บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

พืชตระกูลส้ม (Rutaceae) มีสมาชิก จำนวน 130 สกุล และมีมากถึง 1,500 ชนิด (จตุพร และคณะ, 2541) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย และพม่า (Tolkowsky, 1938) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่สามารถยืนยันแหล่งกำเนิดที่แท้จริงของส้ม (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

การผลิตต้นส้มในปัจจุบัน เกษตรกรให้ความสำคัญในการคัดเลือกพันธุ์ของต้นตอที่มีความเหมาะส้มกับกิ่งพันธุ์ดีเป็นอย่างมาก เนื่องจากต้นตอส้มเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพการผลิตส้มกล่าวคือ ต้นตอส้มจะมีอิทธิพลต่อความทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ความแข็งแรงของต้นส้ม ความต้านทานต่อโรค ความเข้ากันได้ของต้นตอกับยอดพันธุ์ดี การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารและน้ำ ระบบราก ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อผลผลิต และคุณภาพของผลส้ม (เปรมปรี, 2544)

ต้นตอส้ม (Citrus rootstock)

คลีโอพัตรา (Cleopatra mandarin: *Citrus reticulata*) เป็นต้นตอที่ให้ต้นใหญ่ ผลขนาดเล็ก คุณภาพสูง โตช้า ในระยะแรก เหมาะที่จะใช้กับ แทงการีน แทงเจลโล่ ออเรนจ์ และเกรฟฟรุต ได้ผลดี กับสภาพดินเหนียว (Wutcher, 1989) ทนทานต่อโรคทริสเตซ่าไวรัส และ เอ็กโซคอร์ติสไวรอยด์ ทนทานต่อเกลือและสภาพหนาวเย็นได้ดี แต่อ่อนแอต่อโรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica* (Castle, 1987) และไส้เดือนฝอย *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. (citrus nematode) (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996)

ส้มสามใบ (Triforiate orange: *Poncirus trifoliata*) เป็นต้นตอที่ให้ทรงพุ่มขนาดเล็ก ทำให้ปลูกชิดได้ ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง ทนทานต่อโรคทริสเตซ่าไวรัส ทนทานต่อเกลือและความเป็นด่างสูงได้ดี ไม่ทนแล้ง อ่อนแอต่อโรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และเอ็กโซคอร์ติสไวรอยด์ (Wutcher, 1989) และอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (Civerolo, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทรอยเยอร์ (Troyer citrange: *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) เป็นต้นตอที่ให้ขนาดมาตรฐาน ผลผลิตสูง ผลใหญ่และคุณภาพดี ทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และทริสเตซ่าไวรัส แต่ไม่ทนต่อโรคกรีนนิ่ง อ่อนแอต่อ เอ็กโซคอร์ติสไวรอยด์ ไม่ทนเค็ม ทนหนาวได้ปานกลาง เหมาะที่จะใช้กับส้มพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (Wutcher, 1989) อ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (Civerolo, 1984)

ต้นตอที่เกษตรกรผู้ปลูกส้มในประเทศไทยมีความต้องการและเหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการผลิตกล้าส้ม คือ ต้นตอส้มทรอยเยอร์ ซึ่งสามารถให้ผลผลิตและคุณภาพสูงอีกทั้งยังทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าได้ดี (เปรมปรี, 2544) อย่างไรก็ตาม พันธุ์ส้มที่ใช้เป็นต้นตอนั้นส่วนใหญ่มักไม่ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกส้มหลายประเทศทั่วโลกได้รับผลกระทบและสร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก (Gottig *et al*., 2010)

โรคแคงเกอร์ (Citrus Canker)

โรคแคงเกอร์เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) (Vauterin *et al.,* 1995)โดยเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้ทั้งบนใบ กิ่งก้าน ลำต้น และผลของพืชตระกูลส้มได้

ลักษณะอาการ เริ่มแรกเป็นจุดกลมขนาดเท่าหัวเข็มหมุด ใส และฉ่ำน้ำ จุดแผลจะขยายขนาดใหญ่ มีลักษณะฟูคล้ายฟองน้ำ และมีสีเหลืองอ่อน ระยะต่อมาจะนูนขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม แตกเป็นสะเก็ดแข็งและขรุขระ กลางแผลมีรอยบุ๋ม และมีวงแหวนสีเหลืองซีด (halo) ล้อมรอบแผล (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

ลักษณะอาการบนกิ่งก้าน

เมื่อเชื้อทำลายกิ่งอ่อนเริ่มแรกเกิดจุดสีเหลืองนูน ฟูบนเปลือกของกิ่งก้าน ต่อมาแผลจะแตกแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาล แล้วลุกลามขยายออกไปตามความยาว หรือรอบกิ่งจนกลายเป็นปุ่มหรือปมขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน และไม่มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล ถ้าเป็นโรครุนแรงจะทำให้ต้นแคระแกร็น กิ่งก้านแห้งตาย และทรุดโทรมอาจถึงตายได้ (อำไพวรรณ และคณะ, 2527; อำไพวรรณ และคณะ, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะอาการบนผล

เกิดจุดแผลฝังลึกลงไปในผิวผลอ่อน แผลนูนคล้ายฟองน้ำ มีสีเหลืองเข้ม ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแตกสะเก็ด มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล ทำให้เกิดการปริแตกตามรอยแผลของโรคแคงเกอร์ เชื้อสาเหตุ สามารถเข้าทางปากใบ หรือบาดแผลได้ง่าย (จุมพล, ไม่ระบุปีที่ตีพิมพ์; อำไพวรรณ และคณะ, 2527; อำไพวรรณ และคณะ, 2542)

การแพร่กระจายของเชื้อ

เชื้อสามารถแพร่กระจายโดยน้ำฝนหรือน้ำค้าง มีแมลงเป็นพาหะนำเชื้อซึ่งมีอยู่มากในแผลของพืชที่เป็นโรคแพร่กระจายไปยังต้นอื่น หรือกิ่งอื่น แมลงบางชนิดเช่น หนอนชอนใบส้ม *Phyllocnistis citrella* และ *Throscoryssa citri* ทำให้เกิดแผลขึ้นบนใบพืชซึ่งทำให้เชื้อเข้าทำลายพืชได้ง่าย เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จะมีชีวิตอยู่บนต้นพืชได้เป็นเวลานาน โดยแบคทีเรียสามรถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามบาดแผลบนใบ ลำต้นและผล และสามารถฟักตัวและดำรงชีวิตแบบ weak saprophyte อยู่ในดินได้เป็นเวลานาน (PaDIL, 2010) ดังนั้นโรคนี้จะระบาดรุนแรงเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม คือ สภาพอากาศร้อนชื้น ในช่วงเดือน พฤษภาคม จนถึง เดือน ตุลาคม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการระบาดจะอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส จนถึง อุณหภูมิสูง 35-39 องศาเซลเซียส (จุมพล, ไม่ระบุปีที่ตีพิมพ์; อำไพวรรณ และคณะ, 2542 ; Goto,1992)

ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (PaDIL, 2010)

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* จัดอยู่ใน

Kingdom: Bacteria

Phylum/Division: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Xanthomonadales

Family: Xanthomonadaceae

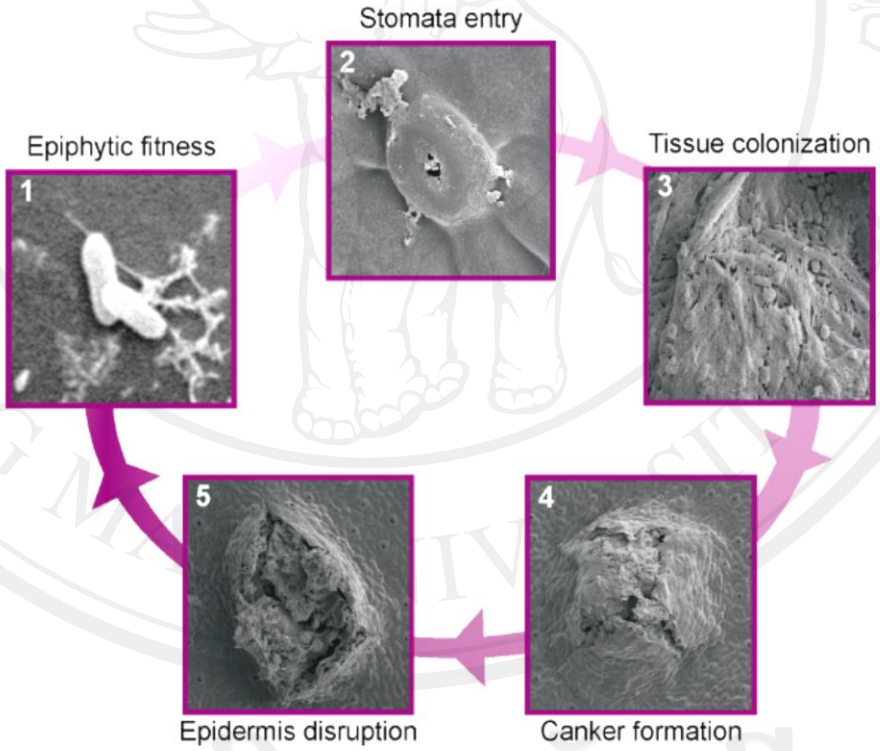
Genus: *Xanthomonas*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) เซลล์เดียว มีลักษณะเป็นท่อน (rod shape) ขนาด 0.5-0.75 x 1.5-2.0 ไมโครเมตร เป็นพวกที่มี flagellum อันเดียวออกมาจากขั้วด้านเดียว (polar flagella) โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองเป็นมัน ขอบเรียบนูน เหนียว เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Chand and Pal, 1982; Goto, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงจรการเกิดโรคแคงเกอร์ของเชื้อ แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

วงจรการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในส้ม เริ่มจากเซลล์แบคทีเรียตกลงบนผิวพืชอาศัย แล้วเข้าไปในเซลล์ทางบาดแผล ปากใบ และ/หรือรูเปิดธรรมชาติ เพิ่มปริมาณและอาศัย apoplast อยู่ภายในเซลล์พืช พืชแสดงอาการของโรคแคงเกอร์โดยเกิดแผลมีลักษณะเป็นจุดวงกลม จากนั้นจุดวงกลมจะเริ่มมีขนาดใหญ่ นูน และมีสีเข้ม เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชักนำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนและมีขนาดใหญ่ขึ้น (hyperplasia) ต่อไปแผลจุดวงกลมขนาดใหญ่เหล่านั้นจะเริ่มแตกออก และปลดปล่อยเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ออกมาและเข้าทำลายพืชอาศัยต้นต่อไป โดยแพร่ระบาดไปกับ ลม ฝน และแมลง (Gottig *et al.,* 2010) ดังแสดงไว้ในภาพ 1



ภาพ 1 วงจรการเกิดโรคแคงเกอร์ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (Gotting *et al.,* 2010)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (Stall and Seymour, 1983)

จากลักษณะของภูมิศาสตร์ที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อและทางด้านการแพร่ระบาดในสถานที่ต่างๆ (geographic distribution) พืชอาศัย (host range) สามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ออกได้เป็น 5 กลุ่ม

1. CBCD-A (citrus bacterial canker disease-A) เป็นพวก Asiatic canker หรือ canker A หรือ common form เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุด (Schubert *et al.*, 2001) พบระบาดในเอเชีย แอฟริกา หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิค (oceania) และในอเมริกาใต้ เชื้อสาเหตุของโรคในกลุ่มนี้จะเป็นพวกที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด

2. CBCD-B (concrosis B, canker B หรือ flase canker) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคแคงเกอร์กับพวกมะนาวหวาน (lemon) ในประเทศอาร์เจนตินา ในปี 1923 (Schubert *et al.*, 2001) ต่อมามีการแพร่ระบาดมายังประเทศใกล้เคียงได้แก่ ประเทศอุรุกวัยและปรากวัย เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเข้าทำลาย มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเปรี้ยว และส้มโอ ได้ ปัจจุบันเชื้อสาเหตุชนิดนี้ถูกจำแนกเป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (Hasse)(Vauterin *et al.,* 1995)

3. CBCD-C (maxican lime concrosis) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบก่อโรคเฉพาะมะนาว [lime: C. *aurantifolia* (christm)] Swigh “Mexican” ในประเทศบราซิลในปี 1963 (Schoulties *et al*., 1987) และพบเฉพาะในประเทศบราซิลเท่านั้น ปัจจุบันเชื้อถูกจำแนกเป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* เช่นเดียวกับ canker B (Vauterin *et al.,* 1995)

4. CBCD-D (mexican bacteriasis) พบในปี 1987 โดย Schoulties *et al*. (1987) ได้พบโรคของ Maxican lime ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุแคงเกอร์แต่พบในเมืองโกลิมา ประเทศเม็กซิโก พืชที่เป็นโรคมีการเกิดแผลลักษณะแคงเกอร์บนใบและกิ่ง ไม่พบบนผล ปัจจุบันสันนิษฐานเชื้อสาเหตุโรคคือเชื้อรา *Alternaria limicola* (Schubert *et al.*, 2001)

5. CBCD-E (citrus bacterial spot) พบในปี 1984 ซึ่งได้เกิดการแพร่ระบาดของโรคแคงเกอร์ในฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยลักษณะอาการของโรคไม่เหมือนโรคแคงเกอร์โดยทั่วๆ ไป คือพบในต้นกล้าส้ม (nursery form of citrus canker) จากการศึกษา พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อโรคแคงเกอร์กลุ่มต่างๆ กับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *X. campestris* pv. *alfalfae* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มใหม่ (Schoulties *et al*., 1987) ปัจจุบันได้ตั้งชื่อใหม่คือ *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Graham and Goottwald , 1991)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microbe) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ทั้งพืชบกและพืชน้ำอาจอยู่ในส่วนราก ลำต้น กิ่ง หรือใบ ของพืชในช่วงหนึ่งของการใช้ชีวิตอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ไม่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชอาศัย จุลินทรีย์เอนโดไฟต์มีทั้งเชื้อราเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ สามารถใช้ชีวิตร่วมกับพืชได้หลายรูปแบบ เช่น การอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน (mutualism) เป็นกลาง (neutral) หรือ เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค (antagonistic pathogen) ดังนั้นเอนโดไฟต์จึงสามารถเป็นตัวควบคุมโรคทางชีวภาพ และเป็นแหล่งผลิต metabolite สำหรับใช้ในทางการแพทย์ ป้องกันโรคให้กับพืชอาศัย ตลอดจนเป็นต้นแบบในการศึกษาความสัมพันธ์ต่างๆ ในธรรมชาติ แต่จุลินทรีย์เอนโดไฟต์บางชนิดก็เป็นสาเหตุของโรคพืช บางชนิดนอกจากผลิตสารปฐมภูมิ (primary metabolite) แล้วยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่มของสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ต้านเชื้อรา (antifungal) และต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) (Brunner and Pertrini, 1992; Bacon and White, 2000

แอกติโนไมซีสต์

แอกติโนไมซีสต์ (Actinomycete) เป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียว และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีขนาดเล็ก คือ มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ชนิดแข็ง โดยสร้างเส้นใยที่เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และ เส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) โดย substrate mycelium จะเจริญบนผิว อาหารก่อน และแทงเส้นใยเข้าไปในอาหารเพื่อนำสารอาหารไปใช้ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium จะเกิดขึ้นมาภายหลังและยื่นไปในอากาศเพื่อทำหน้าที่หลักคือสืบพันธุ์ ระหว่างที่โคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium จะสร้างขึ้นในสภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้น aerial mycelium จึงต้องมี hydrophobic sheath เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ มีการเจริญคล้ายกับเชื้อราคือ เจริญทางปลายสุดของ hypha เป็นแบบ apical growth และมีอัตราการเจริญ (growth rate) ที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อราประมาณ 7-14 วัน ในบางชนิดที่มีการเจริญช้า การสร้างเส้นใยที่สมบูรณ์ทั้ง 2 แบบ อาจใช้ระยะเวลาถึง 1 เดือน เส้นใยที่แก่จะมีการสร้างผนังกั้น (septate) เพื่อแบ่งเซลล์ โดยที่แต่ละเซลล์จะมีขนาด 20 ไมโครเมตรและอาจมี nucleoid หลายชุดภายใน 1 เซลล์ จากนั้นจึงหักหลุดเป็นท่อนๆ มีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphic) หรือเป็นรูปกระบอง (club shape cell) เซลล์ที่หักหลุดออกกลายเป็นสปอร์ ซึ่งส่วนมากเป็น asexual spore สปอร์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile spore) แต่ก็มีบางชนิดที่เคลื่อนที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(flagellate spore) สำหรับสีของเส้นใยมีหลายสี เช่น ขาว ใส ไม่มีสี เหลืองอ่อน น้ำตาลอ่อน แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือดำ โดยสีอาจเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโต และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Waksman, 1967; Mendez *et. al*., 1985)

แอกติโนไมซีสมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายมาก ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตโดยอาศัยออกซิเจน ได้รับสารอาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ (saprophytic) และชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) พบอยู่ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ และอากาศ แต่พบมากในดินที่เป็นด่างเล็กน้อยและอุดมไปด้วยสารอินทรีย์ โดยพบมากบริเวณดินชั้นบนและลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลงไป นอกจากนี้ยังพบได้มาในดินบริเวณรากพืช (rhizosphere) หรือแม้แต่ในชิ้นส่วนของต้นพืช (endophyte) ก็สามารถพบแอกติโนไมซีสต์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Porter, 1971)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์

การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการจำแนกเป็นสกุลจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของสปอร์ ลักษณะของเส้นใยทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium นอกจากนี้ยังใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจัดจำแนก เช่น ชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) ที่ผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ ฟอสโฟลิปิด และ menaquinone เป็นต้น (Yamaguchi,1965) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจำแนก (Holt *et al*., 1994) ได้แก่

1. เส้นใย (mycelium) แบ่งออกเป็น substrate mycelium และ aerial mycelium โดยพิจารณาว่าสร้างแบบใด หรือสร้างทั้งสองแบบ โดยปกติเชื้อจะสร้างเส้นใยชนิดใด ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ มีบางชนิดเท่านั้นที่สร้างเฉพาะ aerial mycelium บางชนิดเส้นใยมีลักษณะเป็น vesicle และไม่สร้างสปอร์ เส้นใยอาจแข็งแรง หรือมีการแตกหัก บางชนิดเส้นใยที่แตกหักสามารถเคลื่อนที่ได้

2. conidium คือสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ โดยแอกติโนไมซีสสามารถสร้าง conidium ได้หลายแบบดังนี้

ก. conidium เดี่ยว (Single conidium) มักพบโดยทั่วไปโดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* บางชนิดมี endospore ที่ทนความร้อนได้ดี แต่บางชนิดไม่ทนร้อน

ข. conidia คู่ (pairs of conidia) มีลักษณะเรียงตัวตามยาว สร้างอยู่บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ซึ่งพบในเชื้อ ได้แก่ *Microbispora* และ *Planobispora*

ค. conidium ที่เรียงตัวเป็นสายสั้น (short chain of conidia) ลักษณะนี้ยากที่จะบอกได้ว่ามีจำนวนสปอร์อยู่เท่าไหร่ แต่จะพิจารณาว่าถ้ามีการเรียงตัวของสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์จัดว่าเป็นสายสั้น โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สปอร์สั้น ๆ และมีถุงมาล้อมรอบ อาจสร้างอยู่บนเส้นใยที่เจริญอยู่ใต้ผิวหน้าอาหาร หรือเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศก็ได้ พบในเชื้อ *Nocardia*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia*, *Glycomyces*, *Faenia* และ *Streptoallateichus* เป็นต้น

ง. conidia ที่เรียงตัวเป็นสายยาว (long chain of conidia) โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้าง conidia ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ พบในเชื้อ *Nocardia, Nocardiopsis, Pseudonocardia, Actinosynnema, Actinopolyspora, Streptomyces, Streptoallateichus, Streptoverticillium, Saccharorinospora, Sccharothrix, Kibdelosporangium, Kitasatosporia, Glycomyces* และ *Amycolatopsis*

3. sporangium เป็นถุงที่บรรจุสปอร์ไว้ภายใน อาจสร้างอยู่บนเส้นใยที่เจริญอยู่ใต้ผิวหน้าอาหาร หรือเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศก็ได้ พบในเชื้อ *Ampullariella, Actinoplanes, Dactylosporangium, Pilimelia, Planomonospora, Planobispora, Spirillospora* และ *Streptosporangium*

หน้าที่และความสำคัญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์

แอกติโนไมซีสต์ เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เภสัชกรรม และการเกษตร เนื่องจากสามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรีย และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Caruso *et al.,* 2000) ซึ่งหน้าที่สำคัญ ได้แก่

1. การย่อยสลายอินทรียวัตถุ

เชื้อแอกติโนไมซีสต์ในธรรมชาติส่วนใหญ่เจริญอยู่ในดิน มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรียวัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืช และสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์อื่น ๆ กล่าวคือ ในช่วงที่มีอินทรียวัตถุในดินมากจะมีพวกแบคทีเรีย และเชื้อราเจริญอยู่มาก ส่วนแอกติโนไมซีสต์จะเจริญตามมาในภายหลัง เพราะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เจริญเติบโตได้ช้าจะเจริญได้ดีต่อเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้ว โดยช่วยย่อยสลายกรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอกติโนไมซีสต์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังมีความสามารถย่อยสลายสารพิษชนิดต่าง ๆ ได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้

เชื้อแอกติโนไมซีสต์บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น เชื้อในสกุล *Frankia* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ (Torrey and Tjepken, 1979)

4. ความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช

Shimizu *et al*. (2000) ใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากราก ต้น และใบ ของต้นกุหลาบพันปี (rhododendron) จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่า เชื้อไอโซเลท R-5 สามารถยับยั้งการเจริญของของเชื้อรา *Phytophtora cinnamon* และ *Pestalotiopsis sydowian* ดีที่สุด

5. ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

แอกติโนไมซีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และ เภสัชกรรม (Waksman and Lechevalier, 1962; Lazzarini *et al*., 2000) รวมถึงสารปราบวัชพืช Okazaki, 2003)

นอกจากนี้แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บางชนิดยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) antibiotics siderophores และกิจกรรมของแอกติโนไมซีสต์ที่ช่วย ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จึงมีความสัมพันธ์กับพืชในระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติ (Hasagawa *et al*., 2006) ซึ่งสามารถคัดเลือกแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่ผลิต bioactive compounds และนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Igarashi *et al*., 2002)

ถึงแม้ว่าการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเกิดภายในเนื้อเยื่อหรือไม่ แต่ Meguro *et al*. (2006) ได้รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 สามารถเร่งการงอกและการยืดยาวของเซลล์พืช เพราะจากการทดลองนำชิ้นส่วนของราก rhododendron มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 บ่มไว้เป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งพบว่าเชื้อดังกล่าวอาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ต้นอ่อนหลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนของ rhododendron ลงปลูกในดินที่ฆ่าเชื้อและไม่ได้ฆ่าเชื้อ พบว่า การงอกของรากพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 ดีกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์นี้มีสามารถสร้างฮอร์โมนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของรากได้ จากรายงานของ Shimizu *et al.* (2001) รายงานว่า ซึ่งได้วิเคราะห์ชนิดของเคมีที่ผลิตโดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า เชื้อ *Streptomyces galbus* R-5 ที่ปลูกลงบนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงต้นกล้า rhododendron และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotia sydowiana*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถสร้างสาร actinomycin D และ/หรือ amphotericin B ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะ ที่มีการทำงานคล้ายคลึงกับสาร actinomycin X_2 และ fungichromin (Shimizu *et al.,* 2004)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทเป็นอย่างมากทั้งในด้าน วิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนเค็ม โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การสร้างสายพันธุ์พืชที่ต้านทาน (resistant plants) ต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช หรือการชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี สารเคมี การตัดต่อยีนส์และการย้ายยีนส์ เป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2540)

การเพิ่มปริมาณพืชตระกูลส้มในสภาพปลอดเชื้อ

การเพิ่มปริมาณต้นกล้าส้มในสภาพปลอดเชื้อ โดยส่วนใหญ่ประสบผลสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ปลายราก ยอด ปลายยอด ปล้อง epicotyl และใบ โดยการชักนำให้เกิดกระบวนการ somatic embryogenesis หรือ somatic organogenesis (Grinblat, 1972; Chaturvedi and Mitra, 1974; Raj Bhansali and Arya, 1979; Sauton *et al.,* 1982; Ediss and Burger, 2003; Moore,1986; Duran-vila and Navarro, 1989; De Pasquale *et al.,* 1994; Singh *et al.,* 1994

Richi and Singh (1995) กระตุ้นเนื้อเยื่อส่วน epicotyls และ hypocotyls ของส้มหวาน (*Citrus sinensis* L. osbeck) ให้เกิดยอดบนอาหาร Murashige and Skoog, 1962 (MS) พบว่า ในอาหาร MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 2.0 mg/l ร่วมกับ abscisic acid (ABA) 2.0 mg/l สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อส่วนดังกล่าวเกิดยอดได้สูงสุด 40 และ 60 ยอดต่อชิ้นพืชตามลำดับ

Kotsias and Roussos (2001) ศึกษาผลของความแตกต่างของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างของต้นกล้า lemon พบว่า ในอาหาร Driver and Kuniyuki (DKW) ที่เติม benzyladenin (BA) 2 mg/l ร่วมกับ ABA 0.2 mg/l มีผลทำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 2.5 ยอดต่อชิ้นพืช

Abdulaziz (2002) ศึกษาผลของ phytohormone ในการเพิ่มปริมาณและการเกิดรากของมะนาว (*Citrus aurantifolia*) พบว่า อาหาร MS ที่เติม BAP 2.0 mg/l, kinetin 1 mg/l และ α-naphthalene acetic acid (NAA) 1mg/l สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดจากตาข้างสูงสุด 9 ยอดต่อ 1 ตาข้าง สำหรับการกระตุ้นให้เกิดราก โดยการเติม NAA 0.5 mg/l ร่วมกับ Indole-3-butyric acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(IBA) 2.0 mg/l ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุด ตลอดจนมีอัตราการรอดชีวิตในสภาพโรงเรือนสูงถึง 82 เปอร์เซ็นต์

Ediss and Burger (2003) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนรากของส้มทรอยเยอร์ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliate*) บนอาหาร MS ที่เติม BAP 10 mg/l และ NAA 1 mg/l พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส และในอาหาร MS ที่เติม BAP 0.25 mg/l และ NAA 0.1 mg/l สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อส่วน epicotyls ได้

Rashid *et al.* (2005) รายงานว่าการนำปลายยอดและตาข้างของส้ม Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BAP 1.0 mg/l และ Kinetin 1.5 mg/l ทำให้เกิดยอดมากที่สุด โดยการใช้ปลายยอด 1 ยอดสามารถเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 7.33 ยอด และการใช้ตาข้างสามารถเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 6.33 ยอด

Ehsan *et al.* (2009) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของใบของส้มเขียวหวาน (*Citrus sinensis* (L.) Obeck) 2 สายพันธุ์ บนอาหาร Shoot Inducing Media (SIM_1) ที่เติม BA 0.5 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l พบว่า สายพันธุ์ Bingtangcheng และ Valencia มีการเกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 4.29 และ 3.16 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงการเกิดขึ้นของกระบวนการความต้านทานในพืชก่อนหรือหลังการเข้าทำลายของเชื้อโรค อาจแบ่งลักษณะความต้านทานได้ 2 แบบ คือ

1. ความต้านทานแบบ local resistance หรือ active resistance ซึ่งหมายถึง ลักษณะความต้านทานที่เกิดขึ้นเนื่องจากพืชได้สร้างกระบวนการต่อต้านหรือป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของโรคในทันทีทันใด เช่น การเกิดการตายของเนื้อเยื่อและการสะสมของสาร phytoalexins (Muller and Boger, 1940; Metlitskii and Ozeretskovskaya, 1985)

2. ความต้านทานแบบ systemic resistance หรือ passive resistance หมายถึง ลักษณะความต้านทานที่มีอยู่ก่อนแล้วในพืชก่อนการเข้าทำลายขอเชื้อโรค เช่น การสะสมสารลิกนิน (lignin) ในปริมาณมากในใบพืช การมีผนังเซลล์หนาเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งมีอยู่ก่อนแล้วในพืช

พืชสามารถเกิดความต้านทานได้ทั้ง local resistance และ systemic resistance เช่น การชักนำให้เกิดความต้านทานโดยการใช้ incompatible pathogen (Muller and Boger, 1940; Stromberg and Brishmmar, 1991) และ การใช้ biogenic elicitors ซึ่งเป็นสาร metabolites ที่ได้จากจุลินทรีย์หรือพืช (Doke *et al.,* 1987; Metliskii, 1987)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสร้างความต้านทานโรคในพืชด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ มีบทบาทสำคัญต่อความสมบูรณ์และการพัฒนาของพืช เนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ทั้งการเพิ่มความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหาร และ/หรือ การสร้างสารทุติยภูมิ เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (Hasagawa *et al*., 2006) จากรายงานของ Coomb *et al.* (2004) พบว่า เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์มาประยุกต์ใช้ในสภาพแปลง ประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์มักจะลดลง จึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิค วิธีการที่หลากหลายรูปแบบในการประยุกต์ใช้ เช่น การคลุกเมล็ด การฉีดเข้าลำต้น การฉีดพ่นทางใบ เป็นต้น โดยคาดหวังว่า การเข้าอยู่อาศัย (colonization) ในเซลล์พืชของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จะทำให้เชื้อยังคงมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อไปได้ นอกจากนี้ Shimizu *et al.* (2001) ได้สันนิษฐานว่า ถ้าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากพืช สามารถเข้าอยู่อาศัยในต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้ ต้นกล้าอาจจะต้านทานต่อโรคพืชต่างๆ ได้ เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวจะทำให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ สามารถเข้าอยู่อาศัยในต้นกล้าได้โดยไม่มีการแข่งขันกัน และ/หรือ เป็นศัตรูกับจุลินทรีย์อื่นๆ ในดิน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการผลิตต้นกล้าต้านทานโรคด้วย

Meguro *et al*. (2004) นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ *Streptomyces padonus* ไอโซเลท AOK-30 ที่แยกได้จาก mountain laurel (*Kalmia latifoia* L.) กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pestalotia sydowiana* สาเหตุโรคของต้นกล้า mountain laurel ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า *Streptomyces padpnus* ไอโซเลท AOK-30 มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *P. sydowiana* ได้ดี

Meguro *et al.* (2004) เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces padonus* ไอโซเลท AOK-30 ไปใช้ในการผลิตต้นกล้า mountain laurel ที่มีความต้านทานโรค พบว่า หลังจากปลูกเชื้อแล้วสามารถชะลอการลุกลามของโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* sp.ได้

Cao (2004) แยกเชื้อ *Streptomyces* มาจากมะเขือเทศ พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S30 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Rhizoctonia solani* ให้กับต้นกล้ามะเขือเทศได้

LI Hong-gang (2008) ได้ศึกษาความสามารถในการเข้าอาศัยเนื้อเยื่อพืชของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท Fq24 สามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อลำต้นของข้าวสาลี มะเขือเทศ แตงกวา และกะหล่ำปลีได้ ส่วน ไอโซเลท Lj20 สามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อลำต้นของข้าวสาลี มะเขือเทศ แตงกวา และเนื้อเยื่อรากของข้าวสาลีและมะเขือเทศได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Shimizu *et al.* (2006) ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pestalotia sydowiana* ในต้นกล้า Rhododendron โดยใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท MBR-37 และ MBR-38 ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า มีอาการเหี่ยวและ/หรือ แผลขนาดเล็กเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ในต้นกล้าที่มีการปลูกเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท MBR-37 และ MBR-38 ตลอดจนมีการสะสมของสารแอนโทไซยานินในต้นกล้านั้นด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved