รายงานวิจัย

การประเมินการใช้แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกขี้หนู

โดย

เจนจิรา เดชรักษา

ทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ชื่อโครงการ การประเมินการใช้แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกขี้หนู

ชื่อผู้วิจัย เจนจิรา เดชรักษา

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกขี้หนู โดยการทดสอบขั้นต้นด้วยวิธี dual culture ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อไอโซเลต SA13-2 ยับยั้งเชื้อราสองชนิดได้ 100% ส่วนไอโซเลต SA19-1 ยับยั้งได้ต่ำกว่า 50% จากนั้นนำแอคติโนมัยสีทมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนผลพริก พบว่าการปลูกเชื้อไอโซเลต SA13-2 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* เท่ากับ 50 และ 59% ซึ่งสูงกว่าไอโซเลต SA19-1 ที่มีค่าเท่ากับ 6 และ 16% ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลต SA13-2 ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนกล้าพริกขี้หนู พบว่าชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีท SA13-2 มีปริมาณรากมากกว่าชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อรา รูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยสีท SA13-2 เป็นชนิด Rectinaculiaperti ซึ่งจัดเป็นจีนัส *Streptomyces* และเมื่อทำการจัดจำแนกโดยการโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 คือ *Streptomyces levis*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

Research Title Evaluation of antagonistic actinomycetes for biocontrol of pepper chili anthracnose

Researcher Janejira Detraksa

Abstract

In this study, the ability of actinomycetes isolate SA13-2 and SA19-1 against *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. capsici* causing chilli anthracnose disease were investigated. In previoves study, these actinomycetes isolates had high-level inhibition activity obtained dual culture method. The inhibition activity of culture filtrate from actinomycetes isolates were measured and the highest inhibition of 100% was obtained from isolate SA13-2. In *vivo* test were conducted on chilli fruits, the results showed that the isolate SA13-2 inhibited *C. gloeosporioides* and *C. capsici* at 50 and 59%, isolate SA19-1 inhibited at 6 and 16%. Therefore, isolate SA13-2 was selected for tested against pathogenic fungi on chilli seedling. The results indicated that the treatment which inoculated isolate SA13-2 revealed the highest roots quantity compared to the treatment which inoculated fungi. Base on spore morphological characteristic, the spore of isolate SA13-2 was Rectinaculiaperti type that classified as the genus *Streptomyces* and the 16S rDNA sequence analysis, isolate SA13-2 belong to the *Streptomyces levis.*

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ซึ่งช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการพิจารณาทุนวิจัยที่ได้อนุมัติทุนวิจัยในครั้งนี้ และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ที่ช่วยให้ข้อเสนอแนะในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย นางสาวชณัฏฐา วงษ์ทอง และ นางสาววันลยา ปทาน นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยาที่ทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยวิจัยที่ได้มีโอกาสทำงานวิจัยร่วมกัน และขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

ตุลาคม 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	ช
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แอคติโนมัยสีท	3
2.2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	3
2.3 โรคแอนแทรคโนส	8
2.4 พริกขี้หนู	11
	12
3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
	14

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

4 ผลการวิจัย 19

4.1 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของแอคติโนมัยสีท 19

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส 19

4.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก 22

4.4 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริก 25

4.5 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริก 26

4.6 การศึกษาคุณสมบัติของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 31

5 สรุปและข้อเสนอแนะ 33

5.1 สรุป 33

5.2 ข้อเสนอแนะ 33

บรรณานุกรม 34

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส	21
2	การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก	22

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีท	5
2	ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร GYM agar เป็นเวลา 5 วัน	19
3	ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*	20
4	ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici*	20
5	ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*	20
6	ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici*	21
7	การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2	23
8	การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1	24
9	ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริกขี้หนู	26
10	ลักษณะของต้นพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสโดยแอคติโนมัยสีท	27
11	ลักษณะของรากพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสโดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2	29
12	ลักษณะของผลพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสโดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2	30
13	รูปร่างเส้นใยและการจัดเรียงสปอร์ของไอโซเลต SA13-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	31
14	บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1,500 คู่เบส จากการทำ PCR	32

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ สามารถบริโภคได้ทั้งผลสดและแห้ง ที่บริโภคกันในครัวเรือนภายในประเทศและเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศ แต่เกษตรกรผู้ปลูกพริกมักประสบปัญหาที่สำคัญคือโรคแอนแทรคโนส ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายร้ายแรงให้กับผลผลิตพริกเป็นจำนวนมาก โดยสามารถทำให้ผลพริกที่แก่จัดเน่าได้ทั้งในขณะที่ปลูกอยู่ในแปลง หรือในโรงเก็บหรือในขณะขนส่ง โรคแอนแทรคโนส ทำให้ผลพริกในระยะผลพริกเริ่มสุกเกิดรอยช้ำ เป็นแอ่งลึก เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกทำลายจะหยุดการเจริญ ทำให้ผลพริกมีลักษณะโค้งงอ มีสาเหตุมาจากรากลุ่ม *Colletotrichum* spp. เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* (Khucharoenphaisan, 2013) การควบคุมโรคแอนแทรกโนสพริกยังคงใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม เบนโนมิล, มาเน็บ, คลอโรธาโลนิล และแมนโคเซ็บ เป็นต้น เมื่อมีการใช้สารเคมีมากขึ้นทำให้ตรวจพบสารพิษตกค้างทั้งในพริกสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปอีกด้วย เป็นมลพิษต่อสภาพแวดล้อม และทำให้เชื้อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้นมาได้ (รัติกาล และเพชรรัตน์, 2555) ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้สารเคมีลงโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาทดแทน ซึ่งกลไกการควบคุมเชื้อราโรคพืช ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแก่งแย่งอาหาร พื้นที่อาศัย และกระบวนการเป็นปรสิต

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดหนึ่งที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ จัดเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา พบมากในดินที่มีสารอินทรีย์สะสม เช่น มูลสัตว์ ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย หรือใบไม้ เป็นต้น มีความสำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช สร้างสารซิเดอโรเฟอร์ และสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (วสันณ์ และปฏิมาพร, 2551) แอคติโนมัยสีทที่พบกระจายในธรรมชาติส่วนโดยใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งมีมากถึง 70 – 90 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนมัยสีท ซึ่งจากงานวิจัยของจิราวรรณ และ เจนจิรา (2557) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินเขาขวาง จังหวัดลพบุรี และพบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดยมีผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ

ราทั้งสองชนิดบนอาหารแข็งด้วยวิธี dual culture เท่ากับ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 มาประเมินการใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ของพริกขี้หนูโดยชีววิธี ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งแนวทางเพิ่มผลผลิตพริกขี้หนูโดยวิธีควบคุมโดยชีววิธี เพื่อลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และระบบนิเวศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำกรองอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท SA13-2 และ SA19-1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici*

2. เพื่อประเมินความสามารถของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* บนผลพริกและต้นพริกขี้หนูในระดับห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อระบุชนิดของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16sRNA

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 โดยการศึกษาลำดับนิวคลี โอไทด์ของยีน 16sRNA และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพริกขี้หนูจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่ยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะปลูกพริกแบบเกษตรอินทรีย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

ลักษณะทั่วไป

แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกใน Class Actinobacteria มีลักษณะเด่น คือ มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในสารพันธุกรรมสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะการเจริญภายนอกคล้ายเชื้อรา สร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ลักษณะสำคัญของแอคติโนมัยซิทีสเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง คือ มีผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan และมีพวกกรดมิวรามิกและกรดไดอะมิโนไพมิลิก (diaminopiminolic acid, DAP) ไม่มีไคตินและเซลลูโลส โคโลนีมีลักษณะทึบแสง อาจมีผิวเรียบคล้ายหนังสัตว์หรือรอยย่น สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น เขียว ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และดำ เป็นต้น สามารถสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร เรียกว่า substrate mycelium และเส้นใยเหนือผิวอาหาร เรียกว่า aerial mycelium แอคติโนมัยสีทพบได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ โคลน และปมราก เป็นต้น ในดินทั่วไปพบแอคติโนมัยสีทเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรีย เช่น ดิน 1 กรัม ที่มีสารอินทรีย์วัตถุ จะพบแอคติโนมัยสีทประมาณ 10^5-10^8 เซลล์ ส่วนดินที่มีสภาพเป็นเบส อาจพบแอคติโนมัยซิทีสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด แอคติโนมัยซิทีสมีการดำรงชีวิตอิสระ (saprophytic) ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลซับซ้อนได้เช่น ลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน เคราตินและไคติน (ยุวดี, 2546)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซิทีสค่อนข้างทนต่อความแห้งแล้งดังนั้นจึงสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่แห้งแล้งมาก เช่น ดินในทะเลทราย นอกจากนั้นยังชอบที่จะเจริญในสภาวะที่เป็นด่างหรือเป็นกลางแต่ไม่ทนในสภาวะเป็นกรด แอคติโนมัยซิทีสได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบว่าบางสกุลของแอคติโนมัยซิทิส เช่น *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (สุบัณฑิต, 2549)

สัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซิทีส

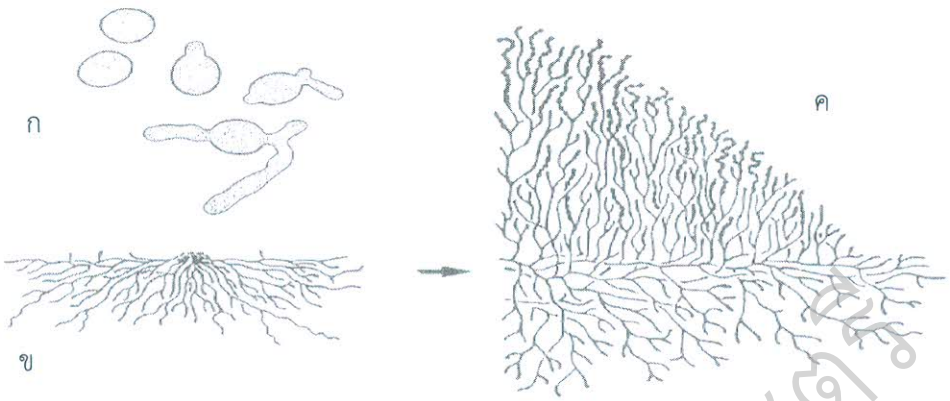
โคโลนีของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการสร้างเส้นใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอคติโนมัยสีทจะต่างจากโคโลนี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ของแบคทีเรีย (ทิสนา, 2550) เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังแสดงภาพที่ 1 เป็นขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม ภาพที่ 1(ก) จากนั้นเมื่อหัวเชื้อตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร ภาพที่ 1(ข) และสายใยอาหารเจริญโดยการแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศ ภาพที่ 1(ค) ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกั้นภายในเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกั้นชั้นเดียวเพื่อความคงตัว และสร้างเส้นใยแข็ง (ยุวดี, 2546)

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันของแต่ละสปีชีส์ เช่น ใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยอากาศจะสร้างสปอร์และอับสปอร์ โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะนูน (raised) เรียบแบน (flat) บางครั้งมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียวจนถึงแข็ง สีโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาลและดำ ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) สันนูน (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดโคโลนีขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (ทิสนา, 2550)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีท

ก สปอร์เดี่ยว อับสปอร์ หรือส่วนของเส้นใยที่แตกหัก

ข เส้นใยอาหาร

ค เส้นใยอากาศ

ที่มา: Atlas of Actinomycetes (1997)

การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท

นอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนประกอบของผนังเซลล์เส้นใยสามารถใช้จัดจำแนกแอคติโนมัยสีทได้ โดยองค์ประกอบผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีทแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3 ของสายเตตราเปปไทด์ (tetrapeptide) ไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริด (interpeptide bridges) และ เปปทิโดไกลแคนซูการ์ (peptidoglycan sugar) ซึ่งเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของผนังเซลล์ดังกล่าวพบว่าสามารถแบ่งผนังเซลล์ออกได้ 4 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ I-IV โดยอ้างอิงการจำแนกของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท คือ ลักษณะรูปร่างและสีของเส้นใยและสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่เข้าในอาหาร การสร้างรงควัตถุเมลานีน และลำดับของเบส 16S rDNA สามารถใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยสีทออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่ (วีระวัฒน์, 2544)

1) Nocardioform actinomycetes ประกอบด้วย

สกุล Nocardia

สกุล Rhodococus

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สกุล Nocaridioides

สกุล Pseudonocardia

สกุล Oerskovis

สกุล Saccharopolyspora

สกุล Micropolyspora

สกุล Promicromonospora

สกุล Intersporangium

สกุล Actinopolyspora

สกุล Saccharomonospora

สกุล Amycolatopsis

สกุล Amycolata

2) Actinomycetes with multi-locular sporangia ประกอบด้วย

สกุล Geodermatophilus

สกุล Dermatophilus

สกุล Frankia

3) Actinoplanetes ประกอบด้วย

สกุล Actinoplanes

สกุล Ampullariella

สกุล Pilimelia

สกุล Dactylosporangium

สกุล Micromonospora

4) Sterptomycetes and related genera ประกอบด้วย

สกุล Sterptomyces

สกุล Sterptoveticllium

สกุล Kineosporia

สกุล Sporichtpya

5) Maduromecetes ประกอบด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สกุล Actinomadura

สกุล Microbispora

สกุล Microtetraspora

สกุล Planobispora

สกุล Spirillospora

สกุล Streptosporangium

6) Themomonospora and related genera ประกอบด้วย

สกุล Thermomonospora

สกุล Actinosynnema

สกุล Nocardiopsis

สกุล Streptoalloterichus

7) Thermoactinomycetes ประกอบด้วย

สกุล Thermoactinomyces

8) Other genera ประกอบด้วย

สกุล Glycomyces

สกุล Kibdelosporangium

สกุล Kiasatosporia

สกุล Saccharothix

ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีท

ประโยชน์ที่เกิดจากแอคติโนมัยสีท ได้แก่ ช่วยย่อยสลายวัตถุในดินโดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างยากต่อการย่อยสลายโดยแบคทีเรียหรือเชื้อรา แอคติโนมัยสีทหลายสายพันธุ์สามารถย่อยสลาย แป้ง (starch) อินูลิน (inulin) หรือไคตินได้ ความสามารถในการย่อยไคตินเป็นคุณสมบัติพิเศษของแอคติโนมัยสีท แอคติโนมัยสีทยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากบางตัวที่เหลือจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียและเชื้อราได้ เช่น *Nocardia* ย่อยสลายสารจำพวกพาราฟิน (paraffins) ฟีนอล (phenols) และไพริมิดีน (pyrimidine) *Micromonospora*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ย่อยสลายไคติน (chitin) เซลลูโลส (cellulose) กลูโคไซด์ (glucosides) เพนโดแซน (pentosan) และลิกนิน (lignin)

ในธรรมชาติ *Streptomycetes* มีบทบาทสำคัญในการซากพืชและซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดี สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) *Streptomycetes* หลายชนิดสามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของหญ้า ไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็ง รวมทั้งย่อยสลายไคติน เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เคอราติน เปคติน รวมทั้งผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกจากนี้ *Streptomycetes* ยังสามารถสร้างเมลานินซึ่งเป็นรงควัตถุคล้ายๆ กรดฮิวมิค ซึ่งอาจช่วยสร้างฮิวมัสในดินด้วย จึงทำให้แอคติโนมัยสีทมีบทบาทที่สำคัญมากในการทำปุ๋ยหมัก โดยเฉพาะพวกที่ชอบเจริญในช่วงอุณหภูมิสูงๆ (thermophilic) เพราะเนื่องจากขนวนการหมักปุ๋ยหมักจะเกิดความร้อน ทำให้อุณหภูมิในกองปุ๋ยสูงมาก แอคติโนมัยสีทที่พบในกองปุ๋ยหมัก ได้แก่ *Streptomyces, Thermoactinomyces* และ *Thermomonospora* (ศรีสกุล, 2553)

2.2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การทำการเกษตรที่ผ่านมาเกษตรกรมุ่งใช้เทคโนโลยีทางด้านสารเคมีมาโดยตลอด ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อโรคพืชเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะสารฆ่าเชื้อรา ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มนุษย์และสัตว์ สารเคมีเป็นพิษตกค้างในสภาวะแวดล้อม ผลิตผลเกษตรและมีผลกระทบต่อผู้บริโภค การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างขาดความระมัดระวังนอกจากจะเป็นปัญหาโดยตรงต่อผู้ใช้แล้วยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นปัญหาของสังคมโดยส่วนรวม ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นใช้วิธีที่เหมาะสมนำมาผสมผสานกัน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพและผลตอบแทนสูงสุดโดยไม่กระทบกระเทือนต่อสิ่งแวดล้อม และสังคมสามารถนำไปปฏิบัติได้ โดยการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี (พรพรรณ, 2550)

การควบคุมโรคโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อโรคอันจะก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูงและจุลินทรียปฏิปักษ์ ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรียต่อต้าน (bacterial antagonist) มาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะการใช้แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptomyces* spp. จุลินทรีย์ ต่อต้านมี

กลไกการควบคุมโดยชีววิธี 4 ประเภท ได้แก่

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) หมายถึง การสร้างผลิตผลจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

2. การแข่งขัน (competition) หมายถึง การแข่งขันระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดหรือมากกว่าสองชนิดที่มาอยู่ร่วมกันในด้านต่างๆ

3. การเป็นเชื้อปรสิตและตัวห้ำ (parasitism and predation) หมายถึง กรณีที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชแล้วเข้าทำลายเชื้อโรคพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารหรือสารประกอบต่างๆจากเชื้อโรคพืช

4. การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรค (induction of resistant in plant) เป็นกลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปกระตุ้นให้ต้นพืชไปสร้างภูมิคุ้มกัน หรือสร้างสารต่างๆ ที่มีผลในการต่อต้านหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช (ฉัตรสุดา, 2551)

ตัวอย่างการนำสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช ได้แก่

พรนภา (2554) ทดสอบการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท OMA60-1 ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้า พบว่าพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนปลูกเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคต่ำกว่าพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทภายหลังการปลูกเชื้อ เนื่องจากแอคติโนมัยสีทและสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ที่เชื้อผลิตได้นั้นมีโอกาสได้สัมผัสกับแผลที่ทำการทดสอบบนผลพริกก่อน จึงเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุที่เข้ามาสัมผัสภายหลัง

มัลลิกา (2550) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากพริกและมะเขือเทศที่เก็บจากสวนในพื้นที่อำเภอแม่ริมและอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยก *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Norcardia* และ *Actinomadura* นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคเน่าระดับคอดินของพริกโดยวิธี dual culture พบว่า *Streptomyces* สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* เมื่อนำแอคติโนมัยสีทไปทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคบนกระดาษชื้น พบว่าลดดัชนีการทำลาย *Pythium* sp. และ *R. solani* ได้

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฉัตรสุดา (2551) ทำการแยก *Streptomyces* เอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร 8 ชนิด จากการทดสอบโดยวิธี dual culture พบว่าการใช้สปอร์แขวนลอยของเอนโดไฟท์ *Streptomyces* SC16 สามารถควบคุม สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ศึกษาการควบคุมในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการคลุกเมล็ด การพ่นสปอร์แขวนลอย และการหยดสปอร์แขวนลอยลงในดิน สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าคอดินของผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้ได้ และเพิ่มสามารถเพิ่มน้ำหนักสดของกล้าผักกาดฮ่องเต้ เนื่องจาก *Streptomyces* เอนโดไฟท์สามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เจริญปกคลุมผิวราก ผิวใบ และเจริญเข้าไปภายในปากใบของกล้าผักกาดฮ่องเต้

นราวรรณและคณะ (2554) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินนาข้าว นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* โดยวิธี dual culture พบว่า *Streptomyces hygroscopicus* RF 16-2 สามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบการงอกของเมล็ดข้าวในสภาวะที่มี *F. moniliforme* บนกระดาษชื้น พบว่าสปอร์แขวนลอยของ *S. hygroscopicus* RF 16-2 สามารถควบคุมการเจริญของ *F. moniliforme* ได้และไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าว

Prabavathy *et al.* (2006) ศึกษาสารต่อต้านเชื้อรา SPM5C-1 และ SPM5C-2 ที่สกัดด้วย ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. PM5 และทำให้บริสุทธิ์โดย gel column chromatography และ thin layer chromatography เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี well diffusion สาร SPM5C-1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคใบไหม้และกาบใบไหม้ในข้าวได้ และทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในแปลงทดลองพบว่า การสเปรย์สาร SPM5C-1 บนต้นข้าวสามารถลดการเกิดโรคใบไหม้และกาบใบไหม้ได้ 76.1 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Prapagdee *et al.* (2008) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากพืช และทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า *Streptomyces hygroscopicus* ที่สามารถสร้าง chitinase and β -1,3-glucanase ยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

2.3 โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose diseases)

โรคแอนแทรคโนส เป็นโรคพืชที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพมีเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส อยู่ในจีนัส *Colletotrichum* ทำให้เกิดความสูญเสียกับพืชเศรษฐกิจ มีพืชอาศัยมากถึง 470 สกุล (ธนวันต์, 2548) ทั้งพืชตระกูลถั่ว หญ้า ผักไม้ผล และไม้ประดับ ทำให้ผลผลิตเน่าเสีย อายุการเก็บเกี่ยวสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ การระบาดของโรคเกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรงในเขตที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ถ้าเกิดกับต้นกล้าจะทำให้ต้นกล้าแห้งตายได้ และมีรายงาน การเข้าทำลายของในส่วน ราก และหัว ที่อยู่ใต้ดิน ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสได้การเข้าทำลายของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งแบบมีเชื้อหลายสปีชีส์เข้าทำลายพืชชนิดเดียว หรือเชื้อสปีชีส์เดียวเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายเซลล์พืชโดยตรงไม่ต้องผ่านช่องเปิดธรรมชาติหรือบาดแผล สามารถเข้าทำลายผลผลิตตั้งแต่ระยะดอก ผลอ่อน โดยยังไม่แสดงอาการของโรค จัดเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) จะแสดงอาการชัดเจนเมื่อผลผลิตแก่หรือเริ่มสุก ดังนั้น การเข้าทำลายจะเริ่มตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก โรคนี้พบกระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นจะพบการระบาดอย่างรุนแรง ประเทศไทยพบการเข้าทำลายของโรคมากกว่าประเทศแถบอื่น ๆของโลก การระบาดของเชื้ออาศัยลม ฝน หรือแมลงที่บินมาเกาะบริเวณแผลทำให้สปอร์แพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ เมื่อถูกความชื้นก็สามารถงอกเจริญได้ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส เริ่มจากจุดแผลแห้งเล็กๆ สีน้ำตาลแล้วค่อยๆ เข้มขึ้นขยายออกเป็นวงกลมหรือวงรีซ้อนกันเป็นชั้น อาการของโรคจะเห็นชัดเจนในระยะที่ผลเริ่มสุก เมื่อมีความชื้นสูงจะพบการสร้างกลุ่มของสปอร์หรือ conidia สีส้มหรือสีชมพูเป็นหยดเหลวข้นบริเวณแผล โรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนใบ ถ้าเกิดกับใบอ่อนทำให้ใบหงิกงอ อาการเริ่มจากจุดสีเทาและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มอยู่กระจัดกระจาย เนื้อเยื่อกลางแผลบางและฉีกขาดเป็นรูนอกจากนี้ โรคแอนแทรคโนสยังสามารถเข้าทำลายกิ่ง ทำให้เกิดอาการไหม้ (blight) ได้อีกด้วย

โรคแอนแทรคโนสในพริกเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับพริกอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราสาเหตุสามารถเข้าทำลายได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อในสกุล *Colletotrichum* เช่น *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* เป็นต้น แต่ในประเทศไทยพบ 3 สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส คือ *C. capsici*, *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* โดยการเข้าทำลายพบได้ 3 ระยะ คือ

1) ระยะต้นกล้า ถ้ามีเชื้อราสาเหตุติดมากับเมล็ดพันธุ์ เชื้อจะเข้าทำลายต้นกล้า ทำให้ต้นกล้าแห้งตาย (seedling blight) และเกิดอาการโรคเน่าคอดิน (damping-off)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

2) ระยะต้นโต โดยเชื้อราสาเหตุจะเข้าทำลายใบพริกทำให้ใบพริกมีอาการใบจุด (leaf spot) และเกิดการอาการแห้งตายจากปลายยอดเข้ามา (die back)

3) ระยะติดผล อาการของโรคแอนแทรคโนสจะแสดงให้เห็นชัดเจนในระยะผลพริกเริ่มสุก โดยจะทำให้เกิดรอยช้ำ เป็นแอ่งลึก เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกทำลายจะหยุดการเจริญ ทำให้ผลพริกมีลักษณะโค้งงอ

นอกจากนี้ ผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจะมีปริมาณของสาร capsicin และoleoresin ลดลงอีกด้วย (พรนภา, 2554)

2.4 พริกขี้หนู

เป็นพืชผักที่จัดอยู่ในตระกูล Solanaceae ชื่อสามัญว่า Capsicum สำหรับพริกที่นิยมปลูกในประเทศไทยมี 2 กลุ่ม ได้แก่ พริกหวาน พริกหยวก พริกชี้ฟ้า ที่อยู่ในกลุ่ม *Capsicum annuum* และ พริกเผ็ดได้แก่ พริกขี้หนูสวน พริกขี้หนูใหญ่ ที่อยู่ในกลุ่ม *Capsicum frutescens* ประโยชน์ของพริกพริกมีวิตามิน C สูง เป็นแหล่งของกรด ascorbic acid

ส่วนของพริกที่ให้สารสำคัญ ได้แก่ ผล (fruit) และเมล็ด (seed) ในผลประกอบด้วยสาร phenolic compounds ปริมาณจะขึ้นอยู่กับชนิดของดินที่ปลูก ภูมิอากาศ สายพันธุ์ (variety) และระยะเวลาการเก็บเกี่ยว สารพวก phenolics ที่สำคัญคือ capsaicinoids ซึ่งมีอยู่ในพริก 1-2 % ประกอบด้วยสาร 6 ตัว ได้แก่ capsaicin ซึ่งเป็นสารหลักมีอยู่ 48.6% ของ capsaicinoids และ 6,7- dihydrocapsaicin มีอยู่ 36%, nordihydrocapsaicin มีอยู่ 7.4%, homodihydrocapsaicin มีอยู่ 2% homocapsaicin มีอยู่ 2% ใน capsaicinoids ถ้าเป็น crude extract (สารสกัดหยาบของพริก) เรียกว่า oleoresin (อุดมลักษณ์, 2558)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) กลูโคส (D-glucose) บริษัท ASIA PACIFIC SPECIALTY CHEMICAL LIMITED , Australia

2) โพแทสเซียมไดไฮเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท FLUKA-GARANTIE, Switzerland

3) ไดโพแทสเซียมไฮเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท DAMSTADT, Germany

4) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$. $7H_2O$) บริษัท AJAX FINECHEM, Australia

5) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) บริษัท AJAX FINECHEM, Australia

6) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท LABORATORY REAGENT, England

7) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท AJAX FINECHEM, Australia

8) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท CHEMIKIT, Bangkok

9) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$. $7H_2O$) บริษัท CHEMIKIT, Bangkok

10) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$. $7H_2O$) บริษัท APS AJEX FINECHEM, Australia

11) โซลูเบิ้ล สตัส (Soluble strach) บริษัท AJAX FINECHEM, Australia

12) เคซีน (Casein) บริษัท FLUKA ANALYTICAL, USA

13) สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) บริษัท HiMedia, India

14) แมนนิทอล (Mannitol) บริษัท APS AJEX FINECHEM, Australia

15) เปปโตน (Peptone) บริษัท HiMedia, India

16) สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท HiMedia, India

17) วุ้น (Agar) บริษัท HIMEDIA LABORATORIES Prt. Ltd, India

18) Potato Dextrose Agar บริษัท HiMedia

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) บริษัท TOMY SEIKO CO.LTD.

2) ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow) บริษัท CLAYSON LABORATORY

3) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท CONTHRM SCIENTIFIC LTD.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

4) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Controlled environment incubator shaker) บริษัท FORMA SCIENTIFIC ING

5) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) บริษัท ANDREAS HETTICH GMbH

6) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) บริษัท IKA WORKS (ASIA) SDN

7) เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างหยาบ (Balance) บริษัท METLLER – TOLEDO GMbH

8) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท NIKON CORPORATION

9) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่างชนิดพกพา (pH – meter; Bench top) บริษัท METLLER TOLEDO

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 มาเพาะเลี้ยงโดยการ streak plate บนอาหาร ISP-3 (oatmeal agar) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37องศาเซลเซียล เป็นเวลา 5-7 วัน และเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides, C. capsici* บนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันและเก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเอียง ศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยการทำ slide culture

3.2.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีท

1) การเตรียมดีเอ็นเอของแอคติโนมัยสีท

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหาร Yeast extract malt extract broth (YEMEB) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 5-7 วัน ดูดสารแขวนลอย 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ล้างตะกอนเซลล์ ด้วย TE buffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TE buffer ที่มี lysozyme 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม 10% SDS 75 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และในน้ำแข็ง นาน 10 นาที เติม RNase ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม phenol : chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตรหนึ่งเท่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่ลงใน microcentifuge tube ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทธานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณหนึ่งเท่าตัว บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 400 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (พรพรรณ, 2550)

2) **การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)**

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer จำเพาะบริเวณ 16s rDNA ดังนี้

Forward primer (27F): 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Reverse primer (1492R): 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

เตรียมองค์ประกอบของ PCR ดังนี้ 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร 1.25 mM dNTP Mixed (2mM each) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 1 μM forward (F) primer และ 1 μM reverse (R) primer อย่างละ 5 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase จำนวน 1.25 ยูนิต ตัวอย่างดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นชนิด DNase-free water ให้ได้ 50 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Authorized Thermal Cycle โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 preheating อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturing อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 4 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ
ขั้นตอนที่ 6 final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
ขั้นตอนที่ 7 คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel ร้อยละ 1 ในสารละลาย 1XTAE buffer ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำออก จากนั้นนำเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2) การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA

นำ PCR product ส่งไปหาลำดับเบส ที่บริษัท Solgen ประเทศเกาหลีใต้ ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร oatmeal agar เติม 0.1% tween 80 ลงไป เขี่ยเชื้อให้กระจายแล้วกรองด้วยผ้ากรอง ปรับปริมาณสปอร์ให้ได้ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิตร จากนั้นนำมาเติมในอาหาร GYM broth เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ของแอคติโนมัยสีท โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำอาหารด้านบนที่มีสารปฏิชีวนะผสมอยู่ไปกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารแต่ละกลุ่มกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วผสมกับอาหาร PDA ในอัตราส่วน แล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ลงบริเวณกลางจานอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อในชุดควบคุม เจริญจนเกือบเต็มจานอาหาร บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราก่อโรค (ปิยะธิดา, 2549)

3.3.4. การทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides, C. capsici* บนผลและต้นพริก

1) การเตรียมแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 ขีด (streak) บนอาหารผิวเอียง ISP-3 เป็นเวลา 5 วันเติมสารละลาย Tween 80 จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดให้สปอร์ของแอคติโนมัยสีทหลุดจากผิวหน้าอาหาร นำมากรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อแยกเศษวุ้นและเซลล์ออกจะได้ spore suspension ปรับความเข้มข้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

2) การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อรา *C. gloeosporioide* และ *C. capsici* มาเพาะบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วันเติมสารละลาย Tween 80 และใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเบาๆบริเวณเส้นใยจนสปอร์หลุด กรองเส้นใยออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะได้ spore suspension ปรับความเข้มข้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3) การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici*

3.1) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

นำผลพริกมาทำความ สะอาดด้วยน้ำกลั่น แบ่งเป็นชุดการทดลอง ทำชุดละ 3 ซ้ำ จากนั้นเตรียมบาดแผลโดยใช้ cork borer ขนาด 1.0 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มากดลงบนผลพริกผลละ 3 แผล คือ หัว กลางและท้ายของผลพริก เติม spore suspension ของเชื้อราและแอคติโนมัยสีทลงในบาดแผล

นำผลพริกที่ผ่านการหยดในแต่ละชุดวางบนถาดพลาสติก แล้วคลุมด้วยถุง polyethylene (PE) นำฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสำลีชุบน้ำมาวางไว้เพื่อให้ความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีอากาศถ่ายเท บันทึกจำนวนแผลที่เกิดโรคและทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซึ่ง 1 ถาด เท่ากับ 1 ซ้ำๆ ละ 5 ผล (พรนภา, 2554)

3.2) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริก

นำถาดหลุมขนาด 104 หลุม บรรจุพีทมอสให้เต็ม ใส่เมล็ดพริกขี้หนูเพาะหลุมละ 1 เมล็ด รดน้ำให้ชุ่ม และรดทุกวัน วันละ 2 ครั้ง จนต้นกล้าอายุ 40 วัน แบ่งต้นกล้าพริกขี้หนูเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดควบคุม คือไม่มีการเติมเชื้อทดสอบ ส่วนชุดที่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีททำการใส่สปอร์แขวนลอยปริมาตร 2 มิลลิลิตรก่อนเป็นเวลา 7 วัน ก่อนจะปลูกเชื้อราก่อโรคโดยปริมาตรของสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรค คือ 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 7 วันทำการบันทึกลักษณะต้นและรากของต้นกล้าพริก

3.3) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริก

เตรียมสารละลายสปอร์ของแอคติโนมัยสีท และเชื้อราที่ปริมาตร 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรนำมาเติมในปลายข้าวหอมมะลิ 105 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ย้ายต้นกล้าพริกที่อายุ 45 วัน ปลูกลงในถุงดำ รดน้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง จนต้นพริกมีอายุประมาณ 90 วัน แบ่งเป็นชุดการทดลอง 6 ชุด โดยปลูกกล้าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญในปลายข้าวหอมมะลิลงในต้นพริกปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักดินทั้งหมดก่อน 7 วัน หลังจากนั้นและเติมกล้าเชื้อราที่เจริญในปลายข้าวหอมมะลิ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักดินทั้งหมด สังเกตลักษณะต้น ราก และผลพริกที่เกิดโรค เมื่อปลูกไปได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูกเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผล

4.1 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของแอคติโนมัยสีท

ในการวิจัยนี้ได้นำแอคติโนมัยสีทที่แยกจากตัวอย่างดินบริเวณเขาขวาง จังหวัดลพบุรี จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ SA13-2 และ SA19-1 มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี dual culture ทั้งสองไอโซเลตสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ได้ 82.75-100 เปอร์เซ็นต์ (เจนจิรา, 2557) โดยมีคุณสมบัติขั้นต้นดังนี้ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GYM agar SA13-2 โคโลนีขอบเรียบ เส้นใยสีน้ำตาล สปอร์สีเหลือง และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำ และ SA19-1 โคโลนีขอบหยัก เส้นใยสีขาว สปอร์สีชมพู และสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีชมพู แสดงในภาพที่ 2

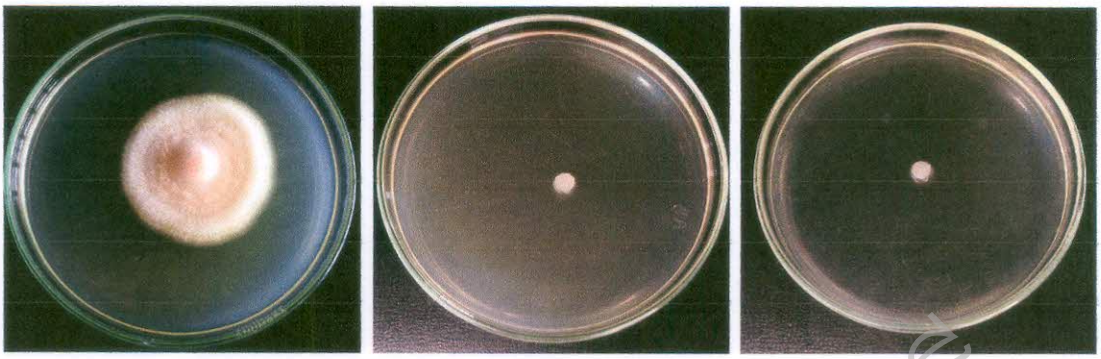
(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 (ก) และ SA19-1 (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร GYM agar เป็นเวลา 5 วัน

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส

จากการนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท SA13-2 และ SA19-1 มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราโรคแอนแทรคโนส พบว่าการเติมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อไอโซเลต SA13-2 ลงในอาหาร PDA ปริมาณ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดไม่เจริญบนผิวหน้าอาหาร แสดงดังภาพที่ 3 และ 4 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะการใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต SA19-1 พบว่ายังมีโคโลนีของเชื้อราเจริญใกล้เคียงชุดควบคุม แสดงดังภาพที่ 5 และ 6 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 1

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

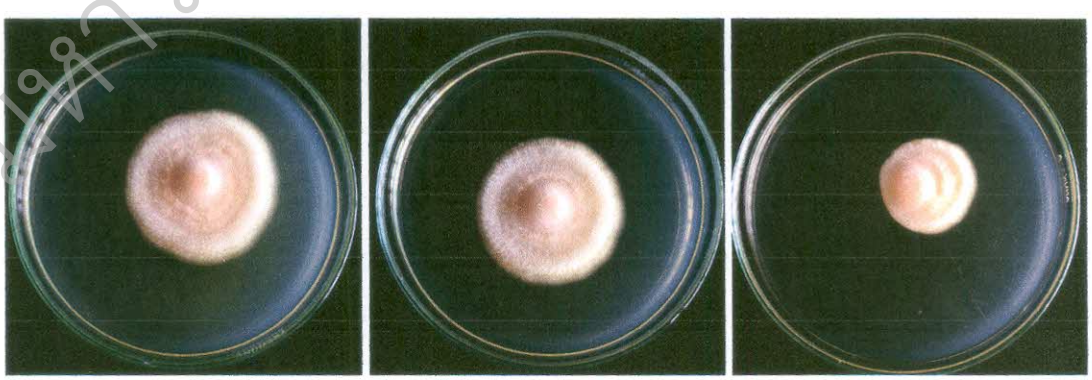


ชุดควบคุม น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 1% น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 5%

ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ชุดควบคุม น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 1% น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 5%

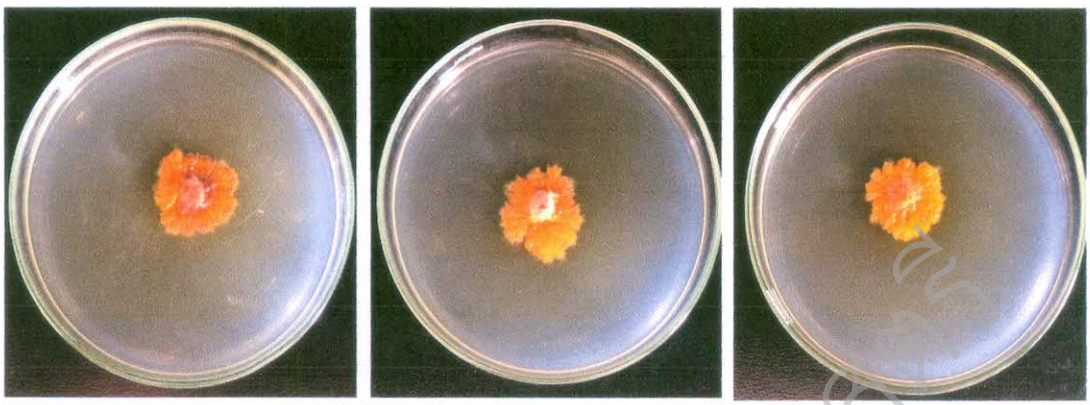
ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici*



ชุดควบคุม น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 1% น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 5%

ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ชุดควบคุม น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 1% น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ 5%

ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1 ในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici*

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส

แอคติโนมัยสีท	ปริมาณน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ (%)	การยับยั้ง (%)	
		C. gloeosporioides	*C. capsici*
SA13-2	1	100	100
	5	100	100
SA19-1	1	9	4
	5	18	12

จากการทดสอบประสิทธิภาพน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยสีทต่อการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิด พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต SA19-1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้น้อย

ดังนั้นในการประยุกต์ใช้ไอโซเลต SA13-2 สามารถทำได้ทั้งตัวเซลล์และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อไปใช้ได้ แต่ไอโซเลต SA19-1 สามารถใช้ตัวเซลล์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

4.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

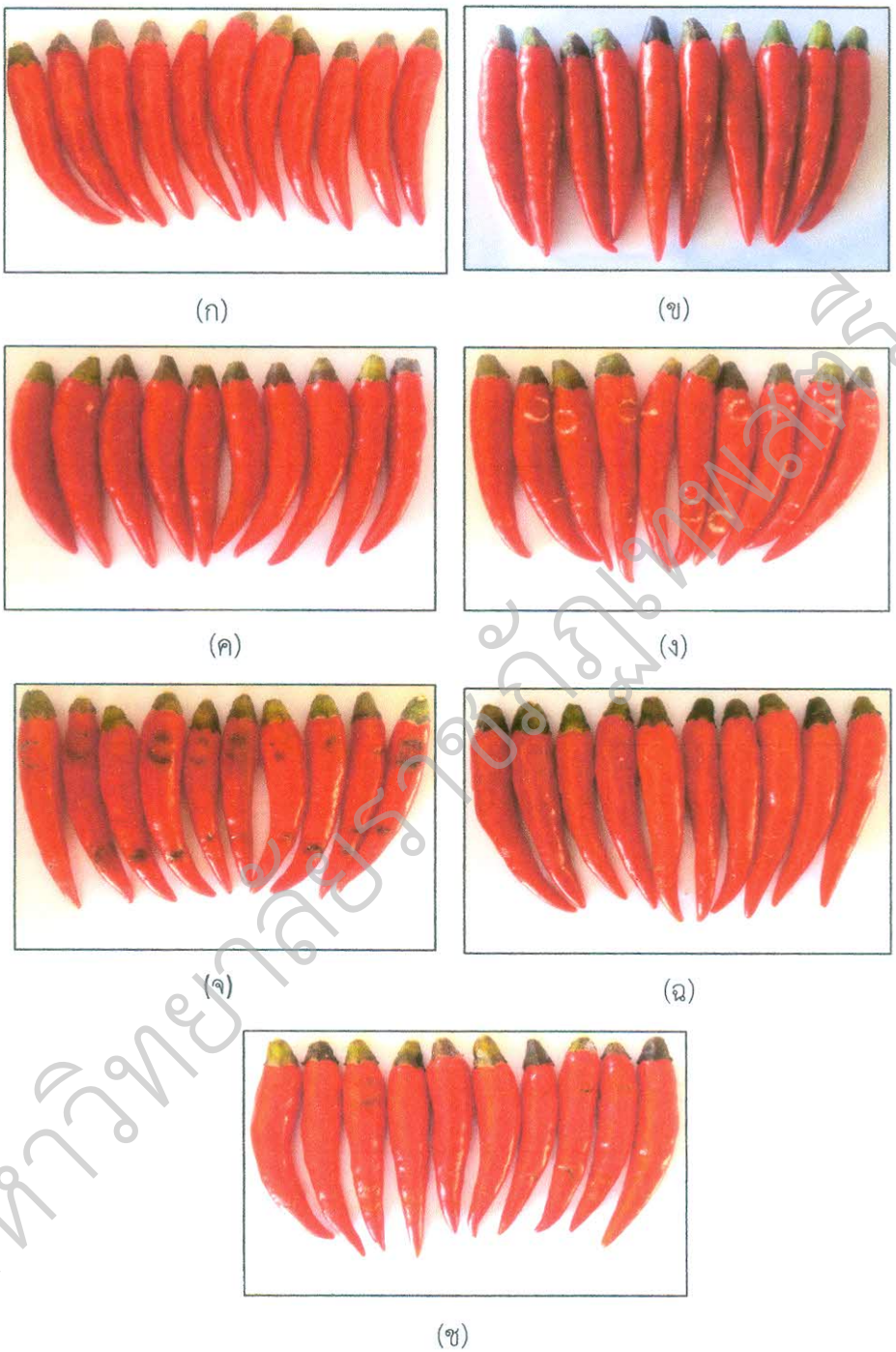
จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนผลพริก ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 และ 8 พบว่าในชุดควบคุม ผลพริกมีลักษณะปกติ ไม่มีรอยการเกิดแผลจากการติดเชื้อ ในชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่ามีลักษณะคล้ายกับในชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่บาดแผล นั่นคือไม่มีรอยการเจริญของเชื้อราบนผลพริก ในขณะที่ชุดที่ปลูกเชื้อราทั้งสองชนิดพบว่ามีการเจริญของเชื้อราแตกต่างกัน คือ ในชุดที่ปลูก *C. gloeosporioides* บริเวณบาดแผลมีเส้นใยสีขาวเจริญอย่างชัดเจน และชุดที่ปลูกเชื้อ *C. capsici* บาดแผลมีลักษณะเป็นรอยแผลช้ำสีดำ ซึ่งแสดงถึงการความสามารถในการทำเกิดโรคของเชื้อราทั้งสองชนิด

ในชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides* พบว่าผลพริกมีการเจริญของเชื้อบริเวณรอยแผลน้อยกว่าชุดที่ปลูกแต่เชื้อราอย่างเดียวอย่างเห็นได้ชัดเจน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ส่วนชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต SA19-1 ร่วมกับ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ผลพริกมีรอยโรคในปริมาณมากใกล้เคียงกับชุดที่ปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* เท่ากับ 6 และ 16 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

ชุดการทดลอง	การยับยั้ง (%)
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100
C. gloeosporioides	0
C. capsici	0
SA13-2	100
SA19-1	100
SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides*	59
SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici*	50
SA19-1ร่วมกับ *C. gloeosporioides*	6
SA19-1 ร่วมกับ *C. capsici*	16

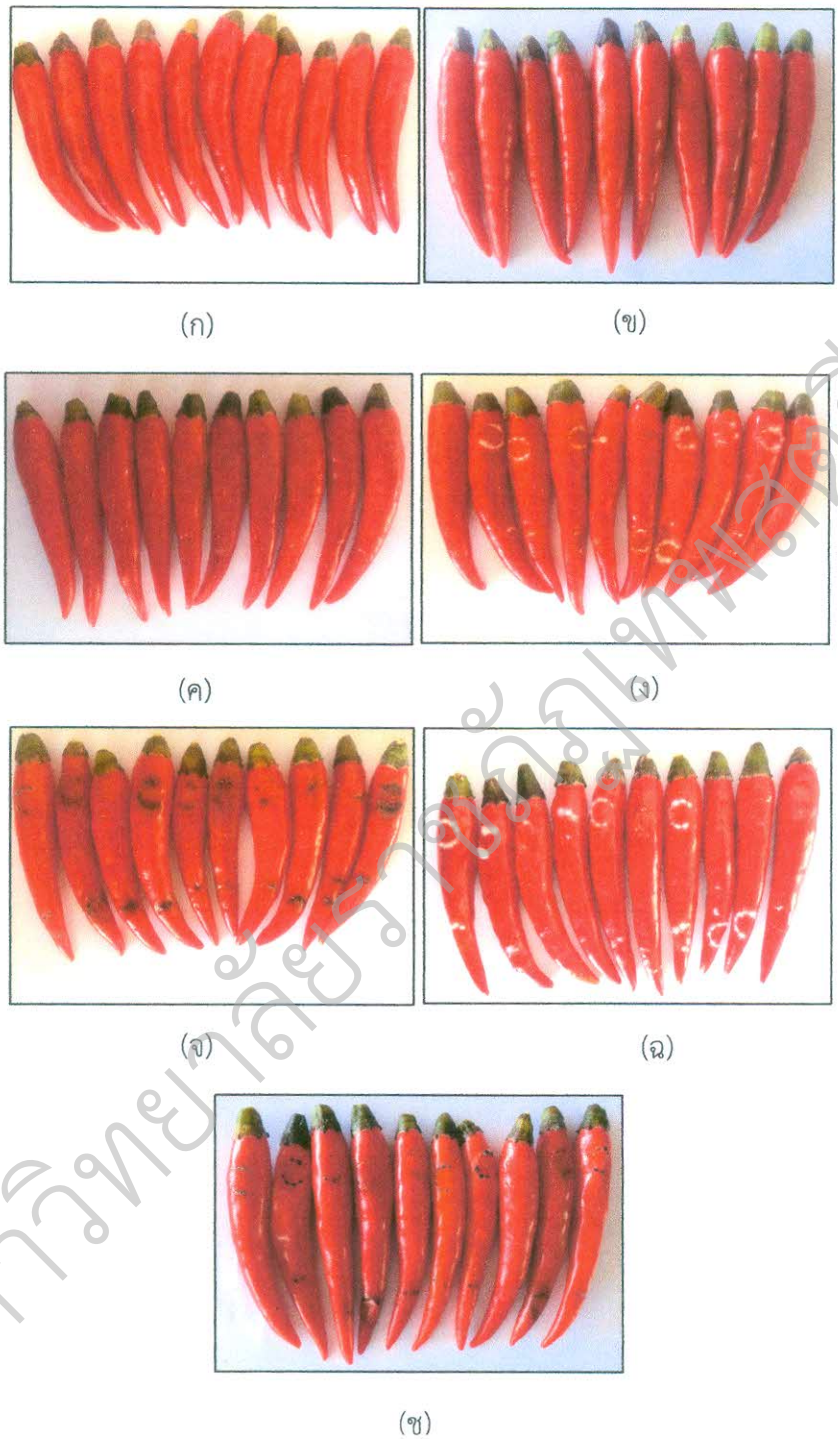
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2

(ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ค) ไอโซเลต SA13-2 (ง) *C. gloeosporioides* (จ) *C. capsici* (ฉ) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides* (ช) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



ภาพที่ 8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA19-1

(ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ค) ไอโซเลต SA19-1 (ง) *C. gloeosporioides*

(จ) *C. capsici* (ฉ) ไอโซเลต SA19-1 ร่วมกับ *C. gloeosporioides*

(ช) ไอโซเลต SA19-1 ร่วมกับ *C. capsici*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

จากผลการทดลองการยับยั้งเชื้อราบนผลพริก พบว่า ไอโซเลต SA13-2 มีความสามารถในการยับยั้งที่ดีกว่าไอโซเลต SA19-1 ดังนั้นจึงนำไอโซเลต SA13-2 มาทดลองในขั้นตอนการทดลองต่อไป

4.4 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริก

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริก ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 14 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา สังเกตจากต้นและปริมาณรากของต้นที่ทำการทดลอง ซึ่งบริเวณใบและต้นของต้นกล้าพริกทั้งหมดไม่มีรอยโรคปรากฏ ในขณะที่บริเวณรากของต้นกล้าพริกมีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อปลูกเชื้อราก่อโรค พบว่ามีผลกระทบต่อปริมาณรากของต้นกล้าพริก คือมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ปลูกแต่แอคติโนมัยสีไอโซเลต SA13-2 พบว่ามีปริมาณรากมากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อปลูกแอคติโนมัยสีไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* พบว่ามีปริมาณรากใกล้เคียงกับชุดควบคุมและชุดที่ปลูกแอคติโนมัยสีทอย่างเดียว แสดงถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าพริก

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ชุดควบคุม (1) (2) (3) (4) (5)

ภาพที่ 9 ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นกล้าพริกขี้หนู
(1) ไอโซเลต SA13-2 (2) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides*
(3) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici* (4) *C. gloeosporioides* (5) *C. capsici*

4.5. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริก

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริก โดยปลูกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสและแอคติโนมัยสีทบนต้นพริกที่ปลูกเป็นเวลา 90 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10 จากการสังเกตลักษณะของต้น ในด้านความสูงและการแตกกิ่งก้านของต้นพริก พบว่าต้นพริกมีทุกชุดการทดลองมีความสูงของต้นไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ต้นพริกที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว ลักษณะใบมีสีเหลืองและลำต้นผอม ส่วนชุดการทดลองที่เติมเชื้อรา *C. capsici* เพียงอย่างเดียวไม่มีผลกระทบกับการแตกกิ่งก้าน มีการแตกกิ่งก้านมากกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ชุดที่เติมแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 พบว่ามีการแตกกิ่งก้านของต้นพริกมากกว่าชุดควบคุม แสดงถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นพริกของ ไอโซเลต SA13-2

ห้องวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6)

ภาพที่ 10 ลักษณะของต้นพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส โดยแอคติโนมัยสีท

(1) ชุดควบคุม (ไม่มีการปลูกเชื้อ)

(2) ไอโซเลต SA13-2

(3) *C. gloeosporioides*

(4) *C. capsici*

(5) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides*

(6) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ชุดการทดลองที่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติม *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวพบว่าต้นมีลักษณะเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด คือ มีปริมาณกิ่งก้านที่เพิ่มขึ้นและมีใบมากขึ้น ในส่วนชุดที่การปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติม *C. capsici* เพียงอย่างเดียวพบว่าลักษณะต้นมีการแตกกิ่งก้านมากขึ้นและลำต้นมีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสอาจจะไม่แสดงอาการที่ลำต้นที่ชัดเจน ดังนั้นผลกระทบที่เกิดขึ้นกับลำต้นจึงพบไม่มาก โดยหากมีการติดเชื้อในระยะต้นโต โดยเชื้อรา *Colletotrichum* จะเข้าทำลายใบพริกทำให้ใบพริกมีอาการใบจุด (leaf spot) และเกิดการอาการแห้งตายจากปลายยอดเข้ามา (die back) (พรนภา, 2554)

จากการสังเกตลักษณะของรากต้นพริกที่มีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส แสดงดังภาพที่ 11 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อใดๆ ปริมาณรากในต้นชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีท SA13-2 มีมากกว่าชุดควบคุม เมื่อมีการปลูกเชื้อราก่อโรคลงไปในต้นพริก พบว่าปริมาณรากลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ควบคุมและชุดที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีท SA13-2 รวมถึงปริมาณรากในชุดที่มีการปลูกเชื้อราร่วมกับแอคติโนมัยสีท พบว่ามีปริมาณมากกว่าต้นในชุดที่เติมเชื้อราเพียงอย่างเดียว จากการทดลองแสดงให้เห็นถึงเชื้อรามีผลต่อปริมาณราก โดยแอคติโนมัยสีทสามารถเพิ่มจำนวนรากซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของพริกได้

ลักษณะของผลพริกที่มีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส แสดงดังภาพที่ 12 พบว่าในชุดที่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 เพียงอย่างเดียว ลักษณะของผลพริกปกติใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่มีการเติมเชื้อใดๆ ส่วนผลพริกในชุดที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* สามารถก่อโรคบนพริกได้อย่างชัดเจน โดยในชุดที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* เกิดรอยแผลช้ำ เป็นจุดที่ดำ ทำให้ผิวผลพริกไม่เรียบ ผลพริกมีลักษณะโค้งงอ และมีขนาดเล็ก ส่วนผลพริกในชุดที่มีการปลูกเชื้อ *C. capsici* มีอาการของโรคแอนแทรคโนสเด่นชัดแม้ยังอยู่ในระยะที่ผลยังมีสีเขียว มีรอยช้ำเน่าภายใน ผิวของผลพริกยับย่น และมีขนาดเล็ก ในชุดที่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับเชื้อรา พบว่าปริมาณผลพริกที่มีรอยโรคลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงถึงความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการควบคุมเชื้อรา

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

(1) (2) (3) (4) (5) (6)

ภาพที่ 11 ลักษณะของรากพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส โดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2

(1) ชุดควบคุม

(2) ไอโซเลต SA13-2

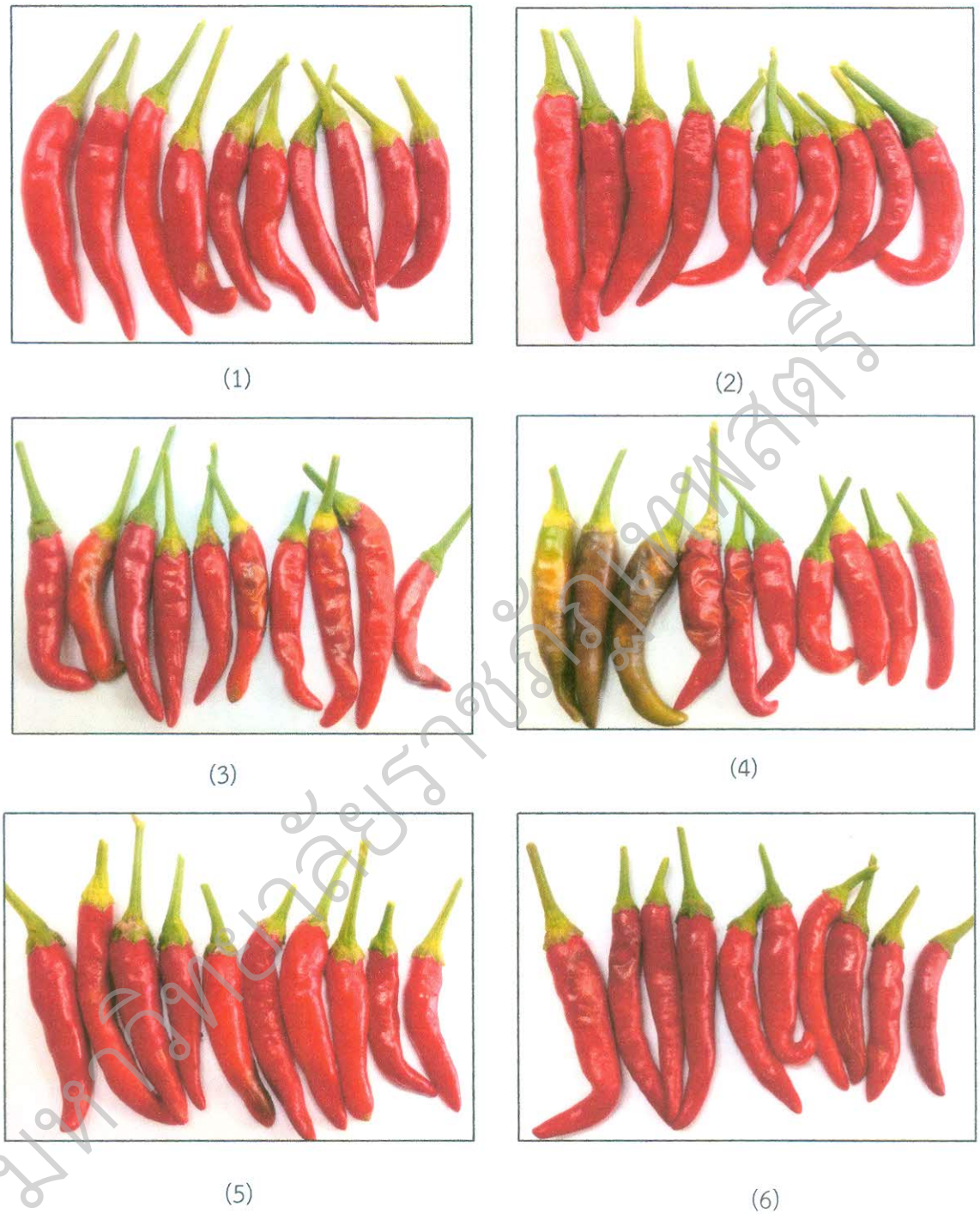
(3) *C. gloeosporioides*

(4) *C. capsici*

(5) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. gloeosporioides*

(6) ไอโซเลต SA13-2 ร่วมกับ *C. capsici*

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม



(1) (2)

(3) (4)

(5) (6)

ภาพที่ 12 ลักษณะของผลพริกขี้หนูที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส โดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2

(1) ชุดควบคุม (2) ไอโซเลต SA13-2 (3) *C. gloeosporioides* (4) *C. capsici*

(5) ไอโซเลต SA13-2 **ร่วมกับ** *C. gloeosporioides*

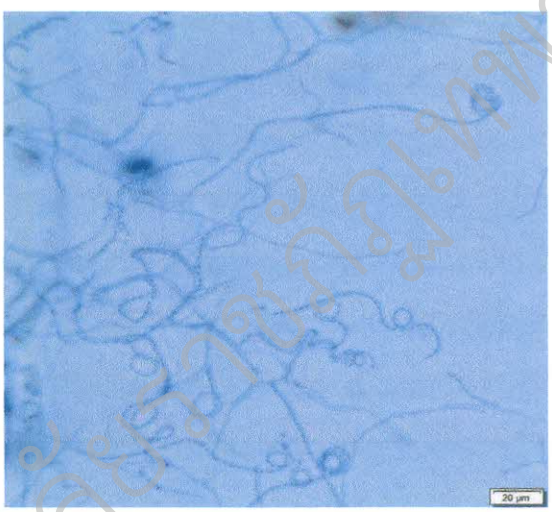
(6) ไอโซเลต SA13-2 **ร่วมกับ** *C. capsici*

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

4.6 การศึกษาคุณสมบัติของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2

1) ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและสปอร์ของแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 มาศึกษาลักษณะของเส้นใยและการจัดเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 มีลักษณะสปอร์เป็นแบบ Rectinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอเป็นวงปิดหรือเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น แสดงในภาพที่ 13 ซึ่งลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ได้เป็น *Streptomyces*

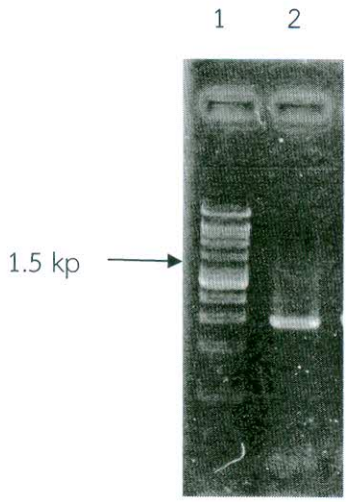


ภาพที่ 13 รูปร่างเส้นใยและการจัดเรียงสปอร์ของไอโซเลต SA13-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

2) การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

จากการนำแอคติโนมัยสีทไปทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ16S rDNA โดยวิธี PCR พบว่าชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (แสดงดังภาพที่ 14) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปจำจัดจำแนกสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลต SA13-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces levis* (GenBank: accession number GU479447.1) ร้อยละ 99

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1,500 คู่เบส จากการทำ PCR
Lane 1 DNA Ladder
Lane 2 ไอโซเลต SA13-1

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการนำแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 และ SA19-1 ที่แยกได้จากดินบริเวณเขาขวางมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* พบว่าในการทดสอบขั้นต้นมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดเท่ากับ 82.75-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลตมาทดการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสโดยใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ พบว่าไอโซเลต SA13-2 สามารถยับยั้งได้เชื้อราทดสอบทั้งสองชนิด 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลต SA19-1 ยับยั้งได้เชื้อราได้ต่ำสุด

จาการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนู โดยการปลูกเชื้อบนบาดแผล พบว่าไอโซเลต SA13-2 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้โดยการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ 59 เปอร์เซ็นต์ และ ยับยั้ง *C. capsici* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต SA19-1 สามารถยับยั้งได้ 6-16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าไอโซเลต SA19-1 มีความสามมารถยับยั้งต่ำ ดังนั้นจึงเลือก ไอโซเลต SA13-2 ไปประเมินการยับยั้งในระดับต้นกล้าและต้นพริกต่อไป

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในต้นกล้าพริก พบว่าต้นกล้าพริกไม่แสดงลักษณะอาการโรคบนต้นและใบ เมื่อพิจารณาจากปริมาณรากพบว่าต้นกล้าพริกที่ปลูกเชื้อ SA13-2 มีความสามารถในการยับยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่เชื้อราทดสอบ

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราแอนแทรคโนสบนต้นพริก โดยการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อราในต้นพริกอายุ 90 วัน พบว่าต้นพริกไม่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส ในส่วนของลำต้นและราก พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 สามารถช่วยให้ต้นพริกมีการแตกกิ่งก้าน และลำต้นมีขนาดใหญ่และมีปริมาณรากมากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่มีการปลูกเชื้อรา แสดงถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นพริกของไอโซเลต SA13-2

ลักษณะของผลพริกที่มีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 สามารถลดปริมาณผลพริกที่มีเป็นโรคลงได้ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการควบคุมเชื้อรา

5.2 ข้อเสนอแนะ

ทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต SA13-2 ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การสร้างฮอร์โมนพืช การละลายฟอสเฟต และการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายต่างๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

บรรณานุกรม

จิราวรรณ ฉายาวัฒน์ และ เจนจิรา เดชรักษา. 2557. **ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชในเขตพื้นที่เขาขวาง จังหวัดลพบุรี**. รายงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.

ฉัตรสุดา เผือกใจแผ้ว. 2551. **ประสิทธิภาพของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาด.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทิสนา นิธิสกุลกาญจน์. 2550. **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดยแอคติโนมัยซีตที่แยกจากมูล สัตว์กินพืช**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนวันต์ กันทา. 2548. **การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากผิวของผลสตรอเบอรี่ มะม่วง และส้มเพื่อควบคุม โรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยชีววิธี**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นราวรรณ ปั้นงาม อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์. 2554. แอคติโนมัยสีทจากดินนาและความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าว. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. ครั้งที่ 49: สาขาวิทยาศาสตร์. หน้า 234-241.

ปิยะธิดา พุกคล้าย. 2549. **การคัดเลือกแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรนภา โทตรี. 2554. **ผลของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก.** ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. **การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

มัลลิกา หมูแก้ว. 2550. **การประเมินความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. **การแยกแอคติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวก.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัติกาล ยุทธศิลป์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2555. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก. **แก่นเกษตร 40.** ฉบับพิเศษ : 224-232.

วรณิมา ชุดพิมาย. 2555. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อสเตรปโตมัยซิสปฏิปักษ์ สาหรับควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วสันณ์ เพชรรัตน์ และ ปฏิมาพร ปลอดภัย. 2551. **การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยวิธีชีววิธี**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วีรวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร. (2544). **สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ติดเชื้อแอคติโนฟาจ.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรีสกุล ชนะพันธุ์. 2553. **การคัดแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติคแอคติโนมันซีสที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2549. **จุลชีววิทยาทางดิน**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ. (2558, สิงหาคม 16). พริกสมุนไพรน่าสนใจใช้ควบคุมศัตรูพืช. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: www.doa.go.th/apsrdo/media/research/pepper.doc

Khucharoenphaisan, K., Sinma, K. and Lorrungrung, C. 2013. Efficiency of actinomycetes against phytopathogenic fungus of chilli anthracnose. Journal of Applied Science. 13(3): 477-428.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Prabavathy, V. R., Mathivanan, N., amd Murugesan, Kandasamy. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. **Biological Control**. 39: 313–319.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences.** 4(5):330-337.

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี