รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการยับยั้งเชื้อราคอลเลโททริคัมที่ก่อโรคในพืช จากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

Study of Inhibition of *Colletotrichum* species Fungal Plant Pathogens from *Actinomycetes*

ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม
นางสาวพรทิพย์ พลาดิศัยเลิศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

เลขที่สัญญา ๓๔/๒๕๖๐ (เพิ่มเติม)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการยับยั้งเชื้อราคอลเลโททริคัมที่ก่อโรคในพืช จากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

Study of Inhibition of *Colletotrichum* species Fungal Plant Pathogens from *Actinomycetes*

ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม
นางสาวพรทิพย์ พลาดิศัยเลิศ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๐

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Exeutive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาการยับยั้งเชื้อราคอลเลโททริคัมที่ก่อโรคในพืชจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

(ภาษาอังกฤษ) Study of Inhibition of Colletotrichum species Fungal Plant Pathogens from Actinomycetes

รหัสโครงการ ..... สัญญาเลขที่ ๓๔/๒๕๖๐ (เพิ่มเติม) ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 438,000 บาท ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 8 เดือน ตั้งแต่วันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2560

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่า โรคใบจุด พบการระบาดมากในช่วงฤดูฝน โดยมักก่อโรคในพืชที่สำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ อาทิ เงาะ มังคุด ทุเรียน มะม่วง มะละกอ ยางพารา มันสำปะหลัง ลองกอง กล้วยไม้ เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชทั้งในระยะอ่อนแอและระยะสมบูรณ์ ก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยว

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีสต์จากดินในพื้นที่การเกษตร เพื่อหาเชื้อที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เชื้อแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 150 ไอโซเลท ถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี Dual culture technique จากผลการทดสอบพบว่า มีเชื้อ 23 ไอโซเลทที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum spp.* ได้ คือ Act-62, 75, 79, 81, 85, 86, 114, 116, 117, 118, 120, 124, 125, 127, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 141, 142 และ 147 และเมื่อทำการสุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 3 ไอโซเลท คือ Act-120, Act-133 และ Act-135 เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส

ของยีนส์ 16S rRNA พบว่าคือเชื้อ *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces cavourensis* ตามลำดับ

ผลจากงานวิจัยนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสต์นี้ไปใช้เพื่อการควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) เพื่อลดการใช้สารเคมีและส่งเสริมการเกษตรแบบอินทรีย์

Output / Outcome

1. บทความวิจัยระดับชาติ 1 เรื่อง (ร่างบทความวิจัยได้แนบท้ายไว้ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์)

2. การพัฒนาบัณฑิตในระดับปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3. สร้างความร่วมมือระหว่างวิทยาเขต ในงานวิจัยนี้ได้ทำงานร่วมกับอาจารย์ที่วิทยาเขตจันทบุรี

4. พบเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ 23 ไอโซเลทจากที่ได้ทำการทดลอง 150 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 15.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum spp.*

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการวิจัยต่อยอดเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum spp.* หรือนำเชื้อแอคติโนมัยซีทส์เหล่านี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น ปุ๋ยอัดเม็ดที่มีส่วนผสมของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ภาคตะวันออกของประเทศไทย ประกอบด้วย 7 จังหวัด คือ จันทบุรี ชลบุรี ตราด ระยอง ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี และสระแก้ว เป็นภาคที่มีอาณาเขตติดชายฝั่งอ่าวไทยด้านตะวันออก นับเป็นอีกภูมิภาคหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากพื้นที่กลุ่มจังหวัดภาคตะวันออกมีทรัพยากรธรรมชาติที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ เป็นทุนทางธรรมชาติที่ก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านการท่องเที่ยว อุตสาหกรรม และการเกษตร สินค้าการเกษตรกลุ่มจังหวัดที่สำคัญด้านเกษตรกรรมคือ พืชไร่ ได้แก่ ยางพารา อ้อย มันสำปะหลัง สับปะรด ปาล์ม ข้าว และเป็นศูนย์กลางการผลิตและส่งออกผลไม้สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เช่น ลองกอง ลำไย เงาะ มังคุด และทุเรียนซึ่งเป็นผลไม้ที่ถือว่าเป็นราชาแห่งผลไม้ไทยมีปริมาณการส่งออกมากเป็นลำดับต้นๆ ของประเทศ โดยมีมูลค่าการส่งออกในปี 2558 เป็นจำนวน 381,469.5 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 15,563 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2559)

โรคศัตรูพืชที่ทำลายความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับผลไม้ของภาคตะวันออกมากที่สุดโรคหนึ่งคือ โรคติดเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเชื้อนี้เป็นราที่จัดอยู่ใน Subdivision Deuteromycotina, Class Coelomycetes, Order Melanconiales, Family Melanconiaceae (Ainsworth, 1973) โดยก่อให้เกิดความสูญเสียกับพืชและผลไม้เศรษฐกิจ ส่งต่อให้ผลผลิตลดลง และคุณภาพของผลผลิตลดลงด้วย โดยเชื้อนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากถึง 470 สกุล ทั้งพืชตระกูลถั่ว หญ้า ผัก ไม้ผล และไม้ประดับ (Bailey and Jeger, 1992) ทำให้ผลผลิตเน่าเสียอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ การระบาดของโรคเกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรงในเขตที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด ซึ่งการเข้าทำลายของในส่วน ราก และหัว ที่อยู่ใต้ดิน ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส โดยการเข้าทำลาย

ของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งแบบมีเชื้อหลายสปีชีส์เข้าทำลายพืชชนิดเดียว หรือเชื้อสปีชีส์เดียวเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายเซลล์พืชโดยตรงไม่ต้องผ่านช่องเปิดธรรมชาติหรือบาดแผล สามารถเข้าทำลายผลผลิต ตั้งแต่ระยะดอก ผลอ่อน โดยยังไม่แสดงอาการของโรค จัดเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) จะแสดงอาการชัดเจนเมื่อผลผลิตแก่หรือเริ่มสุก ดังนั้น การเข้าทำลายจะเริ่มตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก โรคนี้พบกระจายอยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นจะพบการระบาดอย่างรุนแรง การระบาดของเชื้ออาศัยลม ฝน หรือแมลงที่บินมาเกาะบริเวณแผลทำให้สปอร์แพร่กระจายไปยังที่ต่างๆเมื่อถูกความชื้นก็สามารถงอกเจริญได้ (Bailey and Jeger, 1992)

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ใบจุด หรือโรคผลเน่า มีพืชอาศัยกว้างพบในพืชอาศัยหลายชนิด เช่น มะม่วง มะละกอ พริก ขนุน ชมพู่ ฝรั่ง เงาะ พืชตระกูลถั่ว อะโวกาโด มังคุด สตรอเบอร์รี่ องุ่น กล้วย มะเขือเทศ ข้าวโพด กล้วย เมลอน แอปเปิ้ล ทุเรียน ลองกอง ลิ้นจี่ แก้วมังกร มะปราง พริก และมันสำปะหลัง (หทัยชนก คงแก้ว, 2546; สุธาสินี ชัยชนะ , 2550; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541; Cook, 1975; Alvarez and Nishijima, 1987; Smith and Black, 1990; Bailey and Jeger, 1992) ความรุนแรงในการระบาดของโรคแอนแทรคโนสจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของพืช และพืชที่ถูกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เข้าทำลายพบว่าจะปรากฏลักษณะอาการที่หลากหลาย (หทัยชนก คงแก้ว, 2546) ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความชื้นหรือปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และบริเวณส่วนต่างๆของพืช (รังษี เจริญสถาพร และอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว, 2553) โดยความรุนแรงของโรคมี 2 ลักษณะ คือหากเกิดโรคในระยะก่อนเก็บเกี่ยวจะส่งผลต่อการเจริญของผล แต่หากเกิดโรคในช่วงระยะการเก็บเกี่ยวจะทำให้ผลผลิตเสียหายซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตส่วนใหญ่การเกิดโรคมักเกิดกับส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน บางครั้งส่วนที่อยู่ใต้ดิน เช่น ราก หรือหัว ก็มีโอกาสได้รับผลกระทบเช่นกัน (Freeman et al., 1998) โดยอาการจะเริ่มแสดงบริเวณขอบใบ แผลสีน้ำตาล และลุกลามทำให้ใบร่วง เมื่อเป็นมากจะมีอาการยืนต้นตาย อาการบริเวณผลจะมีจุดแผลสีน้ำตาลขนาดไม่เท่ากัน และขยายใหญ่ขึ้นจนเป็นแผลฉ่ำน้ำกลุ่มของโคนีเดียจะแพร่ระบาดไปกับฝน (รัฐกร ศรีสุทธี, 2549; เนตรนภิส เขียวขำ และ สมศิริ

แสงโชติ, 2551) ต่อมา รัฐกร ศรีสุทธี (2549) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ ดังนี้ *C. gloeosporioides, C. musae, C. acutatum* และ *C. capsici* และสายพันธุ์ที่มักพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในพืชผลการเกษตรของประเทศไทย คือ *C. gloeosporioides*, *C. musae, C. acutatum* และ *C. capsici* (รัฐกร ศรีสุทธี และสรัญยา ณ ลำปาง, 2550; พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และชนินทร ดวงสอาด, 2554) ในปี 2561 ยางพาราซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยเป็นอันดับที่ 2 ซึ่งสามารถรายได้เข้าประเทศอย่างมหาศาล ตามมาด้วยมันสำปะหลัง(ศูนย์วิเคราะห์เศรษฐกิจทีเอ็มบี, 2561) ในขณะเดียวกันพบว่ายางพาราที่เป็นพืชเศรษฐกิจมักประสบปัญหากับโรคพืชอย่างอาการใบจุดโดยทำให้เกิดแผลตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ ซึ่งเชื้อสาเหตุที่สำคัญคือเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งมักพบการระบาดในช่วงฤดูฝนสอดคล้องกับสภาพภูมิประเทศทางภาคใต้ของไทยซึ่งมีฝนชุกตลอดปี และเป็นแหล่งเพาะปลูกยางพาราแหล่งใหญ่ที่สุดของประเทศไทย ซึ่งในพื้นที่เพาะปลูกยางพาราสามารถรวบรวมเชื้อ *Colletotriclum* สายพันธุ์ก่อโรคได้มากถึง 27 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงระดับ 0-1 มี จำนวน 7 สายพันธุ์ ความรุนแรงระดับ 1-2 มี จำนวน 7 สายพันธุ์ ความรุนแรงระดับ 2-3 มี จำนวน 8 สายพันธุ์ ความรุนแรงระดับ 3-4 มี จำนวน 5 สายพันธุ์ และเป็นสายพันธุ์เจริญเร็ว ซึ่งมีอัตราการเจริญอยู่ระหว่าง 4. 27- 5. 60 มิลลิเมตรต่อวัน เชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุของโรคใบจุด และโรคใบร่วงชนิดหนึ่งในยางพาราสามารถเข้าทำลายทั้งใบ กิ่งก้าน และฝักยาง โดยในระยะยางผลิใบใหม่ทำให้ใบเหี่ยวและหลุดร่วงทันที ในระยะที่ใบเจริญแล้วจะเห็นเป็นจุดนูน และบางส่วนของใบบิดงอ ถ้าเข้าทำลายส่วนยอดหรือกิ่งก้าน จะทำให้ยอดนั้นแห้งตาย ด้วยเหตุนี้โรคที่เกิดจาก *Colletotrichum* จึงเป็นโรคที่สำคัญที่ก่อให้เกิดผลเสียหายทางเศรษฐกิจของยางพารา ซึ่งเป็นสินค้าเกษตรที่เป็นรายได้หลักของประเทศ (นริสา จันทร์เรือง, อุไร จันทรประทิน, พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, บุตรี พุทธรักษ์ และบัญญัติ สิทธิผล, 2552) ในขณะที่มันสำปะหลังซึ่งเป็นผลิตผลเกษตรที่สำคัญทั้งภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศรองจากยางพารา และปัจุบันมันสำปะหลังถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลก (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2550; หนังสือพิมพ์มติชนเทคโนโลยีเกษตร, 2557) แต่ปัญหาการ

ระบาดของเชื้อรา *Colletotrichum* ทำให้มีการสูญเสียรายได้ส่วนหนึ่งของประเทศ และลดความเชื่อมั่นของประเทศคู่ค้าจากการระบาดของเชื้อ *Colletotrichum* จากการศึกษาพบว่าจากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 38 ไอโซเลท เชื้อจำนวน 34 ไอโซเลท อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตเร็วและ 4 ไอโซเลท อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตช้า ซึ่งสายพันธุ์ที่พบก่อโรคมากที่สุดคือ *Colletotriclum gloeosporioides* (รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, 2554) ปัจจุบันในประเทศไทย พบว่าโรคแอนแทรคโนสสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดเช่น เงาะ มะม่วง มะละกอ ขนุน กล้วย องุ่น สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง มังคุด ทุเรียน และมันสำปะหลังเป็นต้น นอกจากนี้เชื้อราก่อโรคแอนแรกโนสยังมีพืชอาศัยมากถึง 470 ชนิด ความเสียหายจึงเกิดได้ในพืชผลหลายกลุ่ม เป็นผลให้ปริมาณและคุณภาพลดลง และไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงจัดเป็นโรคที่สำคัญอย่างยิ่งในประเทศไทย (รัฐกร ศรีสุทธี, 2549) ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในอนาคต

ในปัจจุบันเกษตรกรไทยนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืช อาทิสารเคมีจำพวก Carbendazim และ Benomyl ในการป้องกัน ดูแลและรักษาการติดเชื้อราดังกล่าว (นิศากร สุวรรณ และคณะ 2556) รวมไปถึงการรมผลมังคุดด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. หลังการเก็บเกี่ยว

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า การใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อก่อโรคในผลไม้ก่อให้เกิดผลเสียหลายๆ อย่างตามมา เช่น การเกิดสารเคมีตกค้างในผลไม้ที่สูงกว่าเกณฑ์ที่ประเทศคู่ค้ากำหนดไว้ ซึ่งมีผลต่อการส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และกลุ่มประเทศในยุโรป (สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร, 2553) อีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ ส่งผลให้เชื้อราในธรรมชาติดื้อต่อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ที่พบได้ในธรรมชาติโดยทั่วไป ยาฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการเกษตรส่งผลให้เชื้อ *A. fumigatus* เกิดการปรับตัวและกลายพันธุ์ทำให้เกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาในมนุษย์ (Snelders, van der Lee et al. 2008, Snelders, Huis In 't Veld et al. 2009, Snelders, Karawajczyk et al. 2010, Snelders, Camps et al. 2012)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้คือ การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ และมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมากทางการแพทย์ เภสัชกรรม การเกษตรและภาคอุตสาหกรรม เพราะสามารถสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนมังคุดและเงาะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสและโรคผลเน่าในผลไม้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว

ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้ จะทำให้เกิดการลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ส่งผลให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิต เพิ่มผลผลิตของต้นมังคุดเนื่องจากต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดี ลดการตกค้างของสารเคมีในผลมังคุดและเงาะทำให้ไม่ประสบปัญหาการกีดกันจากการส่งออก จากเหตุผลดังกล่าวจะนำไปสู่การนำรายได้เข้าประเทศได้มากขึ้น นอกจากนี้ผลทางอ้อมคือน่าจะลดอัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำจากการใช้ยากำจัดเชื้อราทางการเกษตรได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- เก็บตัวอย่างดินจำนวน 50 ตัวอย่าง จากสวนผลไม้ในภาคตะวันออก มาทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์อย่างน้อยจำนวน 100 ไอโซเลท
- ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากรอยโรค
- คัดเลือกหาเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* spp. ด้วยวิธี Dual Culture Technique

- ทำการสุ่มเชื้อ Actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ มาทำการหาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing ที่ 16s rRNA

- ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและจำแนก Genus และ species ของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ด้วยฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI)

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตสาร secondary metabolite ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสได้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ประการที่หนึ่ง ได้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้

ประการที่สอง พัฒนาบัณฑิตในระดับปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์

ประการที่สาม เพิ่มผลงานวิจัยให้แก่มหาวิทยาลัยบูรพา โดยการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ (TCI กลุ่ม 1) หรือนานาชาติ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีและยากำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ทั้งนี้เพื่อการเพิ่มผลผลิตในภาคการเกษตร ตลอดจนการคงสภาพสินค้าทางการเกษตรในภาคการส่งออก แต่เนื่องจากสารเคมีเหล่านั้นส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นการปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมทางดิน น้ำ และการตกค้างในผลผลิต ทำให้เกิดอันตรายแก่เกษตรกร ชาวบ้านบริเวณใกล้เคียงและผู้บริโภค นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ได้

เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสท์จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก บางชนิดติดสี acid fast ส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยสายคล้ายเชื้อรา แต่มีความแตกต่างจากเชื้อรา คือ เป็นสิ่งมีชีวิตชนิด prokaryotic cell ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโตคอนเดรีย เชื้อแอคติโนมัยซีสท์สามารถถูกยับยั้งการเติบโตได้โดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา สามารถพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เจริญในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย (Cross and Goodfellow, 1973) ในปี ค.ศ. 1997 Stackebrandt และคณะได้เสนอการจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16s rRNA โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสท์จัดอยู่ใน Class Actinobacteria วงศ์ Actinomyceteales (Cano and Gene, 2004)

เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ (Actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีการนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นเชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ซึ่งในปัจจุบันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ (Goodfellow et al., 1988; Schwyn and Neilands, 1996) รายงานการวิจัยหลายรายงานชี้ให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สามารถถูกนำมาใช้ทางการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ได้ เช่น Samac et al. (2003) รายงานว่า เชื้อ

Streptomyces sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดได้อย่างดี และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคที่ระบบรากและเมล็ดในพืชชนิดอื่นได้ เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ จีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะพวก beta-lactams, polyethers, nonpolyenic, macrolides, และ azalomycin B เพื่อใช้ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Gesheva 2002) นอกจากยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ศัตรูพืชได้แล้ว เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น ได้ นอกจากนี้เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์บางชนิดสามารถย่อยสลายยากำจัดศัตรูพืชได้ เช่นย่อยสลาย diuron (Castillo et al., 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette et al., 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง gamma-hexachloro cyclohexane (Benimeli et al., 2008)

โรคศัตรูพืชที่ทำลายความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับผลไม้ของภาคตะวันออกมากที่สุดโรคหนึ่งคือ โรคติดเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเชื้อนี้เป็นราที่จัดอยู่ใน Subdivision Deuteromycotina, Class Coelomycetes, Order Melanconiales, Family Melanconiaceae (Ainsworth, 1973; Holliday, 1980) โดยก่อให้เกิดความสูญเสียกับพืชและผลไม้เศรษฐกิจ ส่งต่อให้ผลผลิตลดลง และคุณภาพของผลผลิตลดลงด้วย โดยเชื้อนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากถึง 470 สกุล ทั้งพืชตระกูลถั่ว หญ้า ผัก ไม้ผล และไม้ประดับ (Bailey and Jeger, 1992) ทำให้ผลผลิตเน่าเสียอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ การระบาดของโรคเกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรงในเขตที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด ซึ่งการเข้าทำลายของในส่วน ราก และหัว ที่อยู่ใต้ดิน ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส โดยการเข้าทำลายของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งแบบมีเชื้อหลายสปีชีส์เข้าทำลายพืชชนิดเดียว หรือเชื้อสปีชีส์เดียวเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายเซลล์พืชโดยตรงไม่ต้องผ่านช่องเปิดธรรมชาติหรือบาดแผล สามารถเข้าทำลายผลผลิต ตั้งแต่ระยะดอก ผลอ่อน โดยยังไม่แสดงอาการของโรค จัดเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) จะแสดงอาการชัดเจนเมื่อผลผลิตแก่หรือเริ่มสุก ดังนั้น การเข้าทำลายจะเริ่มตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก โรคนี้พบกระจาย

อยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นจะพบการระบาดอย่างรุนแรง การระบาดของเชื้ออาศัยลม ฝน หรือแมลงที่บินมาเกาะบริเวณแผลทำให้สปอร์แพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ เมื่อถูกความชื้นก็สามารถงอกเจริญได้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541)

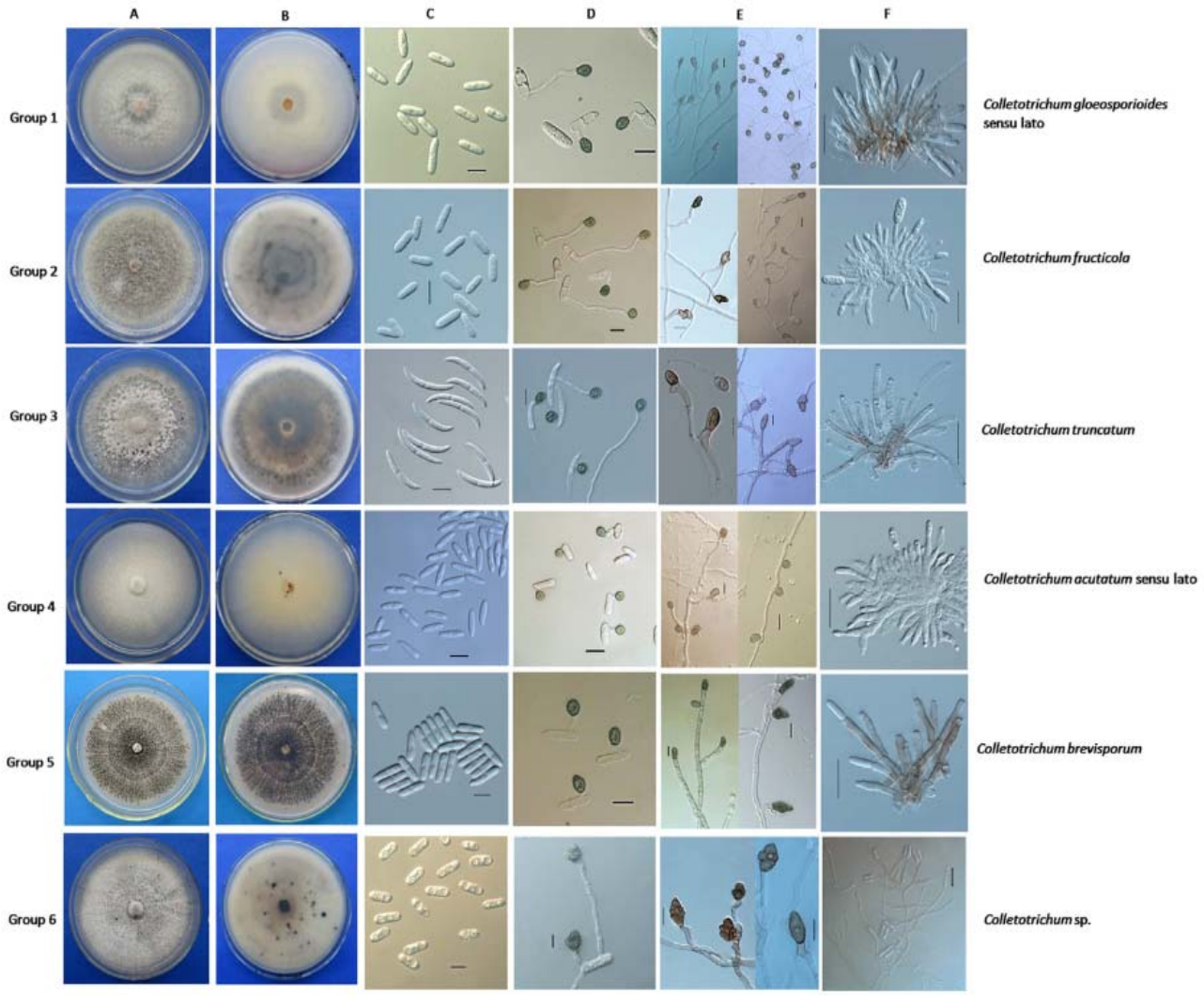
ปัจจุบันพบว่ารา *Colletotrichum* มีจำนวนมากกว่า 20 species บนพืชอาศัยต่างๆ กัน ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคใบจุดหรือโรคแอนแทรคโนส (Hyde et al., 2009) ได้รายงาน 2 species ซึ่งในบางครั้งเป็นราดิน (soil-borne) ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorph คือรา *Glomerella cingulata* สร้าง conidia รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ไม่มี setae และ *Colletotrichum dematium* สร้าง conidia รูปพระจันทร์เสี้ยว และมี setae ลักษณะสำคัญของรา *Coelomycetes* จีนัสนี้คือการสร้าง acervuli อยู่ใต้ epidermis ของพืช บนวุ้นอาหารจะพบลักษณะคล้าย sporodochia ราสร้าง phialides ไม่มีสี เกิดรวมเป็นกลุ่มหนาแน่น บาง species จะพบ setae สีดำปลายแหลม เกิดจากฐานของ stroma ลักษณะ conidia เป็นรูปทรงกระบอก หรือพระจันทร์เสี้ยว มี 1 เซลล์ ไม่มีสี ผนังเรียบ มักเกิดอยู่ในกลุ่มสารเมือกเหลวสี ครีม ส้ม แดง หรือน้ำตาล ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของราจีนัสนี้คือการสร้าง appressoria เกิดจากการงอกของ conidia มีสีน้ำตาลรูปร่างกลม หรือมีส่วนที่โป่งหรือยื่นออก (lobed) การจัดจำแนกของราในกลุ่มนี้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของสปอร์ การมีหรือไม่มี setae การสร้าง sclerotia ลักษณะของโคโลนีบนอาหารต่างๆ (พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร์ ดวงสอาด, 2554; Liu *et al.*, 2016) ดังแสดงใน**รูปที่ 2-1** และมีวงจรในการแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในแต่ละฤดูกาล และการเข้าทำลายแต่ละส่วนของพืชได้แสดงให้เห็นดัง**รูปที่ 2-2** ลักษณะของผลไม้ที่มีการเข้าทำลายโดยเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ทำให้ผลของฝรั่งมีอาการเน่า ยังผลให้ศัตรูพืชอื่นๆ อย่างเช่นแมลงและหนอน รวมถึงเชื้อก่อโรคอื่นๆ สามารถเข้าทำลายได้ผลไม้ได้ง่ายและมากยิ่งขึ้น ดังแสดงใน**รูปที่ 2-3** และลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับองุ่นดังแสดงใน**รูปที่ 2-4**

จากข้อมูลของรัฐกร ศรีสุทธิ์ และสรัญยา ณ ลำปาง (2559) ระบุว่าการระบาดของโรคแอน-แทรคโนส (anthracnose) พบได้ทั่วประเทศไทย โดยโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) หรือโรคกุ้ง

แห้งสาเหตุเกิดจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* เชื้อสาเหตุสามารถถ่ายทอดจากผลพริกที่เป็นโรคสู่เมล็ดและต้นกล้าได้ ส่งผลให้ปริมาณ และคุณภาพของผลผลิตลดลงอย่างมากรวมทั้งสามารถเข้าทำลายพริกได้ ทุกระยะการเจริญเติบโตเมื่อระบาดอย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในแปลงเพาะปลูกที่มีการจัดการไม่ดีและไม่มีการป้องกันกำจัดโรคที่เหมาะสมจะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุโรคและก่อให้เกิดปัญหาในฤดูปลูกถัดไป พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ (2552) ทำการศึกษาความรุนแรงของโรคที่สำคัญในผลไม้อย่างแก้วมังกร และหาสาเหตุของโรคที่สำคัญ พบว่ามีเชื้อในกลุ่ม *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคในแก้วมังกร *C. capsica* และ *C. gloeosporioides* เข้าทำลายที่ผลของแก้วมังกรทำให้เกิดโรคผลเน่ามากถึง 2 สายพันธุ์ โดยโรคที่เกิดกับแก้วมังกรส่วนใหญ่พบในแหล่งปลูกแก้วมังกรในภาคกลางและภาคตะวันออก และมีความรุนแรงมากที่สุดในจังหวัดจันทบุรีและ *C. capsici* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคมากที่สุด เท่ากับ 32.50 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ในช่วงต้นปี 25561 ที่ผ่านมา ได้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ของโรคแอนแทรกโนสในต้นกาแฟทางภาคเหนือของประเทศไทย เนื่องจากสภาพอากาศมีความแปรปรวนหนัก ประกอบกับการละเลยในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ *C. gloeosporioides* ทำให้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกกาแฟมีการติดเชื้อโดยประมาณ 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ โรคแอนแทรกโนสมีความอันตรายต่อพืชอย่างมาก เพราะเชื้อสามารถอาศัยได้ทั้งบนต้นกาแฟและในดิน ที่สำคัญลักษณะการไหม้ของใบหรือผลไม่ได้ต่างจากการถูกแดดจัดเผา เลยทำให้เกษตรกรสังเกตได้ยากว่า ต้นกาแฟที่เป็นโรคเกิดจากสาเหตุใด อีกทั้งเชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้ แม้จะไม่มีบาดแผลใดๆ ปรากฏมาก่อน (Cannon, Damm, Johnston and Weir, 2012) นอกจากนี้เชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* spp. ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชต่างๆ ได้มากมายหลายชนิด ดังสรุปไว้ใน **ตารางที่ 2-1**

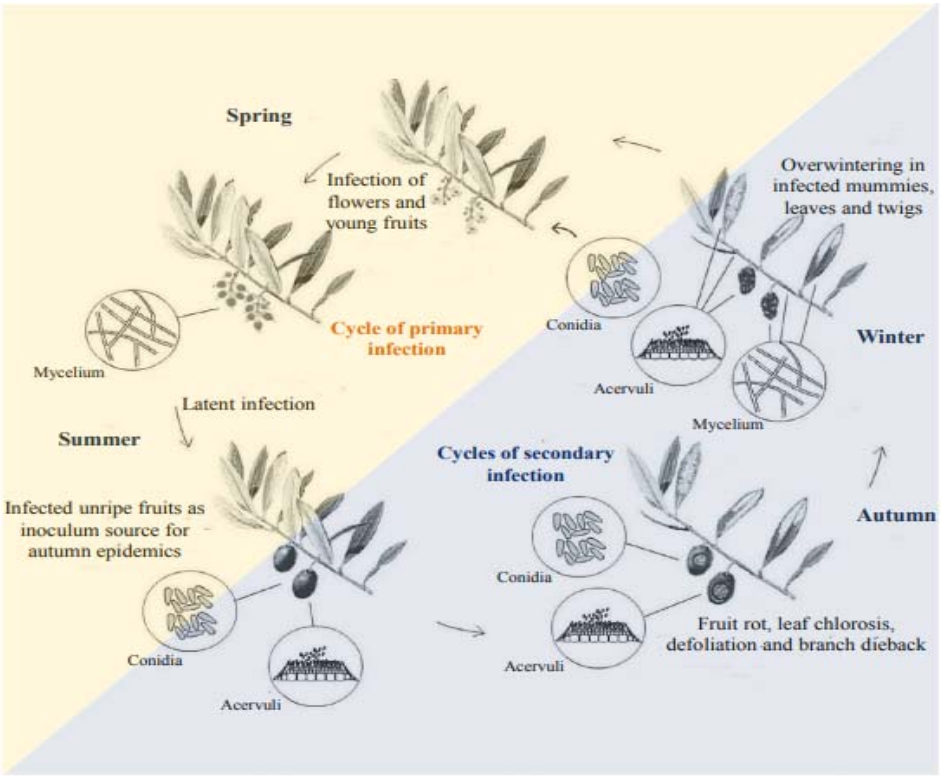
ในปี 2560 จนถึงปัจจุบัน ได้มีกลุ่มนักวิจัยจำนวนมากได้ทำการวิจัยและผลิตสารควบคุมโรคจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเกษตรกรเองได้ให้ความสนใจในการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นศัตรูของพืชมากยิ่งขึ้น ดังรายงานการวิจัยของบุญญวดี จิระวุฒิ และคณะ, 2560

พบว่าเงาะเป็นพืชที่มีเชื้อราที่เป็นศัตรูเป็นจำนวนมาก อาทิเช่น เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae, Gliocephalotrichum* spp., *C. gloeosporioides, Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญอย่างรวดเร็วและสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะ และเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้คุณภาพของผลเงาะลดลงอายุการเก็บรักษาสั้น ก่อให้เกิดอาการผลเน่าเป็นจุดสีน้ำตาลและเน่าลามอย่างรวดเร็วทั่วทั้งผล จึงได้สนใจการควบคุมโรคผลเน่าโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและกำจัดโรคที่มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ผลการวิจัยพบว่าเมื่อพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวของคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (10^8 CFU/ml) ลงบนเงาะที่ได้รับการปลูกเชื้อก่อโรค เปรียบเทียบกับพ่นด้วยน้ำ และสารอิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กรรมวิธีควบคุม) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าของเงาะ และมีประสิทธิภาพในการยับยัง ความรุนแรงของโรคไดดีกว่าอิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วย



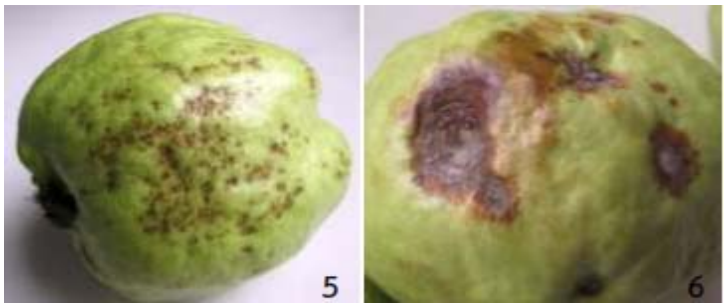
รูปที่ 2-1 แสดงลักษณะมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ชนิดต่างๆ (A) ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA; (B) ลักษณะด้านล่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA; (C) ลักษณะของ conidia; (D) ลักษณะของ conidial appressoria; (E) ลักษณะของ mycelial appressoria; (F) ลักษณะของ conidiophores. Scale bars = 10 μm สำหรับ (C–E) และ20 μm สำหรับ (F).

ที่มา : Liu F., Tang G., Zheng X. et al., 2016



รูปที่ 2-2 วัฏจักรการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

ที่มา : Cacciola et al., 2012



รูปที่ 2-3 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลฝรั่ง ที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ที่มา: สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2557

รูปที่ 2-4 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสขององุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp.
ที่มา: ปัญจมา กวางติ๊ด, 2540

ตารางที่ 2-1 แสดงชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคในพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของเชื้อ	พืช	ส่วนของพืชที่เป็นโรค
Colletotrichum gloeosporioides, *Colletotrichum* sp.	แก้วมังกร	กิ่ง (แอนแทรคโนส)
Colletotrichum gloeosporioides, *Colletotrichum* sp.	แก้วมังกร	ผล (ผลเน่าแอนแทรคโนส)
Colletotrichum gloeosporioides	มะม่วง	ใบ และผล
Colletotrichum gloeosporioides	มะละกอ	ผล (แอนแทรคโนส)
Colletotrichum sp.	เล็บครุฑ	ใบ (ใบจุด)
Colletotrichum sp.	ชะพลู	ใบ (ใบจุด)
Colletotrichum sp.	มะปราง	ใบ (ใบจุด)
Colletotrichum gloeosporioides, *Colletotrichum* sp.	หอมแดง	ใบ และ หัว (หอมเลื้อย แอนแทรคโนส)
Colletotrichum gloeosporioides, *C. capsici*, *Colletotrichum* sp.	พริก	ใบ ผล (แอนแทรคโนส)
Colletotrichum gloeosporioides, *Colletotrichum* sp.	กล้วย	ผล (แอนแทรคโนส)

ที่มา : พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร์ ดวงสอาด, 2554

ในปัจจุบันแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้คือ การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนผลไม้ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เพื่อลดการลดการใช้สารเคมีในขบวนการผลิตตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงผู้บริโภคโดยการควบคุมโรคด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและกำจัดโรคที่มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค อีกทั้งการใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง และปกป้องพืชจากเชื้อก่อโรคได้อย่างยาวนาน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

3.1.1 เชื้อราและแบคทีเรีย

- เชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่างๆ ในพื้นที่สวนผลไม้ของจังหวัดในภาคตะวันออก

- เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ซึ่งแยกได้จากดินในพื้นที่สวนผลไม้ของจังหวัดจันทบุรี ตราด และชลบุรี

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (Himedia Laboratories PVt. Ltd.)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide และ nalidixic acid

- อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2

3.1.4 อุปกรณ์

- Plate เพาะเชื้อ petri dish

- Filter กรองสารขนาดรูกรอง 0.22 µm (Corning)

- Microcentrifuge tube 1.5 ml (Kirgen)

- หลอดพลาสติกขนาด 15 และ 50 ml (Corning)

- Autopipett และ tip ขนาดต่างๆ

- Slide และcover slip
- กระบอกฉีดยา
- ขวดใส่สารขนาดต่างๆ (schott duran)
- ขวดรูปชมพู่ขนาดต่างๆ (schott duran)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (schott duran)
- กระบอกตวง (witeg®)
- หลอดทดลองขนาดต่างๆ
- ตะขอเขี่ยเชื้อ (hook)
- Cotton swap sterile
- แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil)
- ถุงมือยาง
- Autoclave tape
- ปากกา label
- กรรไกร
- Scotch tape
- กระดาษชำระ
- ถุงพลาสติกขนาดใหญ่

3.1.5 เครื่องมือ

- ตู้บ่มเชื้อ incubator (CONTHERM scientific Ltd.)
- เครื่องวัดความขุ่น densitometer (Grant-bio)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (Labnet)
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- เครื่องชั่งสาร

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ autoclave (Hirayama)

- ตู้อบความร้อน oven (Binder)

- เครื่อง vortex mixer (vortex-2 GENE®)

- ตู้แช่เย็น -20 และ 4 ºC

- ตะเกียงบุนเสน

3.1.6 สารเคมี

- 0.85% Normal saline solution (NSS)

- สีย้อม lactophenol cotton blue (LPCB)

- 70% Ethanol

- Glycerol

- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินถูกเก็บจากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี 50 ตัวอย่าง ชลบุรี 50 ตัวอย่าง และตราด 50 ตัวอย่าง รวม 150 ตัวอย่าง โดยในหนึ่งแปลงเกษตรจะถูกแบ่งเก็บจากบริเวณหัวแปลงกลางแปลง และท้ายแปลงตัวอย่างดินถูกเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml พร้อมทั้งทำการบันทึกข้อมูลของบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน หลอดบรรจุตัวอย่างดินถูกเก็บไว้ในในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 ºC เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร starch casein broth (SCB) และเจือจางตัวอย่างดินให้เป็น 10^{-4} ถึง 10^{-6} จากนั้นดูดตัวอย่างดินปริมาตร 100 µl เพื่อทำการ spread plate ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide และ nalidixic acid ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อได้เชื้อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้แล้ว ทำการเก็บ stock เชื้อโดยใช้อาหาร ISP-2 (Shirling and Gottlieb, 1996; Isaac and Jennings, 1995)

3.2.3 การแยกเชื้อ *Colletotrichum* spp.

การแยกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ทำโดยใช้วิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างที่มีรอยโรคจากผลไม้ ขนาด 5x5 mm นำไปฆ่าเชื้อภายนอกด้วย 25% Clorox (1.25% Sodium hypochloride) ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แล้วรินน้ำยาออก ล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับด้วยทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำตัวอย่างไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ผสมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย penicillin-streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำการบ่มเชื้อราให้เจริญที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจสอบด้วยการย้อมสี lactophenol cotton blue และดูลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและโคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติมัยซีทส์ในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* spp.

การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติมัยซีทส์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ด้วยเทคนิค dual culture ทำโดยการลากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแนวตั้งฉากบนอาหารชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติมัยซีทส์เจริญเต็มที่ (คาดว่าจะหลั่งสารจำพวก secondary metabolites เช่น ต้านเชื้อราสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากรอยโรคของพืชวางลง

บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีความห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ระยะประมาณ 3 cm บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน

3.2.5 การหาลำดับเบสของ 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

สุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 3 ไอโซเลทมาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเฉพาะ และทำการสกัด DNA ด้วยชุด kit เมื่อได้ DNA จากเชื้อมาแล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนส์ 16S rRNA ด้วย universal primers คือ 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' ตำแหน่งที่ 8 ถึง 27 และ 1525r (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3' ในแต่ละ PCR mixture (50 µl) ประกอบด้วย ไพร์เมอร์ (20 µM), deoxynucleoside triphosphates (25 µM), Taq polymerase buffer, genomic DNA (50-300 ng) และ Taq polymerase (2.5 U) ทำการตั้งค่าเครื่อง PCR ดังนี้คือ denaturation ที่ 95ºC เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วย 95ºC เป็นเวลา 1 นาที 55ºC เป็นเวลา 2 นาที 72ºC เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 10 นาที และ PCR products ที่ได้จะถูกตรวจสอบผลด้วย electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน TBE buffer และทำการย้อมสี DNA ด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นจึงทำการส่องดูภายใต้แสง UV การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ใช้บริการของบริษัทเอกชนนอกประเทศคือ Macrogen เมื่อได้ผลจากทางบริษัทแล้ว นำผลของ DNA sequence ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อทำการระบุชนิดของเชื้อ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรกรรม

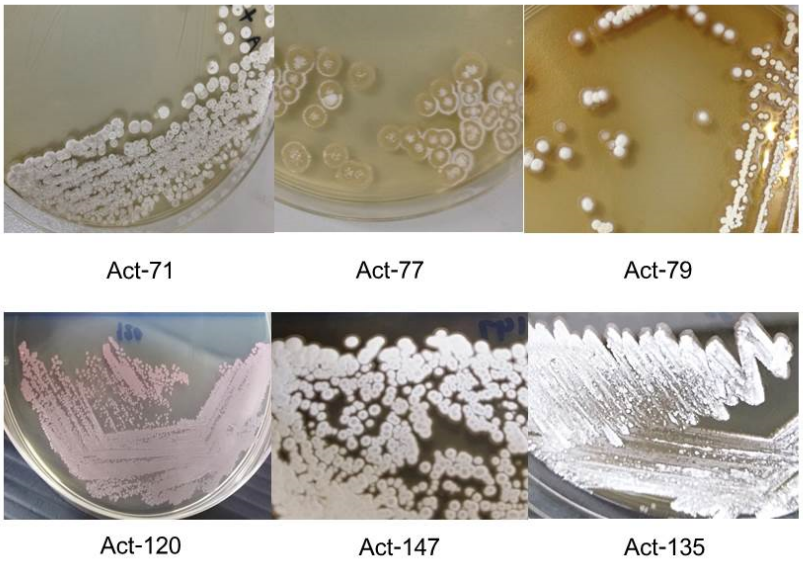
ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 50 ตัวอย่าง จากสวนผลไม้ซึ่งมีการเพาะปลูกเงาะ มังคุด ลองกอง กล้วย และฟักทอง ในจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี และตราด

รูปที่ 4-1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในสวนผลไม้ในจังหวัดภาคตะวันออก

4.2การแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง ถูกนำมาชั่งให้มีปริมาณ 1 g ใส่ลงในอาหาร starch casein broth (SCB) และเจือจางตัวอย่างดินให้เป็น 10^{-4} ถึง 10^{-6} จากนั้นดูดตัวอย่างดินปริมาตร 100 µl เพื่อทำการ spread plate ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide, nalidixic acid และ fluconazole ผสมอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อแยกเชื้อ Actinomycetes ได้แล้ว (ส่วนใหญ่แล้วโคโลนีจะปรากฏภายใน 7 วัน) ทำการเก็บ stock เชื้อโดยใช้อาหาร ISP-2

รูปที่ 4-2 การคัดเลือกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนผลไม้



รูปที่ 4-3 เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินในสวนผลไม้ของภาคตะวันออก

เมื่อโคโลนีของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะขรุขระ ขอบไม่เรียบ โคโลนีแห้ง คล้ายลักษณะของเชื้อราแต่ไม่มีการสร้างเส้นใย ดังแสดงใน**รูปที่ 4-2** เขี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (cross streak) เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นให้ทำการเก็บเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน**รูปที่ 4-3** และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ 20% glycerol เก็บไว้ที่อุณหภูมิและตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ผลจากการแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนผลไม้ซึ่งมีการเพาะปลูกมังคุด และเงาะในจังหวัดจันทบุรี เงาะและลองกองจากจังหวัดตราด กล้วยและฟักทอง จากจังหวัดชลบุรี พบว่าสามารถแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ได้ 549 ไอโซเลท แต่ทางผู้วิจัยได้นำเชื้อมาทำการทดลองการต้านเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เพียง 150 ไอโซเลท รายละเอียดแสดงไว้ใน**ตารางที่ 4-1**

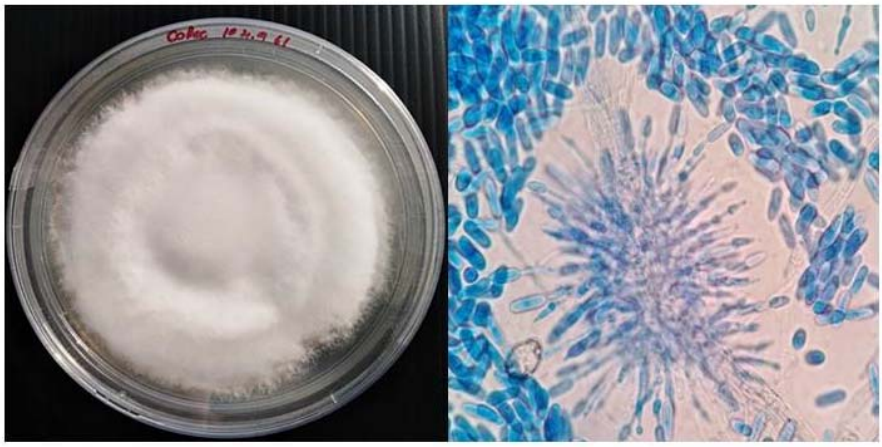
ตารางที่ 4-1 แสดงจำนวนของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่แยกได้จากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี ชลบุรีและตราด

จังหวัด	บริเวณที่ปลูกผลไม้	จำนวน Actinomycetes ที่แยกได้ (n = 549)	จำนวนที่นำมาทดสอบการต้านเชื้อรา (n = 150)
จันทบุรี	มังคุด	96	25
	เงาะ	48	25
ชลบุรี	สวนฟักทอง	150	25
	สวนกล้วย	60	25
ตราด	เงาะ	100	25
	ลองกอง	95	25

4.3 การแยกเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* spp. จากผลไม้

<u>วิธีทำ</u> ทำการแยกเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยใช้วิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่าง ขนาด 5x5 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อภายนอกด้วย 25% Clorox ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แล้วรินน้ำยาออก ล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ผสมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย penicillin-streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำการบ่มเชื้อราให้เจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจสอบด้วยการย้อมสีและดูลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและโคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 4-4 ลักษณะรอยโรคแอนแทรคโนสที่เกิดในผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว

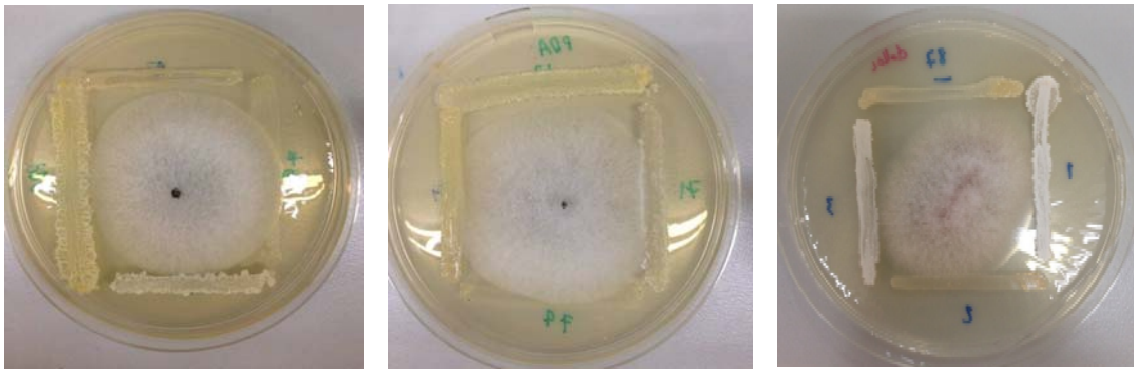


รูปที่ 4-5 ลักษณะโคโลนีและแมคโครโคนิเดียของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.
ที่แยกได้จากผลไม้ที่ติดเชื้อ

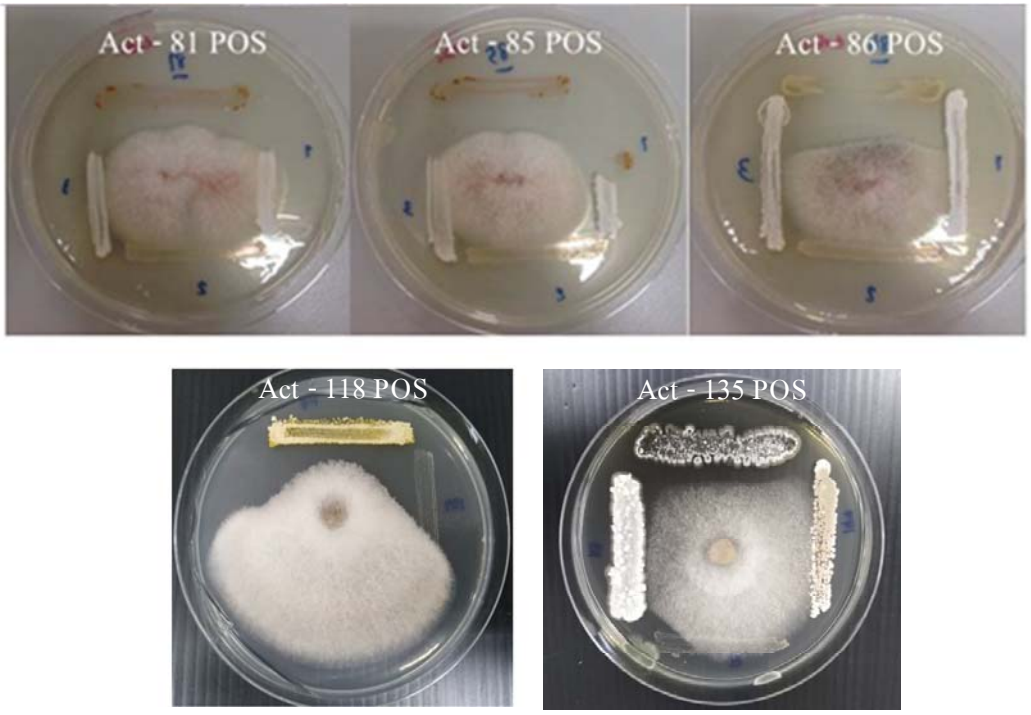
4.4 การทดสอบเชื้อ Actinomycetes ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

การคัดเลือกเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยเทคนิค dual culture ทำโดยเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแนวตั้งฉากบนอาหารชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติมัยซีทส์เจริญและหลั่งสารต้านเชื้อราสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยก

ได้จากรอยโรคของพืชวางลงตรงกลางจานเพาะเลี้ยงให้ห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ระยะ 3 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทำการอ่านผล ผลการทดลองใน **ภาพที่ 4-5** คือผลลบต่อการทดสอบ และ**ภาพที่ 4-6** คือผลบวกต่อการทดสอบ โดยเชื้อ Act-62, 75, 79, 81, 85, 86, 114, 116, 117, 118, 120, 124, 125, 127, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 141, 142 และ 147 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้ โดยลักษณะของโคโลนีของเชื้อ Actinomycetes ได้แสดงไว้ใน**ตารางที่ 4-2**



รูปที่ 4-6 ผลทดสอบเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp.



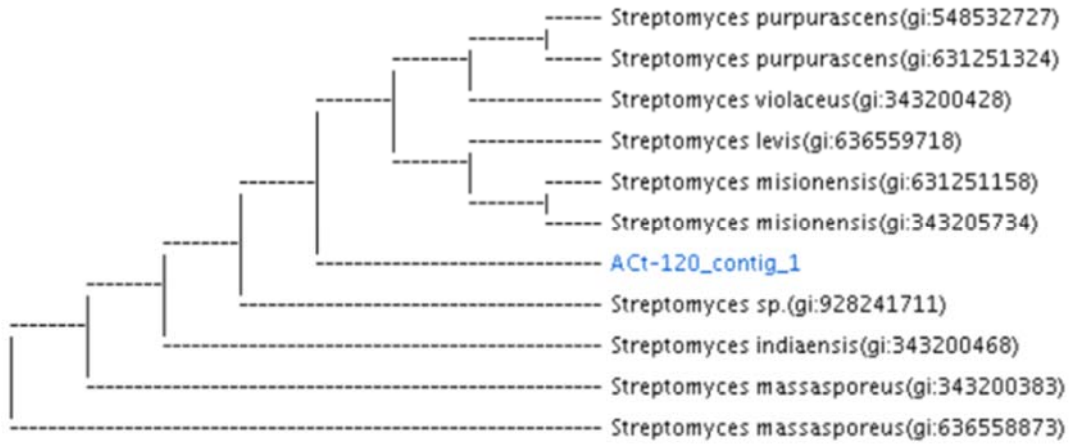
รูปที่ 4-7 ผลการทดสอบการต้านการเจริญของกลุ่ม Actinomycetes ที่มีต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยวิธี Dual culture

ตารางที่ 4-2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Actinomycetes ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

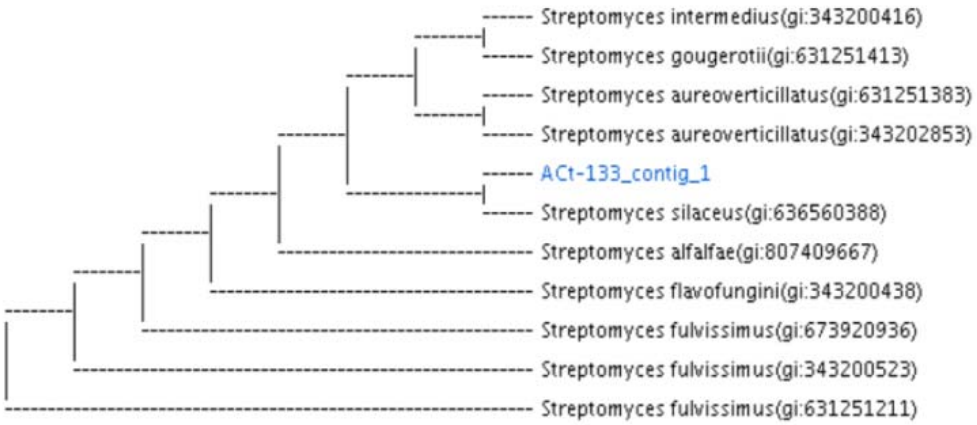
รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Act-62	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-75	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-79	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-81	โคโลนีสีครีม สร้างพิกเมนต์สีม่วง
Act-85	โคโลนีสีครีม มัน-วาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาลอ่อน
Act-86	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-114	โคโลนีสีเหลือง ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-116	โคโลนีสีครีม ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-117	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-118	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-120	โคโลนีสีม่วง ขนาด 2 มิลลิเมตร สร้างพิกเมนต์สีม่วง
Act-124	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-125	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-127	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-130	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-131	โคโลนีสีขาว-ครีม ขอบโคโลนีด้าน
Act-132	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบน ขนาดเล็ก
Act-133	โคโลนีสีครีม อายุมากขึ้นจะมีการสร้างเส้นใย
Act-135	โคโลนีสีครีม โคโลนีด้าน อายุมากขึ้นมีการสร้างเส้นใยสีขาว
Act-136	โคโลนีสีครีม เมื่ออายุมากขึ้นจะเป็นสีเหลือง โคโลนีด้าน
Act-141	โคโลนีสีครีม-ขาว ตรงกลางนูนวาว ผิวรอบโคโลนีด้าน
Act-142	โคโลนีสีครีม ขนาด 2 มิลลิเมตร โคโลนีแห้ง
Act-147	โคโลนีสีครีม อายุมากขึ้นมีการสร้างเส้นใยสีขาว

เมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 23 ไอโซเลท และนำมาทำการหาลำดับเบส ของ DNA ของ 16s rRNA เพื่อทำการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-120, Act-133 และ Act-135 คือเชื้อ *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces cavourensis* ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 4-7** และ **4-8**

รูปที่ 4-8 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces cavourensis*

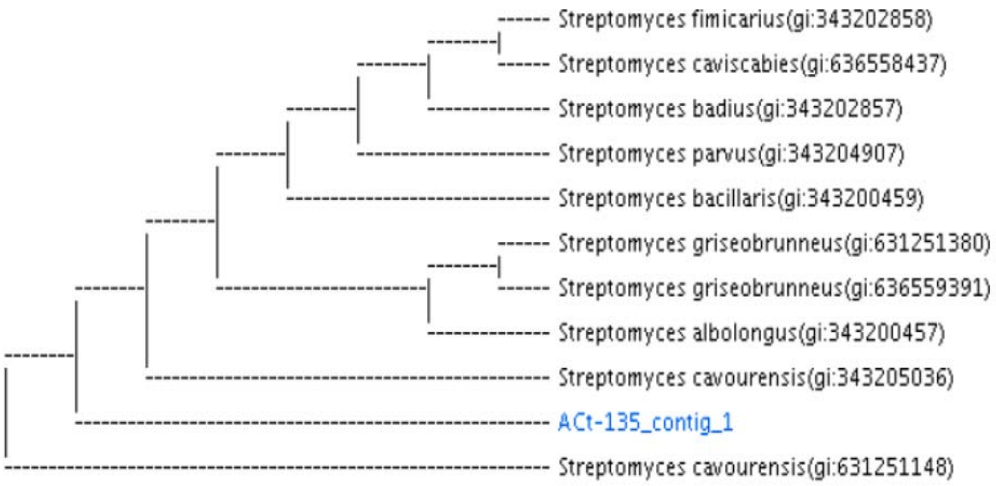


รูปที่ 4-9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส DNA ของ 16s rRNA ของเชื้อ Act-120 *Streptomyces purpurascens*



รูปที่ 4-10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส DNA ของ 16s rRNA

ของเชื้อ Act-133 *Streptomyces silaceus*



รูปที่ 4-11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส DNA ของ 16s rRNA

ของเชื้อ Act-135 *Streptomyces cavourensis*

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การเกษตรในทุกภาคส่วนของประเทศไทย ไม่เว้นแม้แต่จังหวัดจันทบุรี ได้มีการส่งออกสินค้าทางการเกษตรเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทุเรียน มังคุด เงาะ สละ ฯลฯ ในการทำการเกษตรต่างๆ เหล่านี้ได้มีการใช้ตัวช่วยเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มีมากขึ้นและเพื่อป้องกันความเสียหายของพืชผล โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มักจะเลือกใช้สารเคมี อาทิ สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง และสารกำจัดเชื้อรา (กรมวิชาการเกษตร, 2557) ซึ่งสารเคมีต่างๆ เหล่านี้ส่งผลต่อระบบนิเวศน์ การเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันพืชเศรษฐกิจจากโรคเชื้อราเป็นจำนวนมาก และเป็นเวลานานหลายปี ยังผลให้เชื้อราหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมหรือดินในพื้นที่การเกษตรต่างๆ อาจเกิดการปรับตัวดื้อต่อยาที่ใช้ในทางเกษตรกรรม ทั้งที่เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เช่น *Erysiphe spp., Sphaerotheca sp., Phyllactinia spp., Phyllachora sp.* และ *Glomerella spp.* (Klaassen, C. H., et al., 2010) และเชื้อราฉวยโอกาสที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Aspergillus fumigatus*

จากเหตุผลข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงได้พยายามทำการวิจัยเพื่อใช้การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) มาใช้แทนการใช้สารเคมีหรือเพื่อลดการใช้สารเคมี การควบคุมทางชีวภาพนี้ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมากทางการแพทย์ เภสัชกรรม การเกษตรและภาคอุตสาหกรรม เพราะสามารถสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนมังคุดและมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว

ผลการศึกษาวิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกเชื้อ Actinomycetes จากดินในสวนมังคุดและเงาะในจังหวัดจันทบุรีและตราด ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่าเชื้อ Actinomycetes จำนวน 23 ไอโซเลท ได้แก่ Act-62, 75, 79, 81, 85, 86, 114, 116, 117, 118, 120, 124, 125, 127, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 141, 142 และ Act-147 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ และเมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 23 ไอโซเลท เพื่อนำมาทำการหาลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA สำหรับการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-120, Act-133 และ Act-135 คือเชื้อ *Streptomyces purpurascens Streptomyce silaceus* และ *Streptomyces cavourensis* ตามลำดับ เชื้อทั้งสามชนิดที่ได้ พบว่าไม่ปรากฏหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ และการแพทย์ว่าเป็นเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ และในพืช ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างสูงในการนำเชื้อทั้งสามไอโซเลทนี้มาทำการพัฒนาเพื่อใช้ยับยั้งโรคติดเชื้อราจาก *Colletotrichum* spp.

การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการควบคุมทางชีวภาพโดยเชื้อ Actinomycetes นั้นมีการศึกษาคุณสมบัติกันอย่างหลากหลาย เช่น anti-bacterial activity โดยพบว่าเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Gram positive bacteria โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* (Procopio, Silva, Martins, Azevedo, & Araujo, 2012) Actinomycetes ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Gram negative bacteria และเชื้อในกลุ่มยีสต์ได้เพียงเล็กน้อยซึ่งอาจจะมีผลมากจากลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 40 % นอกจากคุณสมบัติ anti-bacterial activity ยังพบว่า เชื้อ Actinomycetes ยังมีคุณสมบัติ antifungal activity ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรค die-back disease ในพืช (Kamara and Gangwar, 2015) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shimizu, (2010) ซึ่งได้กล่าวว่าเชื้อ Actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum orbiculare* และ *Pestalotiopsis sydowiana* ได้ และสาร secondary metabolite จากเชื้อ Actinomycetes ที่ถูกสกัดด้วย acetone มีคุณสมบัติในการ

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา รวมถึงสามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* (Kamara and Gangwar, 2015) โดยเชื้อ Actinomycetes อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการดูดซึมอาหาร และสาร secondary metabolites ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช รายงานการวิจัยก่อนหน้า พบว่าเชื้อ Actinomycetes มากกว่าร้อยละ 49 สามารถผลิตสาร metabolites ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ส่วนจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคชนิดใดนั้น ขึ้นกับสกุลและชนิดของเชื้อ (Lemriss et al, 2003)

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ Actinomycetes มีประโยชน์หลากหลาย มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อราพืชได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสและผลเน่าในผลไม้หลายชนิด รวมไปถึงพืชทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศและทั่วโลก

ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้ จะทำให้เกิดการลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ส่งผลให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิต เพิ่มผลผลิตของต้นมังคุดเนื่องจากต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดี ลดการตกค้างของสารเคมีในผลไม้ทำให้ไม่ประสบปัญหาการกีดกันจากการส่งออก จากเหตุผลดังกล่าวจะนำไปสู่การนำรายได้เข้าประเทศได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. ศูนย์ข้อมูลผลไม้ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ๒๕๕๗. แหล่งสืบค้น : http://www.oae.go.th/fruits/index.php/mangosteen-data. ๑๐ มิถุนายน ๒๕๕๗
2. กรมส่งเสริมการเกษตร, ๒๕๔๑. โรคขอบใบแห้งในมังคุด (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=41/. ๑ มิถุนายน ๒๕๕๗
3. กรมส่งเสริมการเกษตร, ๒๕๔๑. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : http://www.doa.go.th/pprdo/download/text2.pdf. ๙ มิถุนายน ๒๕๕๗
4. เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, (๒๕๕๐). ประวัติความเป็นมาของมันสัมปะหลัง. (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php?qID=&wi=&hnl=&ob=&asc=&q=%BB%C3%D0%C7%D1%B5%D4%A4%C7%D2%C1%E0%BB%E7%B9%C1%D2%A2%CD%A7%C1%D1%B9%CA%D3%BB%D0%CB%C5%D1%A7&select=1. ๑๐ ธันวาคม ๒๕๖๑
5. ศูนย์วิเคราะห์เศรษฐกิจทีเอ็มบี, (๒๕๖๑). วิเคราะห์ 5 พืชเศรษฐกิจ ชี้นำเศรษฐกิจภูมิภาค ฉบับวันที่ ๑๘ มีนาคม ๒๐๑๘ ไทยพับลิก้า. (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : https://thaipublica.org/2018/03/tmb-analytics-14-3-2561/ ๑๐ ธันวาคม ๒๕๖๑
6. หนังสือพิมพ์มติชนเทคโนโลยีเกษตร, (๒๕๕๗). พิรุณ1 มันสาปะหลังพันธุ์ ใหม่ . (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น: http://www.technologychaoban.com/news_detail.php?tnid=919. ๑๐ ธันวาคม ๒๕๖๑
7. รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว, (๒๐๑๐). โรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและแนวทางการป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น:

http://soclaimon.wordpress.com/2010/06/11. ๑๐ ธันวาคม ๒๕๖๑

8. นิศากร สุวรรณ และคณะ. 2556. การประเมินประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและเชื้อแอกติโนมัยซีทในการควบคุมเชื้อรา *Nalanthamala psidii* สาเหตุโรคเหี่ยวของฝรั่ง. สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 392-393 ; 391-403
9. นริสา จันทร์เรือง, อุไร จันทรประทิน, พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, บุตรี พุทธรักษ์ และ บัญญัติ สิทธิผล. 2552. ความผันแปรของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของยางพารา. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร และศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร
10. เนตรนภิส เขียวขำ และ สมศิริ แสงโชติ. 2551. รายงานวิจัยการเกิดโรคและสาเหตุการเข้าทำลายในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่า
11. บุญญวดี จิระวุฒิ, อมรา ชินภูติ และ รัตตา สุทธยาคม. 2560. โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
12. ปัญจมา กวางติ๊ด. 2540. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ในการคบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
13. พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร์ ดวงสะอาด. 2554. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 1900-1907
14. พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด. 2554. การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
15. พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และชนินทร ดวงสอาด และ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2554. ศึกษาการจัดการโรคพืชที่เหมาะสมในการผลิตแก้วมังกร กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

16. รุ่งทิพย์ สังข์เผือก. 2554. การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
17. รัฐกร ศรีสุทธี. 2549. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
18. รัฐกร ศรีสุทธี และ สรัญยา ณ ลำปาง. 2550. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค ISSR. วารสารเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 23(2): 89-96. 1-138
19. สุธาสินี ชัยชนะ และ สรัญยา ณ ลำปาง. 2550. การตรวจสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์ เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38(5) พิเศษ: 205-208.
20. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2557. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว
21. หทัยชนก คงแก้ว. 2546. การพัฒนาชุดไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจ *Colletotrichum* spp. บนเมล็ดพริก. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
22. Alvarez, A. M., and Nishijima, W. T. 1987. Postharvest diseases of papaya. Plant Disease. 71: 681-686.
23. Ainswoth, G. C. 1973. Introduction and keys to higher taxa. In The Fungi (G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow, and A. S. Sussman, Eds.) pp. l-7. Academic Press, New York.
24. Bailey, J.A. and Jeger, M.J., 1992. *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. CAB International, Kew. 370-380.

25. Benimeli C.S., Fuentes M.S., Abate C.M., and Amoroso M.J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by Streptomyces sp. M7 and its effects on Zea mays growth. International Biodeterioration & Biodegradation. 61: 233–239.
26. Castillo A. E., J. Rojas, R. Monteros Solito, I. Nardelli y G. Guasch. 2003. Métodos paradeterminar Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato). Agrotecnia (Argentina) 10: 15-20.
27. Cacciola S.O., Faedda R., Sinatra F., Agosteo G.E., Schena L., Frisullo S., Magnano di San Lio G., 2012. Olive Anthracnose. Journal of Plant Pathology. 94: 29-44.
28. Cannon, P.F., Damm, U., Jonhston P.R. and Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181–213.
29. Cano, J., Guarro, J. and Gene, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology**.** 42(6) : 2450 – 2454.
30. Cross, T. and M. Gooodfellow, 1973. Taxonomy and classification of actinomycetes. Soc. Applied Bacteriol. Symp. Ser., 2: 11-112.
31. Cook, A. A. 1975. Diseases of tropical and subtropical fruit and nuts. Hafner Press, New York.
32. Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization *Colletotrichum* species -esponsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Dis. 82: 596-605.
33. Gesheva V. 2002. *Rhizosphere microflora* of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. Europe. J. Soil Biol. 38:85-88.
34. Goodfellow, M., S. T. Williams and M. Mordarski. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London.

35. Holliday. P. 1980. Fungus Disease of Tropical Crops. Cambridge University Press, Cambridge.
36. Hyde, K., Cai, L., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J., & Prihastuti, H. (2009). Colletotrichum: a catalogue of confusion. Fungal Diversity, 39(1).
37. Isaac, S. and D. Jennings. 1995. Microbial Culture. Bios Sci. Publ. Limited, London.
38. Kamara, V. and Gangwar, M. Antifungal Activity of Actinomycetes from Rhizospheric Soil of Medicinal plants against phytopathogenic fungi. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci (2015) 4(3):182-187.
39. Klaassen C. H., de Valk H. A., Curfs-Breuker I. M., Meis J. F., Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in Aspergillus fumigatus and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. J Antimicrob Chemother, 2010. 65(5): p. 901-5.
40. Lemriss S., and Laurent F., (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Canadian Journal of Microbiology 49(11): 669-74.
41. Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Gong, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of Colletotrichum species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. Scientific Reports, *6*, 32761.
42. Samac *et al*., 2003. Effects of antibiotic-producing Streptomyces on nodulation and leaf spot in alfalfa. Applied soil Ecology 22 (2003). 55 ; 55-66
43. Procopio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., & Araujo, J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *Braz J Infect Dis, 16*(5), 466-471.

44. Schwyn B, Neilands JB. 1996. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Journal of Analytical Biochemistry 49 : 47-56
45. Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F. and Duarte, M.C.T. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1185-1195.
46. Shirling, E.D. and Gottlieb, D. 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16 ; 313-340.
47. Masafumi Shimizu. (2011). Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters. Bacteria in Agrobiology: Plant Growth .
48. Stackbrandt, E., F.A.Rainey, and N.L.Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.Int.J.Syst.Bacteriol. 47:479-491.
49. Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colltotrichum* species isolate from strawberry. Plant disease**.** 74: 69-76.
50. Snelders, E., S. M. Camps, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, G. H. Kema, H. A. van der Lee, C. H. Klaassen, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2012). "Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in Aspergillus fumigatus." PLoS One 7(3): e31801.
51. Snelders, E., R. A. Huis In 't Veld, A. J. Rijs, G. H. Kema, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2009). "Possible environmental origin of resistance of Aspergillus fumigatus to medical triazoles." Appl Environ Microbiol 75(12): 4053-4057.
52. Snelders, E., A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, P. E. Verweij and W. J. Melchers (2010). "Azole resistance profile of amino acid changes in Aspergillus fumigatus

CYP51A based on protein homology modeling." Antimicrob Agents Chemother 54(6): 2425-2430.

53. Snelders, E., H. A. van der Lee, J. Kuijpers, A. J. Rijs, J. Varga, R. A. Samson, E. Mellado, A. R. Donders, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2008). "Emergence of azole resistance in Aspergillus fumigatus and spread of a single resistance mechanism." PLoS Med 5(11): e219.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS) ..... สัญญาเลขที่ 34/2560 (เพิ่มเติม)
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาการยับยั้งเชื้อราคอลเลโททริคัมที่ก่อโรคในพืชจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2559 ถึงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2562
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 8 เดือน ตั้งแต่วันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่รับ

งวดที่ 1 (50%)	**219,000**	**บาท**	**เมื่อวันที่ 15/07/2560**
งวดที่ 2 (40%)	**175,200**	**บาท**	**เมื่อวันที่ 27/03/2561**
งวดที่ 3 (10%)	**43,800**	**บาท**	**เมื่อวันที่ 27/02/2562**
รวม	**438,000**	**บาท**	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินตงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน **1.1 ค่าตอบแทนผู้วิจัย (10%)**	**43,800**	**43,800**	**0**
2. ค่าจ้าง **2.1 ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย (12 เดือน)**	**144,000**	**144,000**	**0**
3. ค่าวัสดุ **3.1 วัสดุสำนักงานต่างๆ** **3.2 วัสดุเพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ** - **ค่าวัสดุฟุ่มเฟือยใช้แล้วทิ้ง เช่น plastic wares จำพวก 6-well plates, หลอดเก็บ**	 **5,000** **171,400**	 **5,000** **171,400**	 **0** **0**

ตัวอย่างดินขนาด 15 และ 50 ml, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ, tip, หัวกรองยาขนาด 0.22 ไมโครเมตร - เครื่องแก้วต่างๆ - ค่ายาปฏิชีวนะสำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรีย - ค่ายาปฏิชีวนะสำหรับยับยั้งเชื้อรา - ค่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น PDA, YPD - ค่าสารเคมีอื่นๆ เช่น ethanol, NaCl, cholrox และอื่นๆ			
4. ค่าใช้สอย 4.1 ค่าเชื้อเพลิงรถยนต์สำหรับเดินทาง 4.2 ค่าเก็บตัวอย่างดินและผลไม้ที่มีรอยโรคในพื้นที่เกษตรกรรม	15,000 15,000	15,000 15,000	0 0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ 6.1 ค่าสาธารณูปโภค (10%)	43,800	43,800	0
รวม	438,000	438,000	0

.....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ภาคผนวก

การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดินบริเวณรากของพืชเพื่อศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อ **Colletotrichum gloeosporioides** สาเหตุของโรคแอนแทรกโนส

Actinomycetes isolate from plant rhizosphere soils against **Colletotrichun gloeosporioides** cause of Anthracnose

อภิญญา บุญเขียน[1], พรทิพย์ พลาดิศัยเลิศ[2], มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม[3],

มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[1,2] และวิทวัส แจ้งเอี่ยม[4,*]

Apinya Bunkhean[1], Pornthip Paladisailerd[2], Maneerat Koohapitagtam[3],

Marut Tangwattanachuleeporn [1,2] and Wittawat jeangaium[4,*]

บทคัดย่อ

เชื้อรา **Colletotrichum** spp.เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่า โรคใบจุด มักพบระบาดในช่วงฤดูฝน ที่เข้าทำลายพืชที่สำคัญต่อเศรษฐกิจหลายชนิด อาทิ เงาะ มังคุด ทุเรียน มะม่วง มะละกอ ยางพารา มันสำปะหลัง ลองกอง กล้วยไม้ เป็นต้น เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชทั้งในระยะอ่อนแอ และระยะสมบูรณ์ ก่อนการเก็บเกี่ยว ช่วงของการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยว สายพันธุ์ก่อโรครุนแรงส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเจริญเร็ว ดังนั้นเป้าหมายของการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดินในพื้นที่การเกษตร ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.จากนั้นทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 150 ไอโซเลท ด้วยวิธี Dual culture technique จากผลการทดสอบพบว่า มี 23 ไอโซเลทที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ได้ ภายหลังทำการสุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 3 ไอโซเลท คือ Act-120, Act-133 และ Act-135 เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNA พบว่าคือเชื้อ **Streptomyces purpurascens**, **Streptomyces silaceus** และ **Streptomyces cavourensis**

คำสำคัญ : **Colletotrichum** spp**,** แอคติโนมัยซีสต์, ต้านการเจริญของเชื้อรา

บทนำ

แอคติโนมัยซีสต์เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่มีการสร้างสปอร์ และหลายสายพันธุ์มีการสร้างเส้นใย ทั้งเส้นใยชนิดที่เจริญเหนือผิวหน้าอาหาร (Aerial mycelium) และเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวหน้าอาหาร แหล่งที่อยู่อาศัยพบมากในดิน ตลอดจนในพื้นที่หนาวเย็นอย่าง Antarctica (Moncheva, Tishkv, Dimitrova, Chipeva, Antonova, & Bogatzevska, 2012) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีสต์ยังเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการทำให้สารอาหารที่จำเป็นต่อพืชอยู่ในลักษณะที่พืชสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง ทำให้พืชมีความทนทานต่อภาวะเครียด ตลอดจนการผลิตฮอร์โมนอย่างเช่น Phytohormones และเป็นจุลินทรีย์ควบคุมทางชีวภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชด้วยการสร้างสาร Antifungal และ Antibacterial (Nath, Verma, Singh, Singh Chauahan, Suman , & Kumar, 2017)

Colletotrichum gloeosporioides คือเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส และโรคผลเน่า สามารถทำให้พืชหลากหลายชนิดทั่วโลกเกิดโรค อาทิ ไม้ดอกไม้ประดับพืชไร่และวัชพืช อีกทั้งยังพบว่าเป็นชนิดที่ก่อโรคมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราในกลุ่ม **Colletotrichum**(รัฐกร ศรีสุทธิ และสรัญย ณ ลำปาง, 2550) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไม้ผลที่เชื้อราดังกล่าวสามารถเข้าทำลายพืชให้เกิดความเสียหายได้ในทุกระยะของการเจริญ นับตั้งแต่ระยะต้นอ่อน เจริญบนแปลงเพาะปลูก ตลอดจนช่วงของการเก็บเกี่ยวและระยะหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต เชื้อราชนิดนี้ยังสามารถทำให้เกิดการเน่าเสียของผลอ่อนและผลสุกของพืชผล (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร) จนทำให้เชื้อราก่อโรคพืช **C. gloeosporioides** ชนิดนี้จัดอยู่ในเชื้อรา 1 ใน

10 ชนิดที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้แก่เกษตรกรผู้เพาะปลูก (Dean, Rudd, Dickman, Kahmann, Ellis, & Foster, 2012) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีในระยะเริ่มแรกจะมีสีขาวเมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีเทาอ่อน สร้างโคนิเดียสีส้มเรียงเป็นวง **C. gloeosporioides** จะมีการสร้างฟรุตติ้งบอดี้แบบอะเซอวูลัส ภายในประกอบด้วยโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดีย มีลักษณะทรงกระบอก หัวท้ายมน ไม่มีสี ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกเป็นจุดแผลฉ่ำน้ำ แผลยุบตัวลง ขยายเน่าลาม แผลเป็นวง ต่อมาเชื้อราสร้างกลุ่มของสปอร์เป็นเมือกเหนียว (slimy mass) สีชมพู สีส้ม หรือสีแดงอมส้มบนแผลบนผลของผลไม้ (กรมวิชาการเกษตร)

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภทที่ใช้กำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคพืชดังกล่าว แต่การสารเคมีกำจัดโรคแต่ละครั้งนั้นมีข้อดีเพียงการกำจัดเชื้อราชั่วคราว แต่กลับสร้างผลกระทบระยะยาวให้กับหลายด้าน นับตั้งแต่ล่างสุดคือผืนดิน น้ำ ตลอดจนอากาศ ทางด้านสาธารณสุข และผู้ใช้เอง ดังที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จึงได้สร้างงานวิจัยนี้ขึ้นเพื่อหาแนวทางในการแก้ปัญหาให้แก่เกษตรกรที่ต้นเหตุ และไม่ก่อเกิดผลกระทบในทางลบต่อด้านต่างๆ

วิธีการแยกเชื้อ **Colletotrichum** spp.ด้วยวิธี tissues transplanting method

เก็บตัวอย่างใบและส่วนของกิ่งจากต้นมังคุด เงาะ และทุเรียน ที่มีอาการของโรคใบไหม้ จากนั้นใช้มีดหรือกรรไกรที่ปราศจากเชื้อตัดชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคขนาด 3x5 เซนติเมตร ทำการฆ่าเชื้อพื้นผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยการนำชิ้นส่วนแช่ทั้งหมดแช่ลงในสารสารละลายคลอร๊อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 – 4 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชที่มีรอยโรคทั้งหมดวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มเชื้อไว้นาน 2-3 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยปลายเส้นใยเลี้ยงในจานอาหาร PDA ใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะของโคโลนี ทำสไลด์เพื่อศึกษารูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อ **Colletotrichum** spp. (พีระวรรณ พัฒนาวิภาส, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทัศนาพร ทัศดร และศิวิไล ลาภบรรจง, 2551)

วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ในการเกษตรในแต่ละพื้นที่โดยเลือกเก็บในบริเวณใกล้กับรากพืชปริมาณ 1 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย NaCl 0.85% จากนั้นทำการเจือจางจนถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-5} ดูดสารละลายในแต่ละค่าการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ cycloheximide และ nalidixic acid เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียบางกลุ่ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีสต์เบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงทำการย้อมสีด้วยวิธี Gram staining ติดสี Gram positive คัดแยกให้บริสุทธิ์ ทำการรักษาเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส (Komar, Kant, Mishra, & Pachouri, 2010)

ทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา

ทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยซีสต์ของแต่ละไอโซเลทกับเชื้อราก่อโรคพืช **C. gloeosporioides** ด้วยวิธี Dual culture โดยการขีดเชื้อแอคติโนมัยซีสต์บนอาหาร PDA ทั้ง 4 ด้าน ของจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้คอกบอยเลอร์ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่กำลังเจริญ วางที่จุดกึ่งกลางจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส หลัง 7 วัน ทำการเช็คผล โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ (Krucharoenphaisan, Rodbagpong, Saengpaen, & Sinma, 2016).

ผลการทดสอบ

ผลการทำ tissues transplanting method พบว่าเป็นเชื้อ **Colletotrichum** spp.ภาพที่1 แอคติโนมัยซีสต์ทั้งหมดที่คัดเลือกจากดินภาพที่2 และลักษณะโคโลนีได้บันทึกดังตารางที่1 จากนั้นเลี้ยงให้บริสุทธิ์นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ทุกโอโซเลทจะถูกทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยประเมินจากการเจริญของเส้นใยด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ภาพที่3 ในการรายงานผลการทดสอบใช้การสังเกตการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร หากแอคติโนมัยซีสต์มีการผลิตสารต้านเชื้อราที่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใย จะพบว่าเส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญสัมผัสกับรอยการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จึงให้ผลเป็นบวก นอกจากนี้ทุกไอโซเลทมีการผลิตสารที่มีผลต้านการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ซึ่งจะแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีที่เปลี่ยนไป จาก สีเหลืองอ่อนใส ไปเป็นสีเหลือง สีน้ำตาล และสีม่วง-แดง หลังจากบ่มให้เจริญเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเส้นใยเชื้อรามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ในบริเวณที่สารแพร่ไปถึง จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ Act-62, Act-75, Act-79, Act-81, Act-85, Act-86, Act-114, Act-116, Act-117, Act-118, Act-120, Act-124, Act-125, Act-127, Act-130, Act-131, Act-132, Act-133, Act-135, Act-136, Act-141, Act-142 และ Act-147 มีความสามารถในการต้านการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช **Colletotrichum** spp.และจากผลการสุ่มแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 3 ไอโซเลท ดังนี้ Act-120, Act-133 และ Act-13 เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNA พบว่า Act-120 โคโลนี สีม่วง ขนาด 2 มิลลิเมตร ผิวหยาบ สร้างเส้นใยและสร้างพิกเมนต์สีแดง คือ **Streptomyces purpurascens** Act-133 โคโลนีสีครีมทึบแสง อายุมากขึ้นโคโลนีจะแตกออกและสร้างพิกเมนต์สีเหลือง คือ **Streptomyces silaceus** และ Act-135 โคโลนีสีครีม นูน ทึบแสง ด้าน อายุมากขึ้นมีผงสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล คือ **Streptomyces cavourensis** ซึ่งทุกชนิดจัดอยู่ในอาณาจักรของแบคทีเรีย วงศ์ Streptomycetaceae และอยู่ในสกุล Streptomyces และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด

อภิปรายผลการทดสอบ

จากผลการทดสอบด้วยวิธี Dual culture technique ของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 150 ไอโซเลท กับเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนส **Colletotrichum** spp.โดยดำเนินการสองขั้นตอน ขั้นตอนแรก นำเชื้อแอคติโนมัยซีสต์บริสุทธิ์ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้เชื้อเจริญมีอายุ 7 วันที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ขั้นตอน

ต่อมาคือการนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ที่มีความสมบูรณ์ และอยู่ในสภาวะกำลังเจริญ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นวุ้นประมาณ 6 มิลลิเมตร ซึ่งได้จากการตัดโดยใช้คอกบอยเลอร์ บ่มภายใต้อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส หลัง 7 วัน ทำการเช็คผล โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ ซึ่งพบว่า มี 23 ไอโซเลท สามารถต้านการเจริญ **Colletotrichum** spp.ได้ และแอคติโนมัยซีสต์ทั้งหมดเป็นแกรมบวก มีการผลิตรงควัตถุสีต่างๆ เช่น แดง เหลือง น้ำตาล และแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแอคติมัยซีสต์มีประสิทธิภาพมากพอที่จะใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชเพื่อลดความสูญเสียที่เกิดจาก **Colletotrichum** spp.แอคติโนมัยซีสต์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ทำการสุ่ม พบว่าไม่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อ **Streptomyces** หรือก่อให้เกิดโรคมะเร็งตามที่ได้มีการรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยติดเชื้อในกรณีต่างๆ อาทิ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะปอดอักเสบ กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด กลุ่มผู้ป่วยปอดอักเสบภูมิไวเกิน (HP) กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง และกลุ่มผู้ป่วยที่มีการใช้สายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลาง (Kapadia, Rolston, & Han, 2007)

Streptomyces parvus ที่แยกได้จากดินในบริเวณที่มีการเจริญของพืชผล มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ได้ดังผลการทดลองที่ได้แสดงก่อนหน้า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล และสามารถผลิตสารต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบอีกหลายชนิด ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคอื่นๆ รวมถึงการต้านการเจริญของมะเร็งหลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งมากกว่า 53 เปอร์เซ็นต์ (Elnaby, Elala, Raouf, Abd-elwahab, & Hamed, 2016; Naine, Devi, Mohanasrinivasan, & Vaishnavi, 2015)

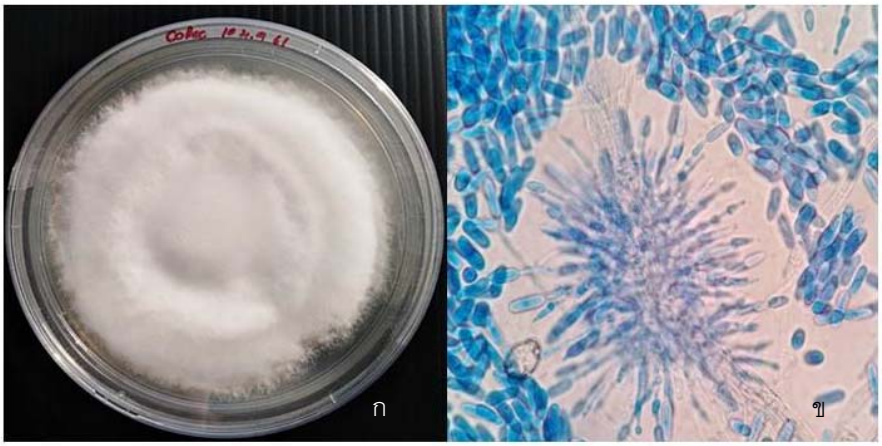
Streptomyces silaceus เป็นแอคติโนมัยซีสต์ที่ยังไม่การรายงานที่เกี่ยวข้องในการใช้เป็นจุลินทรีย์ควบคุมทางชีวภาพในพืช หรือการนำมาใช้ในงานทางการแพทย์อื่นๆ แต่มีการรายงานการค้นพบเชื้อนี้ครั้งแรกจากม้าที่มีภาวะของการแท้ง และแยกได้จากรอยแผลบนรกของม้า จึงตั้งชื่อตามลักษณะของโคโลนีที่มีสีเหลืองเข้ม (Labeda, Price, Kroppenstedt, Donahue, Williams, & Sells, 2009)

Streptomyces purpurasce ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมากเนื่องจากความสามารถในการผลิตอะโรมาติกโพลีคลีไทด์ในการเป็นสารประกอบในการรักษาทางการแพทย์ทั้งความสามารถในการเป็นยาต้านจุลชีพและมะเร็ง และมีการสร้างสารประกอบ 3 ชนิด คือ Rhodomycin, Epelmycin และ Obelmycin (Bundale, Besde, Pillai, Gangwani, Nashikkar, Kadam, & Upadhyay, 2018; Holkar, Begde, Nashikkar, Kadam, & Upadhyay, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า **S. purpurasce** มีความสามารถในการงอกของสปอร์เชื้อรา **Colletotrichum** spp.และการเจริญของเส้นใย ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในมันเทศสีม่วงในประเทศบราซิล ซึ่งถือว่าเป็นพืชที่เป็นแหล่งอาหารสำคัญของประเทศ (Soares, Sousa, Silva Garrido, Jane, & Almeida, 2006)

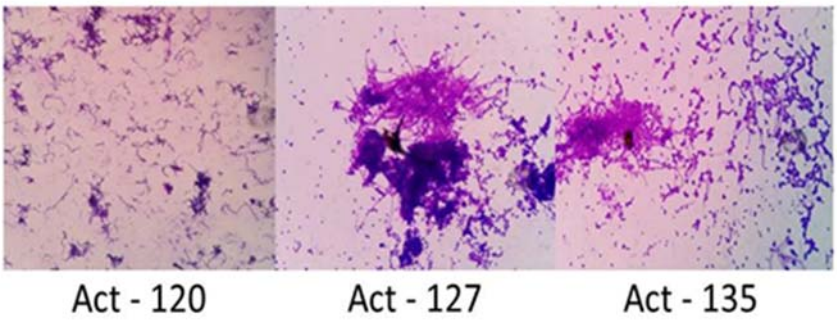
Streptomyces cavourensis นอกจากแสดงถึงกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส แล้วยังมีการรายงานผลการศึกษาว่ามีความสามารถในการเป็นเชื้อควบควบคุมทางชีวภาพของโรค Dieback ของต้นมะม่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา **Lasiodiplodia theobromae** รวมถึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำลายของเชื้อบนแผลของผลมะม่วงทำให้แผลผลมะม่วงไม่เกิดการแผ่ขยายมากขึ้น ผนังเซลล์ของเชื้อราถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโน **S. cavourensis** ที่นอกจากจะผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคแล้วยังพบว่ามีการผลิตสาร Chitinase และ Siderophores ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชอีกด้วย (Kamil, Saeed, Tarabily, & AbuQamar, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee, Tindwa, Lee, Naing, Hong, Nam and Kim (2012) พบว่าเชื้อแอคติโน **S. cavourensis** เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช **C. gloeosporioides** ที่ติดเชื้อในต้นพริกด้วยการผลิต lytic enzymes อย่างเช่น β-1,3 glucanase, chitinase, 2-furancarboxaldehyde, lipase และ protease ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยได้สูงถึง 92.9%

ความสำคัญและความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เหล่านี้ นอกจากมีการผลิตสารที่เป็นสารต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสแล้ว เชื้อแอคติโนมัยซีสต์เหล่านี้ยังมีความทนทานต่อ

สภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และสามารถเจริญอยู่ได้อย่างยาวนาน และด้วยคุณสมบัติที่คล้ายกับเชื้อราเช่น การสร้างสปอร์ และเส้นใย และด้วยคุณสมบัติเหล่านี้หากมีการนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มทางเลือกด้านการเกษตรในอนาคต จะทำให้มีการลดจำนวนลงของการใช้สารเคมี และสนับสนุนการวิจัยไทยเพื่อการเกษตรทางเลือกใหม่อีกด้วย



ภาพที่ 1 ก: ลักษณะของโคโลนีเชื้อรา **Colletotrichum** spp.ที่เจริญบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 ข: ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดีย

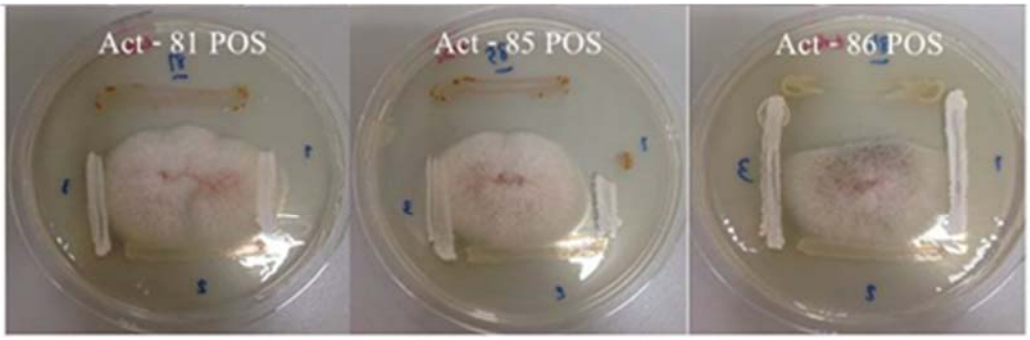


ภาพที่ 2 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสต์บางไอโซเลท (Act-120, Act-127 และ Act-135) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า ที่มีกิจกรรมการต้านการเจริญของเส้นใยเชื้อรา **Colletotrichum** spp.

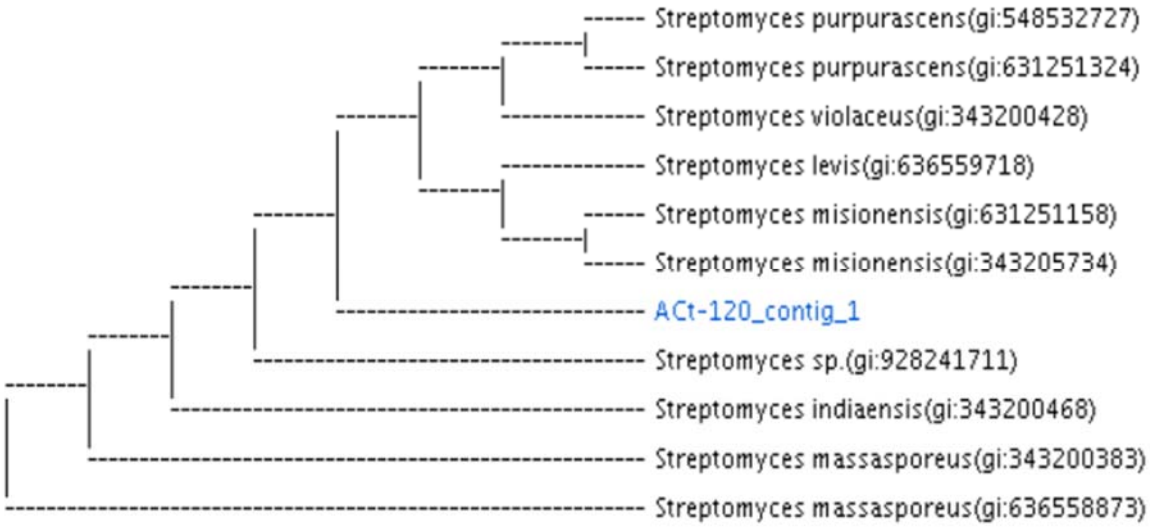
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบแอคติโนมัยซีสต์ที่คัดเลือกจากดินบริเวณรากพืช พบว่ามีจำนวน 23 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อรา **Colletotrichum** spp.

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Act-62	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-75	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-79	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-81	โคโลนีสีครีม สร้างพิกเมนต์สีม่วง
Act-85	โคโลนีสีครีม มัน-วาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาลอ่อน
Act-86	โคโลนีสีขาว สร้างพิกเมนต์สีน้ำตาล
Act-114	โคโลนีสีเหลือง ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-116	โคโลนีสีครีม ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-117	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีด้าน
Act-118	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-120	โคโลนีสีม่วง ขนาด 2 มิลลิเมตร สร้างพิกเมนต์สีม่วง
Act-124	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-125	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-127	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-130	โคโลนีสีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-131	โคโลนีสีขาว-ครีม ขอบโคโลนีด้าน
Act-132	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบน ขนาดเล็ก
Act-133	โคโลนีสีครีม อายุมากขึ้นจะมีการสร้างเส้นใย
Act-135	โคโลนีสีครีม โคโลนีด้าน อายุมากขึ้นมีการสร้างเส้นใยสีขาว
Act-136	โคโลนีสีครีม เมื่ออายุมากขึ้นจะเป็นสีเหลือง โคโลนีด้าน
Act-141	โคโลนีสีครีม-ขาว ตรงกลางนูนวาว ผิวรอบโคโลนีด้าน
Act-142	โคโลนีสีครีม ขนาด 2 มิลลิเมตร โคโลนีแห้ง

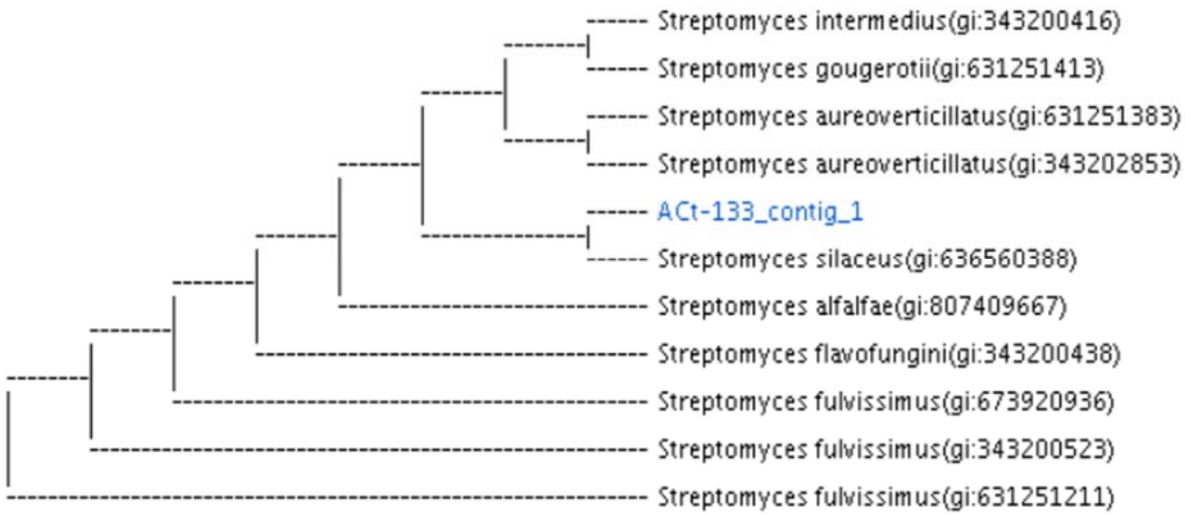
Act-147	โคโลนีสีครีม อายุมากขึ้นมีการสร้างเส้นใยสีขาว



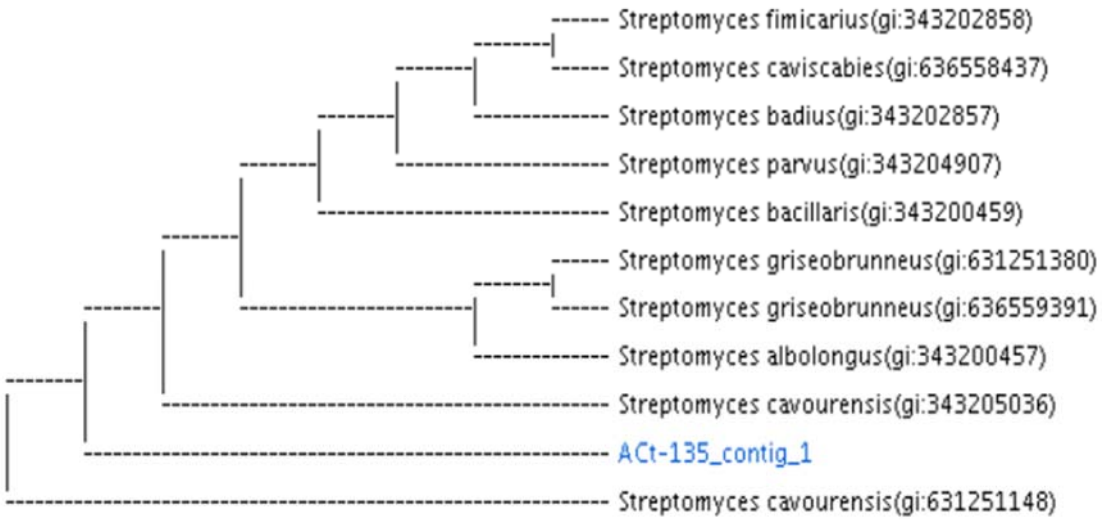
ภาพที่ 3 การทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของแอคติโนมัยซีสต์ที่มีต่อเชื้อรา **Colletotrichum gloeosporioides** ด้วยวิธี Dual culture



ภาพที่ 4 แผนผังต้นไม้แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อ **Streptomyces purpurascens** รหัสเชื้อ 120



ภาพที่ 5 แผนผังต้นไม้แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อ **Streptomyces silaceus** รหัสเชื้อ 133



ภาพที่ 6 แผนผังต้นไม้แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อ **Streptomyces cavourensis** รหัสเชื้อ 135

เอกสารอ้างอิง

Moncheva P., Tishkv S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova, N., & Bogatzevska, N. (2012). Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. **Journal of Culture Collecions**, 3, 3-14.

Nath-Yadav, A., Verma, P., Singh B., Singh-Chauahan, V., Suman A., & Kumar-Saxena, A. (2017). Plant growth promoting baceria : Biodiversity and multifunctional attributes or sustainable agriculture. **Advances Biotechnology and Microbiology**, 5(5), 1-16.

รัฐกร ศรีสุทธี และสรัญย ณ ลำปาง. (2550). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา **Colletotrichum** sp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิค ISSR. **วารสารเกษตร**, 23(2), 89-96.

โรคแอนแทรกโนส. ใน **โรคและแมลงศัตรูมะม่วง**.คลินิกพืช กลุ่มพัมนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต, สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 1, วันที่สืบค้น 8พฤษภาคม 2560 , เขาถึงได้จาก http://oard1.doa.go.th/pdf/summer%20warning/%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%81%E0%B8%A1%E0%B8%A5%E0%B8%87%E0%B8%A8%E0%B8%B1%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B8%B9%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%A1%E0%B9%88%E0%B8%A7%E0%B8%87.pdf

Dean, R., Van-Kan, JA., Pretorius, ZA., Hammond-Kosack, KE., Di-Pietro, A., Spanu, PD., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, 13(4), 414-30.

โรคแอนแทรกโนส, ใน **โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว**, กรมวิชาการเกษตร, วันที่สืบค้น 8พฤษภาคม 2560, เข้าถึงได้จากwww.doa.go.th/pprdo/download/text2.pdf

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ยุทธสักดิ์ม เจียมไชยศรี, ธารทิพย์ ภาสบุตร และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. (2015). สำรวจรวบรวมและจำแนก **Fusarium** สาเหตุโรคพืช, กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาทกรมอารักขาพืช, วันที่สืบค้น 8พฤษภาคม 2560 , เขาถึงได้จาก http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=886

Komar, N., Kant-Singh, R., Mishra, S. K., & Pachouri, U. C. (2010). Isolation and screening of soil **Actinomycetes** as source of antibiotics active against bacteria. **Internatonal Journal of Microbiology Reaearch**, 2(2), 12-16.

Krucharoenphaisan, K., Rodbagpong, K., Saengpaen, P., & Sinma, K. (2016). Exploration on soil **Actinomycetes** against **Phytophthora** sp. causing root rot of Cassava and plant growth promotig activities. **Journal of Plant Sciences**, 11, 38-44.

Kapadia, M., Rolston K.V.I., & Han, X. Y. (2007). Invasive **Streptomyces** infections six cases and literature review. **American Society for Clinical Pathology**, 127, 619-624.

Abd-Elnaby, H., Abo-Elala, G., Abdel-Raouf, U., Abd-elwahab, A., & Hamed, M. (2016). Antibacterial and anticancer activity of marine **Streptomyces parvus**: optimization and application. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 30(1), 180-191.

Naine, S. J., Devi, C. S., Mohanasrinivasan, V., & Vaishnavi, B. (2015). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of marine **Streptomyces parvus** VITJS11 crude extract. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 58(2), 198-207.

Labeda, D. P., Price, N. P., Kroppenstedt, R. M., Donahue, J. M., Williams, N. M., & Sells, S. F. (2009). **Streptomyces atriruber** sp. nov. and **Streptomyces silaceus** sp. nov., two novel species of equine origin. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 59, 2899–2903.

Bundale, S., Besde, D., Pillai, D., Gangwani, K., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2018). Novel aromatic polyketides from soil **Streptomyces** spp. purification, characterization and bioactivity studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 34(67),1-16.

Holkar, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2013). Rhodomycin analogues from **Streptomyces purpurascens**: Isolation, characterization and biological activities. **Springer Plus**, 2(9), 1-13.

Soares, A. C. F., Sousa, C. da S., Garrido, M. da S., Perez, O. J., & Almeida N. S. (2006). Soil **Streptomycetes** with in vitro activity against the Yam pathogens **Curvularia Eragrosides** and **Colletotrichum Gloeosporioides**. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34, 456-461.

Kamil, F. H., Saeed, E. E., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2018). Biological control of mango dieback disease caused by **Lasiodiplodia theobromae** using Streptomycete and non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates**. Frontiers in microbiology**, 9(829), 1-19.

Lee, S. Y., Tindwa, H., Lee, Y. S., Naing, K. W., Hong, S.H., Nam, Y., & Kim, K. Y. (2012). Biocontrol of Anthracnose in pepper using Chitinase, β-1,3 Glucanase, and 2-Furancarboxaldehyde produced by **Streptomyces cavourensis** SY224. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22(10), 1359-1366.