* sp. Songklanakarin J. Pl. Sci. 3: 112-117.

Shariffah-Muzaimah, S.A., A.S. Idris., A.Z. Madihah., O. Dzolkhifli., S. Kamaruzzaman and P.C.H. Cheong. 2015. Isolation of actinomycetes from rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) for antagonism against *Ganoderma boninense*. J. Oil Palm Res. 27: 19-29.

Shariffah-Muzaimah, S.A., A.S. Idris., R. Nur-Rashyeda., Y. Naidu., N.H. ZainolHilmi and K. Norman. 2020. Impact of pre-inoculating soil with *Streptomyces* sp. GanoSA1 on oil palm growth and *Ganoderma* disease development. Biocatal. Agric. Biotechnol. 29: 1-10.

Shui, W.S., I.B. Musa., K. Yong., K.L.W. Sin and P.M. Nissom. 2021. Evaluation of mycolytic enzymes producing bacteria and their potentials as biocontrol agents against *Ganoderma boninense*. BJRST. 3: 51-60.

Siddiqui, Y., A. Surendran., R.R.M. Paterson., A. Ali and K. Ahmad. 2021. Current strategies and perspectives in detection and control of basal stem rot of oil palm. Saudi J. Biol. Sci. 28: 2840-2849.

Sujarit, K., W. Pathom-aree., M. Mori., K. Dobashi., K. Shiomi and S. Lumyong. 2020. *Streptomyces palmae* CMU-AB204^{T}, an antifungal producing-actinomycete, as a potential biocontrol agent to protect palm oil producing trees from basal stem rot disease fungus, *Ganoderma boninense*. Biol. Control. 148: 1-12.

Yang, L., X. Li., P. Wu., J. Xue., L. Xu., H. Li and X. Wei. 2020. Streptovertimycins A-H, new fasamycin-type antibiotics produced by a soil-derived *Streptomyces morookaense* strain. J. Antibiot. 73: 283-289.

Yurnaliza, Y., D.I. Rambe., L. Sarimunggu., M. Purba., I. Nurwahyuni., S. Lenny., A. Lutfia and A. Hartanto. 2020. Screening of *Burkholderia* spp. from oil palm plantation with antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. Biodiversitas. 21: 3431-3437.

Zhu, Z., Z. Tian and J. Li. 2021. A *Streptomyces morookaensis* strain promotes plant growth and suppresses Fusarium wilt of banana. Trop. Plant Pathol. 46: 175-185.