ประเมินการใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. สำหรับควบคุมโรคราเมล็ดผักกาดและโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูโดยชีววิธี

Evaluation of *Streptomyces* spp. for Biological Control of Sclerotium Root and Stem Rot and Ralstonia Wilt of Chili Pepper

ไสว บัวแก้ว

Sawai Boukaew

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประเมินการใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. สำหรับควบคุมโรคราแมล็ดผักกาดและโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูโดยชีววิธี

ผู้เขียน นายไสว บัวแก้ว

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกษม สร้อยทอง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ

(ดร.อำไพทิพย์ สุขหอม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประเมินการใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. สำหรับควบคุมโรคราเมล็ดผักกาดและโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูโดยชีววิธี

ผู้เขียน นายไสว บัวแก้ว

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อสำรวจหาเชื้อ *Streptomyces* spp. เพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคราเมล็ดผักกาด (*Sclerotium rolfsii*) และโรคเหี่ยวเขียว (*Ralstonia solanacearum*) ของพริกขี้หนูโดยชีววิธี จากการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริก และยางพาราจำนวน 265 ไอโซเลท เพื่อหาเชื้อที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S12 โดยวิธี dual culture plate พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 36 ไอโซเลท (14.10%) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 30.18 – 80.05 % หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* spp. 14 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 60.00% ขึ้นไป มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* R7 โดยวิธี agar well disc diffusion พบว่ามีเชื้อ *Streptomyces* spp. เพียง 3 ไอโซเลท ที่แสดงการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* R7 โดยทำให้เกิดวงใสขนาด 26.0 – 31.0 มม. หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis ได้เป็น *Streptomyces mycarofaciens* (isolate SS-2-243), *S. philanthi* isolate1 (isolate RL-1-178) และ *S. philanthi* isolate2 (isolate RM-1-138) เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ หลังจากได้รับความร้อนที่ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสารยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* เสื่อมสลายไปบางส่วน แต่สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* เสื่อมสลายไปทั้งหมด การทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการงอกของพริก โดยนำเมล็ดพริกไปแช่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. และเพาะเมล็ดพริกในกล่องชื้น เป็นเวลา 10 วัน พบว่า *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ด และการเจริญของต้นกล้าโดยเฉพาะการเจริญของรากเป็นอย่างมาก จึงไม่นำ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

นำเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ไปทดสอบการยับยั้งโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซินในเรือนทดลอง พบว่าเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของโรคราก และโคนเน่าได้เท่ากับการใช้ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซิน ส่วนการใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ร่วมกับเชื้อ *S. mycarofaciens* สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวเขียวของพริกที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ในระยะต้นกล้าเทียบเท่ากับการใช้สารสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต และการใช้ *T. harzianum* ไม่สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวเขียวจากเชื้อแบคทีเรียได้ ในการทดลองในสภาพแปลงปลูกย้ายต้นกล้าพริกที่มีอายุ 30 วัน ลงในถุงขนาด 8 x 16 ซม. ซึ่งมีดินปลูก 3 กิโลกรัม หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* ลงในดินปลูกพริก ห่างจากโคนต้นพริก 5 ซม. หลังจากนั้นจึงใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ควบคุมโรคทุก ๆ 7 วัน เปรียบเทียบกับการใช้ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต พบว่า *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถป้องกันการเข้าทำลายของต้นพริกจากเชื้อสาเหตุโรค *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* ได้ดีกว่าการใช้ เชื้อ *S. mycarofaciens* หรือการใช้เชื้อ *T. harzianum* ในการใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นพริกจนสิ้นสุดการทดลองสูงที่สุดถึง 58.75% และผลการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการใช้สารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต ส่วนผลผลิตพริกจากการใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และสารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต คือ 38.32 และ 33.25 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ

Thesis Title	Evaluation of *Streptomyces* spp. for Biological Control of Sclerotium Root and Stem Rot and Ralstonia Wilt of Chili Pepper
Author	Mr. Sawai Boukaew
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2009

ABSTRACT

The objective of this study was to explore the *Streptomyces* spp. for biological control of root and stem rot (*Sclerotium rolfsii*) and wilt (*Ralstonia solanacearum*) of chili pepper. Two hundred and sixty five isolates of *Streptomyces* obtained from the rhizosphere of chili pepper and pararubber soils were tested *in vitro* for their inhibitory effects on the mycelial growth of *S. rolfsii* S12 by dual culture plate technique. Thirty six isolates (14.10%) inhibited *S. rolfsii* mycelial growth between 30.18 – 80.05 % after 4 days incubation. Then, Fourteen promising isolates that inhibited *S. rolfsii* S12 mycelial growth more than 60% were further tested for their ability to suppress the bacteria *R. solanacearum* R7 by agar well diffusion technique. Three isolates out of them inhibitory effects *R. solanacearum* R7 with a clear zone of 26.3–31.0 mm in diameters, 2 days after incubation. From the morphological, biochemical and partial 16S rDNA sequence analysis studies, they were identified as *S. mycarofaciens* (isolate SS-2-243), *S. philanthi* isolate1 (isolate RL-1-178) and *S. philanthi* isolate2 (isolate RM-1-138). The culture filtrate of each isolate was prepared and was used to determine the effects on *S. rolfsii* and *R. solanacearum* growth. The results suggested that all three isolates produced both antifungal and antibacterial substances which were secreted into the medium. The efficacy of substance in culture filtrate that inhibited *S. rolfsii* mycelial growth was decreased but those inhibited *R. solanacearum* growth disappearing after being heated at 121 °C for 20 minutes. The effects of selected *Streptomyces* isolates on chili pepper seedlings were determined in moisture chamber; the sterilized chili seeds were soaked in non-sterile culture filtrate of *Streptomyces* spp. and incubated in moisture chamber for 10 days. The results revealed that *S. philanthi* isolate2 had strongly inhibited seed germination and seedling growth, particularly on root elongation. Therefore, *S. philanthi* isolate2 was not used in the next studies.

S. mycarofaciens and *S. philanthi* isolate1 were further tested against root and stem rot and wilt diseases compared to *T. harzianum* and carboxin treatment in a greenhouse condition. The results indicated that the efficacy of *S. philanthi* isolate 1 in suppressing the root and stem rot was equal to *T. harzianum* and carboxin treatment. *S. philanthi* isolate 1 and *S. mycarofaciens* also suppressed the *Ralstonia* wilt of chili pepper at seedling stage. Their efficacy was the same as streptomycin sulfate treatment and it was observed that *T. harzianum* had no effective on the bacterial wilt. At field plots experiment, the 30 days old chili pepper seedlings were transplanted into 8x16 cm plastic bags containing 3 kg of non-sterilized soil. All bags were placed under field condition for 15 days. Then, all bags were inoculated with the *S. rolfsii* and *R. solanacearum* on the soil surface, 5 cm apart from the chili plants. *Streptomyces* spp. applied near the chili plants at a every 7 day interval. *T. harzianum* and carboxin + streptomycin sulfate were also applied to compare the efficacy with the *Streptomyces* isolates. The results showed that *S. philanthi* isolate 1 could protect the chili plants from *S. rolfsii* and *R. solanacearum* infection better than *S. mycarofaciens* or *T. harzianum*. The highest percentage of survival in chili pepper plants was 58.75% at the end of the experiment in the *S. philanthi* isolate1 treatment and its efficacy was not significantly different from the carboxin+streptomycin sulfate treatment. Yield from the *S. philanthi* isolate1 and carboxin+streptomycin sulfate treatment were 38.32 and 33.25 kg/rai, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และแก้ไขจุดบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร คันธโชติ และ ดร. อำไพทิพย์ สุขหอม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแก้ไขข้อบกพร่อง ในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2551 และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ภาควิชาจุลชีววิทยา ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง คุณปัทมพร อินสุวรรณโณ คุณสุภาพ จันทรัตน์ และคุณจำลอง ชูกำเนิด ที่ให้ความช่วยเหลือด้านธุรการ และเอื้ออำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นแรงผลักดัน และเป็นกำลังใจที่สำคัญให้ผู้เขียนมีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ พี่ติ๋ม พี่หนู พี่แป้ง พี่กวาง พี่เอม ตลอดจนพี่ ๆ น้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ไสว บัวแก้ว

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	20
วัสดุ และอุปกรณ์	20
วิธีการทดลอง	22
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
4. สรุปผลการทดลอง	81
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	95
ประวัติผู้เขียน	121

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces spp.* และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์	11
2.	การศึกษาการใช้ *Streptomyces spp.* บางชนิดที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืช	16
3.	จำนวนตัวอย่างดิน และเชื้อ *Streptomyces spp.* ที่แยกได้จากแปลงปลูกพริกและสวนยางพาราที่เก็บในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคใต้	44
4.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces spp.* ไอโซเลทต่างๆ	48
5.	ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* โดย *Streptomyces spp.* โดยวิธี agar well diffusion	52
6.	แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces spp.* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว	57
7.	ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces spp.* ในการสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase และ chitinase โดยประเมินจากขนาดของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate เฉพาะ	59
8.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ Streptomyces spp. ด้วยวิธีการกรองและการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	64
9.	การยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces spp.* โดยวิธีการกรองและการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	65
10.	เปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด ของต้นพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces spp.*และ *Trichoderma spp.* ก่อนการเพาะ	67
11.	จำนวนต้นที่งอกและรอดตาย เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ S. mycarofaciens, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และเชื้อ *T. harzianum* ก่อนการเพาะลงในดิน	70
12.	เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย และจำนวนต้นสมบูรณ์ (อยู่รอด) หลังจากปลูกในดินที่มีเชื้อ *S. rolfsii* และเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเวลา 2 เดือน โดยทำการป้องกันโรคด้วยวิธีการต่าง ๆ	79

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	อาการโรคที่พบในธรรมชาติ จากการปลูกเชื้อ และเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า	39
2.	อาการโรคเหี่ยวเขียวที่พบในธรรมชาติ เชื้อสาเหตุ และการปลูกเชื้อ	41
3.	ลักษณะ สี และโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร GYM ที่คัดแยกได้จากดินปลูกพริก	43
4.	การเจริญของรา *S. rolfsii* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร GYM	50
5.	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* โดย *Streptomyces* spp. โดยวิธี agar well diffusion หลังจากการเลี้ยงร่วมกัน 2 วัน	53
6.	ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลทต่างๆ อายุ 14 วัน	56
7.	ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ glucanase และ chitinase ที่เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างขึ้นหลังทดสอบ 5 วัน	60
8.	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofarciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-9 วัน	62
9.	การยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-9 วัน	62
10.	ต้นพริกที่งอกและมีชีวิตรอดหลังจากปลูกเชื้อ *S. rolfsii* เป็นเวลา 14 วัน	71
11.	ต้นพริกอายุ 1 เดือน ที่คลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 เชื้อ *T. harzianum* น้ำ และสเตรปโตมัยซิน แสดง อาการเหี่ยวหลังทำการปลูกเชื้อ *R. solanacearum*	72
12.	ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลท 1 ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร GYM	74

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13.	เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรครากเน่าและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต	77
14.	เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรครากเน่าและโคนเน่า (*S. rolfsii*) เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต	77
15.	เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรคเหี่ยวเขียว (*R. solanacearum*) เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ*S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต	78
16.	อาการโรค จากการปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว เป็นเวลา 45 วัน	80

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

พริกจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากพริกเป็นพืชที่ใช้บริโภคภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ทั้งในเขตยุโรป อเมริกา และเอเชีย ในรูปของพริกสด พริกแห้ง พริกป่น และเมล็ดพันธุ์พริก (นิรนาม, 2547) แต่ปริมาณที่ผลิตได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค อันเป็นผลเนื่องมาจากการปลูกพริกมักประสบปัญหาจากทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* Sacc. สาเหตุโรครากและโคนเน่า (root and foot rot) เชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*., 1995 สาเหตุของโรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) เชื้อ *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. & Bisby. สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyd. & Hans. สาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) เชื้อ *Rhizoctonia solani* Kuhn สาเหตุของโรครากเน่า (Rhizoctonia root rot) เชื้อ *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chit. สาเหตุโรครากปม (root knot) และเชื้อ *Phytophthora palmivora* Butler สาเหตุโรครากและโคนเน่า (root and foot rot) เชื้อเหล่านี้ทำความเสียหายให้กับการผลิตพริกเป็นอย่างมาก และในจำนวนนี้โรคที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* เป็นโรคทางรากที่สำคัญระบาดทำความเสียหาย เนื่องจากเป็นเชื้อที่เข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญ และเชื้อทั้ง 2 สามารถอาศัยอยู่ในดินทำให้การควบคุมโดยวิธีการต่างๆ ไม่ได้ผล ในการควบคุม และกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เกษตรกรนิยมปฏิบัติกันโดยทั่วไป คือ การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่มของสารประกอบทองแดง (copper fungicide) และสารปฏิชีวนะ ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ผลิต ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นแนวทางที่ควรมีการศึกษาและพัฒนาให้เกิดขึ้น เพื่อให้ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชมีหลายชนิด โดยมีกลไกในการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2544)

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme ได้หลายชนิด เช่น cellulase, hemicellulase, chitinase, amylase และ xylanase จากการศึกษาของ Neugebauer และคณะ (1991) พบว่าเชื้อ *Streptomyces lividans* สามารถสร้าง chitinase และปล่อยออกมานอกเซลล์โดยการสร้าง chitinase จะถูกชักนำด้วยไคติน และอนุพันธุ์ของไคติน และสามารถพบ chitinase และ chitiobiase ที่ย่อยสลายไคตินและไคโตซานได้ ในขณะเดียวกันเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *S. cinereoruber* และ

S . viridificans สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Aspergillus niger* และเชื้อราก่อโรคหลายชนิดได้ (Okazaki and Takawa, 1991 ; Gupta *et al*., 1995) นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และ secondary metabolite หลายชนิดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญ หรือเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย สารปฏิชีวนะในแต่ละกลุ่มมีกลไกในการทำงานที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีผลต่อต้านจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันด้วย (เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, 2545; Baron *et al.*, 1993; Thummabenjapone and Pachinburavan, 2002)

ตรวจเอกสาร

โรคของพริก

ก. โรครากและโคนเน่า (root and foot rot) ของพริก

เชื้อสาเหตุ *Sclerotium rolfsii*

ราก และโคนต้นพริกที่ถูกเชื้อรา *S. rolfsii* เข้าทำลายโคนต้นและรากจะเน่าเปื่อย เป็นสีน้ำตาล ในดินแถวโคนต้นมีเส้นใยราสีขาว ซึ่งบางส่วนเจริญขึ้นไปเกาะอยู่ตามโคน และรากของต้นพริก ถ้าสังเกตดูโคนต้นและดินรอบ ๆ โคนต้นจะมีเม็ดสีขาว น้ำตาลอ่อนและน้ำตาลแก่ ขนาดเท่าเมล็ดผักกาด เกิดขึ้นปะปนอยู่กับเส้นใยรา พริกแสดงอาการใบเหลืองร่วง ต้นพริกเหี่ยวยืนต้นตาย มักพบต้นพริกตายในระยะที่กำลังเจริญ หรือในระหว่างกำลังผลิดอกออกผล (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

การป้องกันกำจัดโรคราก และโคนเน่า

อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2546) แนะนำว่าเมื่อพบต้นที่เป็นโรคให้ขุดเอาดิน และต้นที่เป็นโรครวบรวมไปเผาไฟทำลาย รวมทั้งปรับปรุงดินด้วยปูนขาว 200 - 300 กิโลกรัม และใส่ปุ๋ยอินทรีย์ประมาณ 2 - 4 ตัน/ไร่ เพื่อลดปริมาณเชื้อ *S. rolfsii* ในดิน และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และให้ปลูกพืชอื่น ๆ สลับหมุนเวียนอย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 5 ปี

การควบคุมโรครากและโคนเน่าโดยเชื้อ *Streptomyces* spp.

สำหรับการควบคุมโรคราก และโคนเน่าของพริกโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ยังไม่มีรายงาน แต่มีรายงานการควบคุมโรคราก และโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* โดย อรอุษา ลาวินิจ และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (2549) ได้ทดสอบความสัมพันธ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลท กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp., *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa* และ *B. subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ร่วมกันในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ในมะเขือเทศ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 33 ไอโซเลท สามารถเจริญร่วมกันได้ดีกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* ไอโซเลท 87 และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T14, T17, T18, T19 และ T25 สามารถเจริญร่วมกันได้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด การทดสอบในระดับเรือนทดลองพบว่า *Trichoderma* ไอโซเลท T17 ร่วมกับ *Streptomyces* ไอโซเลท 22, *Trichoderma* ไอโซเลท T19 ร่วมกับ *Streptomyces* ไอโซเลท 87 และ *Trichoderma* ไอโซเลท T19 สามารถใช้ร่วมกับ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดได้ดี

ข. โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt)

เชื้อสาเหตุ *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวที่ทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และพบเชื้อชนิดนี้ระบาดไปทั่วโลก สามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจได้มากกว่า 200 ชนิด ในทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะกล้าจนกระทั่งให้ผลผลิตและเก็บเกี่ยว อาการที่ปรากฏสังเกตเห็นพืชแสดงอาการเหี่ยวที่ยอดก่อน โดยยอดแสดงอาการเหี่ยวในเวลากลางวัน และฟื้นในตอนกลางคืน ต่อมาจะเหี่ยวถาวร ทั้งใบล่าง และใบบน เมื่อนำส่วนโคนต้นที่เป็นโรคมาตัดดูตามขวางจะพบวงแหวนสีน้ำตาลเป็นวงบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร และพบเมือก (bacterial ooze) มีสีขาวขุ่น ลักษณะเหนียวหนืดบริเวณรอยตัด เมื่อนำส่วนที่ตัดไปแช่น้ำ ปรากฏกลุ่มของแบคทีเรียไหลลงมาเป็นสายยาวสีขาวขุ่นภายใน 2 - 5 นาที ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (ศักดิ์ สุนทรสิงห์ , 2537)

การป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวเขียว

ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) แนะนำให้งดปลูกพืชในดินที่เคยเป็นโรคอย่างน้อย 6 ปี เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่สะสมอยู่ในแปลงปลูก และควรเลือกเมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค หากไม่แน่ใจให้ฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกในน้ำอุ่น 49 – 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และในการปลูกพริกควรปรับสภาพดินให้เป็นด่าง หรือเป็นด่างเล็กน้อยโดยการเติมปูนขาวหรือปุ๋ยอินทรีย์ลงไปในดินมาก ๆ เพื่อไม่ให้มีสภาพเหมาะต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค

การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวโดยเชื้อ *Streptomyces* spp.

สำหรับการควบคุม โรคเหี่ยวเขียวของพริกโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ยังไม่มีรายงาน แต่มีรายงานการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ โดย เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และอัศนี ปาจีนบูรวรรณ์ (2549) ซึ่งทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่ามี 8 ไอโซเลท ได้แก่ #13, #15, #17, #22, #33, #37, #87, และ #105 แสดงการยับยั้งที่ชัดเจน และสม่ำเสมอ จากการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง โดยใช้ *Streptomyces* ไอโซเลท #15, #33, และ #87 โดยวิธีการคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยเชื้อ *Streptomyces* ทั้งสามไอโซเลทก่อนปลูก และใส่อีกครั้งเมื่อต้นกล้าอายุ 12 วัน ทำการย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุได้ 15 วันลงในกระถางซึ่งใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก ที่มีเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า เชื้อ *Streptomyces* #87 ลดการเกิดโรคเหี่ยวเขียวได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces*#15 และ #33 โดยพบการเกิดโรคเหี่ยวเขียวเพียง 15 % , 25% และ 35% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่มีเชื้อ *Streptomyces* spp. พบการเกิดโรคที่ระดับ 85% นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* #87 ส่งเสริมให้ระบบรากมะเขือเทศเจริญพัฒนาได้ดีกว่าไอโซเลทอื่น ๆ

เมธาวี ธิมาศ และคณะ (2549) ทำการคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีความสามารถสูง (*Sterp* -15 และ *Strep* -87) ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศมาศึกษาความคงตัวของเชื้อต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค โดยนำเชื้อ *Streptomyces* ทั้งสองสายพันธุ์มาเพิ่มปริมาณในพีทมอสนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน สุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบทุกเดือน พบว่าประชากรของเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยง และเก็บรักษานาน 1 - 2 เดือน มีจำนวนประชากร 10^5 cfu / g และลดเป็น 10^2 cfu / g หลังเก็บ 4 เดือน พบลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปโดยเชื้อ *Strep* - 15 มี 5 ลักษณะ และ *Strep* - 87 มี 11 ลักษณะ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ของเชื้อ *Strep* - 15 ทั้ง type strain และ mutant strain ให้ผลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ mutant strain จาก *Strep* - 87 บางลักษณะมีความสามารถในการยับยั้งได้ดีกว่า type strain จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการผันแปรของลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. เกิดขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ และเก็บรักษาในพีทมอสแต่ไม่มีผลเสียต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

ลักษณะของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptomycetaceae เป็นสกุลที่มีจำนวนมาก และสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อรา พบมากในดินบริเวณที่มีเศษซากวัสดุเน่าเปื่อย และอาจพบอยู่ภายในต้นพืชในลักษณะเป็นเอนโดไฟท์ (endophyte) หรือเป็นแซพโปรไฟท์ (saprophyte) อยู่บริเวณรอบรากพืช (Coombs and Franco, 2003) เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างเส้นใยในอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เส้นใยอากาศจะสร้างสายสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบลูป (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) ลักษณะผิวสปอร์ มี 5 แบบ คือ ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) ผิวเรียบ (smooth) และผิวย่น (rugose) (Tresner *et al*., 1961 ; Dietz and Mathews, 1971) ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุได้หลายชนิด ส่วนด้านล่างโคโลนีซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่ อาหารมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่อาจพบสีอื่นเช่นเดียวกับสีสปอร์ *Streptomyces* spp. สร้างรงควัตถุหลายชนิด นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (Trans-1, 10-dimethyl decalol) มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) *Streptomyces* spp. ใช้ออกซิเจนในการเจริญเป็นพวก chemo-organotrophic เมตาบอลิซึม เป็นแบบ oxidative สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ย่อยอะดีนีน (adenine) เอสคูลิน (esculin) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนธีน (hypoxanthine) แป้ง และไทโรซีน (L-tyrosine) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 30 ˚C pH 6.5-8.0 ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile (35 -37˚C) มีบางชนิดที่เป็นพวก psychrophile (12-15 ˚C) และ thermophile (45-70˚C) เปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบหลักเป็น L-diaminopimelic (LL-DAP) และไกลซีน (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส กลีเซอรอล และเปบโตน เป็นต้น ทนเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บางชนิดทนได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* spp. จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุบางชนิด ได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น (Williams *et al*., 1989; อ้างโดย พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550)

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียที่ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลายเนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่

1. สามารถผลิตเอนไซม์

Streptomyces spp. สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme เช่น cellulase, hemicellulase, chitinase, amylase, xylanase และ glucanase เป็นต้น (Thummabenjapone and Pachinburavan, 2002) เนื่องจากสร้างเอนไซม์ที่จำเพาะทำให้สารโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก จึงเป็นการช่วยสร้างฮิวมัสในดิน พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้พืชมีความแข็งแรง ส่งเสริมความสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อีกรูปแบบหนึ่ง (สมศักดิ์ วังใน, 2528 ; เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, 2545) ตัวอย่างเอนไซม์หลักที่พบ คือ chitinase และ glucanase

ก) เอนไซม์ Chitinase

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินให้เป็นโมโนเมอร์ของไคติน คือ *N*-amine acetylglucose (GlcNAc) ไคตินเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมกันของ N-acetyl D-glucosamine ด้วยพันธะ β-1, 4-glycosidic bond (Felse and Panda, 1999) พบโดยทั่วไปมี 3 รูปแบบ คือ α- chitin, β- chitin และ γ- chitin ไคตินส่วนใหญ่พบในแมลง และในเปลือกแข็งที่หุ้มตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะในพวก Arthropod Mollusca พืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. สามารถสร้าง chitinase ได้ เอนไซม์ chitinase ที่มีอยู่ในพืชจะทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ส่วนในแมลงจะพบเอนไซม์นี้ในกระบวนการลอกคราบหรือการย่อยสลายสารประกอบไคติน การประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี พบครั้งแรกโดย Skujins และคณะ (1965) ซึ่งพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถย่อยสลายเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *Fusarium solani* เอนไซม์ chitinase เป็น multi - complex enzyme ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Shaikh and Deshpande, 1993 ; Tronsmo and Harman, 1993 ; Haran *et al.*, 1995) คือ

1. Endo-chitinase หรือ chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มภายในสายโพลิเมอร์ได้เป็น multimer ของ *N*-acetylglucosamine ซึ่งส่วนมากเป็น diacetylchitobiose และได้ triacetylchitotriose เล็กน้อย

2. Exo-chitinase หรือ *N*-acetylglucosaminidase (chitobiase) จะย่อยจากปลายด้าน non-reducing ของสายไคตินได้เป็น chitobiose หรือ *N*-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์เหมือนพวกเชื้อรา การสร้าง chitinase ของแบคทีเรียพบว่าถูกชักนำด้วยไคติน ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียสร้าง chitinase เพื่อย่อยสลายไคตินแล้วใช้เป็นแหล่งของอาหาร chitinase จากแบคทีเรียหลายชนิดถูกใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อราเช่น chitinase จาก *Serratia marcescens* ใช้ร่วมกับ β-glucanase, propan–2-ol และ polyoxyethylene lauryl ether

ฉีดพ่นในไร่นาข้าวสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* ได้ ในขณะเดียวกัน *S. marcescens* ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าของต้นฝ้ายที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในสภาพเรือนทดลอง (Watanabe *et al.*, 1990)

ข) เอนไซม์ Glucanase (β-1, 3-glucanase)

เอนไซม์ β-1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β-1, 3-glucan พบได้ทั่วไปในพืช และจุลินทรีย์ต่างๆ ในพืชเอนไซม์นี้มีบทบาทในกระบวนการป้องกันตัวเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และมีบทบาทในการลำเลียงสารอาหาร ส่วนที่พบในเชื้อรามีบทบาทในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรืออวัยวะในการเจริญเติบโตและพัฒนาของเชื้อรา และยังมีบทบาทในการดูดซึมธาตุอาหารในการดำรงชีพแบบ แซบโปรไพท์ และปรสิตของเชื้อรา เอนไซม์ β-1, 3-glucanase แบ่งออก เป็น 2 ชนิด (Noronha and Ulhoa, 2000) คือ

1. Exo-β-1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β-1, 3-glucan ได้ monosaccharides หรือ oligosaccharides

2. Endo-β-1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β-1, 3-glucan ได้เฉพาะ monosaccharides เท่านั้นนอกจากนี้มีการนำ *Streptomyces* spp. ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม และทางการแพทย์ เพราะมีความจำเพาะกับสับสเตรท และมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่นๆ เช่น เอนไซม์ glucose isomerase ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายหลายเท่า (Crawford *et al.*, 1982 ; McCarthy, 1987 ; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992) และผลิตเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางการค้า เช่น chitinase, cellulase, amylase, protease (Taguchi *et al*., 1997) และ xylanase เป็นต้น (Wateewuthajam and Pinphanichakarn, 2000)

2. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะเป็นสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งหมายถึงผลผลิตที่ได้จาก เมทาบอลิซึม ของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้ในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้น การสร้างสาร secondary metabolite ที่สำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท คือ สารปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อมีการสร้างขึ้นในช่วงหนึ่งของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักจะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ batch culture โดยการเพาะเลี้ยงในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture (vegetative) ลงในอาหาร ในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัว และมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมี เมทาบอลิซึม และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา

Streptomyces spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β-lactamring) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย โอลีนโดมัยซิน (oleandomycin) เป็นสารพวกแมคโครไลด์ (macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan *et al.*, 1994) ซึ่งจะจับกับไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

สารต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal agent) เช่น แคนดิซิดิน (candicidin) เป็นสารพวกโพลีอีนแมคโครไลด์ (polyene macrolide) ผลิตโดย *S. griseus* (Lechevalier *et al*., 1953) มีฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา สารนัสทาทิน (nystatin) มีโครงสร้างเป็นโพลียีน (polyene) มีสมบัติฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด โพลีออกซิน (polyoxin) มีโครงสร้างเป็นนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา แอนทาไซคลีน (anthracycline) นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อรายังเป็นสารต่อต้านมะเร็งด้วยโดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ในเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้

นอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว *Streptomyces* spp. ยังสร้างสารต่อต้านมะเร็ง (anti-tumour agent) เช่น บลีโอมัยซิน (bleomycin) เป็นสารพวกไกลโคเปบไทด์ (glycopeptide) ผลิตโดย *S. verticillus* (Umezawa *et al.*, 1966) มีผลทำให้สายดีเอ็นเอขาด ลิโมโครซิน (limocrocin)

ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (อนันต์ วงเจริญ, 2547)

Streptomyces spp. สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง (insecticidal agent) ได้แก่ นิกโกมัยซิน (nikkomycin) เป็นสารพวกนิวคลีโอไซด์ ผลิตโดย *S. tendae* (Muller *et al.*, 1981) มีผลต่อการสังเคราะห์ไคติน และสารในกลุ่ม macrolide เช่น avermectin ซึ่งมีผลยับยั้งการลอกคราบของแมลง และยังพบสารฆ่าวัชพืช (herbicidal agent) เช่น ไบอะลาฟอส (bialaphos) เป็นสารพวกเปบไทด์ ผลิตโดย *S. hygroscopicus* มีผลต่อเอนไซม์กลูตามีนซินธีเทส (glutamine synthetase) (Tachibana and Kaneko, 1986) จากการศึกษาของ Rong และ Ming (1995) ค้นพบ *Streptomyces* strain KS3-5 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ Lee และ Hwang (2002) ได้ค้นพบสารปฏิชีวนะที่ต่อต้านเชื้อราก่อโรคพืช โดยศึกษาจากดิน 14 แห่ง ในภาคตะวันตกของประเทศเกาหลี พบว่าดินที่ทำการศึกษามี pH ระหว่าง 5.1 - 6.5 ความชื้น 9.1 - 13.0 เปอร์เซ็นต์ พบแอคติโนมัยซิสทั้งหมด 1,510 ไอโซเลท โดยจะพบ *Streptomyces* spp. มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* spp. และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

สารปฏิชีวนะ	*Streptomyces* sp. ที่ผลิต	เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
Amphotericin B	*S. nodosus*	เชื้อรา
Aureomycin	*S. aureofaciens*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ
Chloramphenicol	*S. venezuelae*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ริกเกตเซีย และไวรัส
Clorobiocin	*S. roseochromogens*	แบคทีเรียแกรมบวก
Coumermycin	*S. rishiriensis*	แบคทีเรียแกรมบวก
Erythromycin	*S. crythreus*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และโปรโตซัว
Kanamycin	*S. kanamyceticus*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และโปรโตซัว
Lincomycin	*S. lincolnensis*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ
Neomycin	*S. fradiae*	แบคทีเรียแกรมลบ
Novobiocin	*S. spheroids*	แบคทีเรียแกรมบวก
Rapamycin	*S. hygroscopicus*	เชื้อรา
Streptomycin	*S. griseus*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ
Tetracycline	*S. rimosus*	แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ
Vancomycin	*S. orientalis*	แบคทีเรียแกรมบวก

ที่มา : ดัดแปลงจาก อนันต์ วงเจริญ (2547)

3. สามารถสร้างสปอร์

เชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสปอร์จึงทำให้มีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้มีชีวิตอยู่ได้นาน และสะดวกต่อการนำไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

4. การแก่งแย่ง (competition)

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ การแข่งขันที่พบมากคือการนำธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่มาใช้ ทำให้เชื้อโรคพืชขาดสารอาหารไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืชได้หรือเจริญได้น้อย ตัวอย่างเช่น Tokala (2002 อ้างถึงใน บรรจบ วันกิ่ง, 2549) พบว่า *Streptomyces lydicus* WYEC108 สามารถเจริญครอบครองบริเวณรากพืชตระกูลถั่วได้ดี โดยเจริญสร้างเส้นใย และสปอร์บริเวณรากพืชทำให้ช่วยลดการเข้าทำลายจากเชื้อ *R. solani* และยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถดึงธาตุเหล็กมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยการสร้างซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม ligands ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง สามารถละลายได้ในน้ำ เป็นแหล่งเก็บสะสมธาตุเหล็กของสิ่งมีชีวิต พบว่าในสภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณน้อยจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างซิเดอร์โรฟอร์มากขึ้น ซิเดอร์โรฟอร์จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Cathecolamides หรือ Cathecolate siderophores (CS) พบได้เฉพาะในแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* ได้แก่ *B. megaterium* และ *B. subtilis* สร้างซิเดอร์โรฟอร์ที่ชื่อ Schizokinen และ DHBglycine ตามลำดับ และ Hydroxamates หรือ Hydroxamate siderophores (HS) พบในสิ่งมีชีวิตที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม Streptomyces จะสร้าง ซิเดอร์โรฟอร์ที่เรียกว่า Ferrioxamine ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ diamines และ carboxylic acid ปัจจุบันพบว่า Ferrioxamine มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Ferrioxamine A1, A2, B, D1, D2, E, G, H และ I (หนึ่ง เตียอำรุง และ นันทกร บุญเกิด, 2539)

การควบคุมโรคพืชโดยเชื้อ *Streptomyces* spp.

El-Abyad และคณะ (1993) พบว่าจากการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* หรือ *S. canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici, Verticillium alboatrum* และ *Alternaria solani* และเมื่อนำเมล็ดของมะเขือเทศเคลือบด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* spp. ก่อนนำไปปลูก สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด สารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* spp. สร้างส่วนใหญ่จะเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (anti – bacterial agent) เช่น โอลีนโดมัยซิน (oleandomycin) เป็นสารพวกแมคโครไลด์ ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan *et al*., 1994) ซึ่งจะไปจับกับไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สาร clavams ผลิตโดย *S. clavuligerus* (Muller *et al*., 1983) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคแทมเมสที่ผลิตโดย *Staphylococcus* และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด สเตรปโตมัยซินผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และนีโอมัยซิน (neomycin) ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman *et al*., 1964) ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งและกลมบางชนิด รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางชนิด และยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย นอกจากนี้ blasticidin S ผลิตโดย *S. griseochromogenes* (Takeuchi *et al*., 1958) ต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคพืชบางชนิด โดยยับยั้งการพัฒนาเส้นใยการสังเคราะห์โปรตีน การงอกของสปอร์และการสร้างสปอร์ของ *P. oryzae* โดยออกฤทธิ์เหมือน organomercuric fungicide แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร kasugamycin ผลิตโดย *S. kasuagensis* และ *S. kasugaspinus* ออกฤทธิ์ต่อต้านยีสต์ แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas* และเชื้อรารวมทั้ง *P. grisea* โดยจะยับยั้งการพัฒนาเส้นใยของ *P. grisea* ในข้าว โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่ไม่ปรากฏว่ายับยั้งการงอกของสปอร์ (Sato, 1983) polyoxin ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและทำให้เซลล์เกิดการบวม (Isono *et al*., 1965) นอกจากนี้ Mahadevan และ Crawford (1997) พบว่า *S. lydicus* WYEC108 สามารถสร้าง chitinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราได้หลายชนิด โดยสารดังกล่าวจะเข้าไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ขณะที่ Tokala และคณะ (2002) พบว่า *S. lydicus* WYEC108 นอกจากสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราได้แล้ว ยังสามารถเพิ่มขยายจำนวนบริเวณรอบรากต้นถั่ว (*Pisum sativum*) ได้ดี และได้มีการนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ในชื่อการค้า Actinovate® (Brain and Deborah, 2002) เช่นเดียวกับ *S. griseoviridi* ที่ได้นำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp. และ *Botrytis* sp. ซึ่งได้นำมาผลิตในชื่อการค้า Mycostop® โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูก และเมื่อปลูก

แล้วเชื้อยังสามารถเจริญได้บริเวณรอบรากพืช ส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มมากขึ้น

Dhanasekaran และคณะ (2005) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรค Damping-off ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Rhizotonia solani* ในเมล็ดมะเขือเทศ โดยทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดิน Cuddalore Tamil Nadu ของประเทศ อินเดีย เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา พบว่ามีเชื้อ 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* โดยเชื้อ *Streptomyces* DPTB113 และ *Streptomyces* DPTB10 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด โดยให้บริเวณใสมีเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง 17.0 และ 16.0 มิลลิเมตร ลำดับ Sadeghi และคณะ (2006) ใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรค damping-off ของ sugar beet โดยใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S2 และ C จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อปฏิปักษ์สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการและพบวงใสในวันที่ 5 หลังจากการทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท C สามารถสร้างสาร siderophore ได้ Prabavathy และคณะ (2006) ใช้ *Streptomyces* spp. ควบคุมโรคใบจุดของข้าว จากเชื้อ *Pyricularia oryzae* และโรคใบไหม้ จากเชื้อ *Rhizoctonia solani* พบว่า *Streptomyces* spp. ไอโซเลท SPM5C-1 ความเข้มข้น 500 μg/ml ฉีดพ่นบนใบข้าว สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคใบจุด และใบไหม้ของข้าวได้ 76.1 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Yaeram และคณะ (2006) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคผลเน่า (fruit blotch) ของแตงโม โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท 13, 15, 22, 33, 74, 78, 84 และ 87 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารต่างกัน 3 ชนิด คือ AGMA, YEME และ GAA เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* พบว่า *Streptomyces* ไอโซเลท 15, 22, 33, 78 และ 87 ที่เลี้ยงในอาหาร AGMA มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ได้มากที่สุด Tan และคณะ (2006) แยกเชื้อเอนโดไฟท์จากมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรค และเป็นโรคเหี่ยวเขียว จากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากต้นที่ไม่เกิดโรคได้มากกว่าต้นที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวเขียว Minuto และคณะ (2006) ใช้ Mycostop® ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces griseoviridis* สายพันธุ์ K61 ในการลดเชื้อสาเหตุโรครากเน่า และโรคเหี่ยว จากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis- lycopersici* และโรคเนื้อไม้เน่า จากเชื้อ *Pyrenochaeta lycopersici* ในดิน และพบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศได้ Ezziyyani และคณะ (2007) ใช้เชื้อ *Streptomyces rochei* ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma*

harzianum ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora capsici* สาเหตุโรครากเน่าของพริก พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในดินได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ Errakhi และคณะ (2007) ใช้ *Streptomyces* spp. ที่แยกจากดินที่ปลูก Moroccan มาควบคุมโรค damping-off ของ sugar beet จากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* พบว่ามี *Streptomyces* spp. 10 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ และมี 4 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการงอกของเม็ดสเคลอโรเทียมได้ Baniasadi และคณะ (2009) ใช้ *Streptomyces* spp. ควบคุมโรคหัวและลำต้นเน่าของต้นทานตะวัน จากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยไอโซเลท 363 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุด อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญของต้นทานตะวันด้วย Wan และคณะ (2008) ทำการศึกษาสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces platensis* F-1 นำมาใช้ในการควบคุมโรคใบไหม้ และต้นกล้าไหม้ของข้าวจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* โรคใบไหม้ของ oilseed rape จากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* และโรคผลเน่าของสตรอเบอร์รี่ จากเชื้อ *Botrytis cinerea* ผลการทดลองพบว่าการรมสารสกัดจาก *Streptomyces platensis* F-1 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ Bressan และ Figueiredo (2008) ใช้ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท DAUFPE11470 และ DAUFPE14632 ในการควบคุมโรค Fusarium ในข้าวโพด จากเชื้อ *Fusarium moniliforme* พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถลดการเข้าทำลายของโรคในเรือนทดลองได้ 55 และ 62.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Prapagdee และคณะ (2008) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosprioides* และ *S. rolfsii* โดยทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินได้ 146 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosprioides* และ *S. rolfsii* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 83.3 และ 8.9 ตามลำดับ

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคพืชต่างๆ ดังสรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การศึกษาการใช้ *Streptomyces* spp. บางชนิดที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืช

***Streptomyces* spp.**	**โรคพืช**	**เชื้อสาเหตุ**	**ที่มา**
S. diastatochromogenes PonSS	potato scab	*Streptomyces scabies*	Neeno *et al.*, 2001
S. exfoliatus	chocolate spot of faba bean	*Botrytis fabae*	Mahmoud *et al.*, 2004
S. griseorubiginosus	Fusarium wilt of banana	*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*	Cao *et al.*, 2005
S. griseoviridis	root rot and wilt diseases of tomato	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopesici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersic*	Minuto *et al.*, 2006
S. hygroscopicus	anthracnose leaf blight stem rot	*Colletotrichum gloeosporioides* *Sclerotium rolfsii*	Prapagdee *et al.*, 2008
S. hygroscopicus 10-22	rice sheath blight seedling blight	*Pellicularia sasakii* *Pe. filamentosa*	Pang *et al.*, 2002
S. lydicus WYEC180	seed and root rot	*Pythium ultimum*	Yuan and Crawford,1995
S. platensis F-1	leaf blight/seedling blight of rice leaf blight of oilseed rape fruit rot of strawberry	*Rhizoctonia solani* *Sclerotinia sclerotiorum* *Botrytis cinerea*	Wan *et al.*, 2008
S. rochei	root rot disease of pepper	*Phytophthora capsici*	Ezziyyani *et al.*, 2007
S. viridodiasticus	basal drop	*Sclerotinia minor*	Tarabily, 2000

ตารางที่ 2 (ต่อ)

***Streptomyces* spp.**	**โรคพืช**	**เชื้อสาเหตุ**	**ที่มา**
Streptomyces sp.	bacterial leaf spot of pepper	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	Jones and Samac,1996
	basal rot of narcissus	*Fusarium oxysporum* f.sp. *narcissi*	Lea, 1995
	fruit blotch disease of watermelon	*Acidovorax avenae* sub sp. *citrulli*	Yaeram *et al.*, 2006
	Fusarium crown rot of tomato	*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis - lycopersici*	Kopperl and Mitchell, 1998
	Fusarium wilt of tomato	*Fusarium oxysporum f*.sp. *lycopersici*	
	Fusarium wilt of banana	*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*	
	Pestalotia disease of rhododendron seedlings	*Pestalotiopsis sydowiana*	Shimizu *et al.*, 2006
	root rot of soybean	*Phytophthora medicaginis* *Ph. sojae*	Xiao *et al.*, 2001
	seedborne diseases of maize	*Fusarium moniliforme*	Bressan and Figueiredo, 2008
	stem rot disease of sunflower	*sclerotinia sclerotiorum*	Baniasadi *et al.*, 2009
	stem rot of chrys anthemum	*Erwinia chrysanthemi*	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

***Streptomyces* spp.**	**โรคพืช**	**เชื้อสาเหตุ**	**ที่มา**
	sugar beet damping-off	*Rhizoctonia solani*	Sadeghi *et al.*, 2006
		Sclerotium rolfsii	Errakhi *et al.*, 2007
	tomato damping-off	*Rhizoctonia solani*	Dhanasekran *et al.*, 2005
Streptomyces sp.93	vegetables damping-off	*Phytophthora* sp.	Jones and Samac, 1996
Streptomyces sp. AMG-P1	blights and rots of plant	*Phytophthora* sp. *Pythium* sp.	Lee *et al.*, 2005
Streptomyces sp. DAUFPE 11470 and DAUFPE 14632	ear rot of maize	*Stenocarpella maydis*	Bressan and Figueiredo, 2005
Streptomyces sp. Di-944	tomato damping – off	*Rhizoctonia solani*	Sabaratnam and Traquair, 2002
	vegetables damping – off	*Rhizoctonia* sp.	
Streptomyces sp. PM5	blast and sheath blight diseases of rice	*Pyricularia oryzae* *Rhizoctonia solani*	Prabavathy *et al.*, 2006
Streptomyces sp. S99	clubroot of crucifers	*Plasmodiophora brassicae*	Cheath *et al.*, 2001

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพสูงในควบคุมโรคทางรากของพริกที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum*

2. เพื่อทราบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกพริกกับเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum*

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ และอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ฟลาสก์ กระบอกตวง แผ่นสไลด์ และ cover slip
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคีบ cork borrer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่นๆ
3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20 100 และ 1000 ไมโครลิตร
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
7. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
8. เครื่องเขย่าผสม (vorter mixture)
9. เครื่องเขย่า
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
11. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
12. ตู้เย็น
13. ไมโครเวฟ
14. กล้องถ่ายรูป
15. วัสดุและอุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ เมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์ Super Hot ตราศรแดง ของบริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด กระบะเพาะกล้า ถุงพลาสติกขนาด 8 x16 เซนติเมตร ป้ายพลาสติก ดินผสมพลาสติกคลุมแปลง ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และ 13-13-21 ปุ๋ยคอก
16. กระดาษกรอง เบอร์ 2
17. paper disc
18. สำลีพันไม้
19. ผงไคติน

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Glucose yeast-extract malt-extract (GYM)

M9 medium agar

Nutrient agar (NA)

Potato dextrose agar (PDA)

Tetrazolium chloride medium (TZC)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

barium chloride

beef extract

carboxin

congo red

dextrose

ethyl alcohol 70 และ 90 %

glucose

KOH 3 %

NaOH

peptone

sodium carboxy methylcellulose

sodium hypochlorite

sulphuric acid

streptomycin sulphate

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และพิสูจน์โรคพริก

1.1 โรคราก และโคนเน่า

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นพริกที่แสดงอาการของโรคราก และโคนเน่าจากแปลงของเกษตรกร ในบริเวณจังหวัดสงขลาระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2551 ศึกษาลักษณะอาการ บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างใส่ในซองกระดาษ และนำตัวอย่างพริกดังกล่าว มาแยกเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อราทำได้โดยแยกจากเม็ด sclerotium ของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง วิธีการ คือ นำเม็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนต้นพริกที่เป็นโรคแช่ใน sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นวางเม็ดสเคลอโรเทียมลงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใย (hypha tip isolation) ย้ายเลี้ยงลงในหลอดอาหารเอียง PDA เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

นำเชื้อราที่แยกได้มาพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคกับต้นพริก วิธีการ คือ ย้ายเชื้อราจากหลอดอาหารเอียงลงเลี้ยงบน PDA ในจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำชิ้นวุ้นไปวางบริเวณโคนต้นพริกอายุ 2 เดือน ใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจดูอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 10 วัน แยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง คัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุดเก็บไว้ทดลองต่อไป

1.2 โรคเหี่ยวเขียว

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นพริกที่มีลักษณะเหี่ยว ในจังหวัดสงขลา ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2551 ศึกษาลักษณะอาการ และทดสอบการสร้างเมือกสีขาว (bacterial ooze) โดยตัดตามขวางบริเวณโคนต้น และนำส่วนตัดไปจุ่มน้ำในหลอดแก้วหากพบเมือกซึ่งไหลลงมาเป็นสายสีขาวขุ่น แสดงว่าเป็นโรคเหี่ยวเกิดจากแบคทีเรีย แยกเก็บตัวอย่างใส่ซองกระดาษ และนำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อแบคทีเรีย กระทำโดยนำต้นพริกล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นขนาด 1 เซนติเมตร แช่ใน sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 - 15 นาที จะได้แบคทีเรียแขวนลอย (bacterial suspension) ใช้ลูปแตะแบคทีเรียแขวนลอยนำไปสตรีค (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tetrazolium chloride medium (TZC) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 1 ˚C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเลือก

เก็บโคโลนีเดียว ๆ ที่มีลักษณะมีโคโลนีสีขาว กลมนูน ตรงกลางสีชมพูอ่อน มีสารเมือกรอบ ๆ โคโลนี ย้ายเลี้ยงลงในหลอดอาหารเอียง NA เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคกับต้นพริก วิธีการ คือ ย้ายเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหารเอียง มาเพิ่มปริมาณเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง ในอาหาร NA เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยจากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง โดยแตะเชื้อจำนวน 2 ลูป ผสมลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Mcfarland Standard เบอร์ 0.5 ด้วยการเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปลูกเชื้อโดยวิธีการแทงพร้อมเชื้อ (pricking) โดยใช้เข็มจุ่มในเอทธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อปล่อยให้เย็น จุ่มลงในแบคทีเรียแขวนลอย นำไปแทงลงบริเวณทางใบ ซึ่งแต่ละต้นจะเริ่มแทงจากใบที่ 3 นับจากยอด จำนวน 2 ใบ ตรวจดูอาการหลังทำการปลูกเชื้อ 4 - 15 วัน แยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุดเก็บไว้ทดสอบต่อไป

2. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินบริเวณรากพริกที่ไม่แสดงอาการของโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวจากแปลงของเกษตรกร ในบริเวณจังหวัด กระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ปัตตานี พัทลุง ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงกันยายน พ.ศ. 2551 สุ่มเก็บดินบริเวณรากพริกต้นละ 10 กรัม นำตัวอย่างดังกล่าวมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี dilution spread plate นำดินที่ผึ่งแห้งจำนวนตัวอย่างละ 5 กรัม ละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่า ที่ 120 rpm ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นดินแขวนลอยสต็อก (10^{-1}) ทำการเจือจาง (serial dilution) โดยแบ่งดินแขวนลอยที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้เป็นดินแขวนลอย 10^{-2} ทำซ้ำเช่นนี้ต่อไปจะได้ดินแขวนลอย 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ดูดดินแขวนลอยที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดบนอาหาร Glucose Yeast-extract Malt-extract (GYM) เกลี่ยดินแขวนลอยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้สภาพปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 - 14 วัน ทำการเก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน และมีลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อ คือ เซลล์คล้ายเส้นใยเชื้อ แต่มีการเจริญเติบโตช้า เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เส้นใยมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา ซึ่งมีขนาด

ของโคโลนีกว้าง 0.2 - 1.0 ไมโครเมตร จึงย้ายเลี้ยงลงในหลอดอาหารเอียง GYM เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ให้รหัสเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลทโดยอักษรตัวแรกมาจากจังหวัดที่เก็บ ตัวที่ 2 อำเภอที่เก็บตัวอย่าง อักษรตัวที่ 3 เป็นแหล่งที่มาของดิน แล้วตามด้วยลำดับที่ของไอโซเลท เช่น *Streptomyces* spp. RM-1-138 หมายถึง เชื้อที่แยกได้จาก จังหวัดระนอง เก็บ ที่อำเภอเมือง เป็นดินปลูกพริก และเป็นไอโซเลทที่ 138 ที่แยกได้

3. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

3.1 การเตรียมเชื้อ *S. rolfsii*

เตรียมเส้นใยเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริกซึ่งมีสาเหตุมาจาก *S. rolfsii* โดยนำเส้นใยที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงบนอาหาร GYM บ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ซึ่งแยกได้จากข้อ 2 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.3 การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii*

ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริกด้วยวิธี dual culture plate โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* นำไปวางที่บนอาหาร GYM เตรียมได้ในข้อ 3.2 ห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร และวางเลี้ยงเชื้อเฉพาะ *S. rolfsii* เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อ *S. rolfsii* ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (สิทธิศักดิ์ แสไพศาส และสมบัติ ศรีชูวงศ์, 2546) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

4. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของโรคเหี่ยวเขียว

4.1 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum*

นำเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้จาก ข้อ 1.2 มาสตรีคบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงลงในอาหาร nutrient broth (NB) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมสารละลาย 0.85% NaCl นึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Mcfarland Standard เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันไม้นึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มแบคทีเรียแขวนลอยให้เปียกชุ่ม นำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้ และใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะวุ้นอาหารที่ทาด้วยเชื้อ *R. solanacearum* ทำการเจาะ 3 หลุมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน ไว้ใช้ในการทดสอบ

4.2 การเตรียม *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนที่เป็นเส้นใยออกจากส่วนน้ำ จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้ เก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

4.3 การทดสอบ

ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี agar well diffusion (El-Naggar *et al*., 2006) โดยดูดน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 หยดลงในหลุมอาหาร NA ที่ทาไว้ด้วยเชื้อ *R. solanacearum* ชุดควบคุมหยดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะวงใสที่เกิดขึ้น วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงหาค่าเฉลี่ย

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิด คือ ไอโซเลท SS-2-243, RL-1-178 และ RM-1-138 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

5.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำ slide culture โดยสตรีคแบคทีเรีย *Streptomyces* ให้เต็มบนจานอาหาร GYM แล้วนำ sterile cover glass ปักบนอาหาร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่าง ขนาดของเซลล์ และการผลิตสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

5.1.2.1 การติดสีแกรม

การทดสอบการติดสีแกรม โดยทำตั้งแต่ระยะการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น วิธีการ คือ นำเชื้อแต่ละไอโซเลทมาเกลี่ยเป็นผิวบาง (smear) บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2 - 3 ครั้ง หยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear ที่ป้ายไว้นาน 1 นาที จากนั้นล้างน้ำ และเทน้ำออกให้หมด หยดสารละลาย Gram's iodine ทิ้งไว้ 1 - 2 นาที ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด จากนั้นล้างสีด้วยเอทิลแอลกอออล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 15 - 20 วินาที ล้างน้ำสะอาด แล้วจึงหยด safranin บนรอย smear ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำ และซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า ถ้าเชื้อแบคทีเรียเป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet และแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin

5.1.2.2 การทดสอบการย่อยเคซีน (casein test)

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. เลี้ยงบนอาหาร casein agar แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยสลายเคซีนทุก 2 - 3 วัน โดยดูจากวงใสรอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี

5.1.2.3 การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test)

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. เลี้ยงในอาหาร gelatin media ในลักษณะ stab แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยเจลาตินทุกสัปดาห์ โดยนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ถ้าแข็งตัวแสดงว่า

เจลาตินยังไม่ถูกย่อย ให้นำอาหารนั้นไปบ่มต่อ และทดสอบซ้ำในสัปดาห์ต่อไป ถ้าเจลาตินอยู่ในสภาพเหลวหลังจากนำเข้าตู้เย็นแสดงผลเป็นบวก

5.1.2.4 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร GYM บ่มที่อุณหภูมิ 27 - 30 องศาเซลเซียส นาน 5 - 7 วัน จากนั้นใช้ลูปแตะสปอร์สตรีคบนผิวหน้าอาหาร basal medium agar ซึ่งเติมคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้แก่ L-arabinose, cellobiose, dextran, D-fructose, D-galactose, *meso*-inositol, D-lactose, mannitol, D-mannose, raffinose, sucrose, และ D-xylose ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยใช้ D-glucose เป็น positive control และอาหาร basal medium agar ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็น negative control ถ้าการเจริญของเชื้อมากกว่า negative control ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control ให้ผลเป็นลบ และถ้าเชื้อเจริญมากกว่า negative control เล็กน้อยให้ผลการทดลองเป็นบวก/ลบ

5.1.2.5 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ ความร้อน และความเป็นกรด – ด่าง

การทนเกลือ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร GYM agar ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 2, 4, 7 และ10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการเจริญ

ความร้อน

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร GYM agar บ่มที่อุณหภูมิ 10 15 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บันทึกผลการเจริญ

ความเป็นกรด – ด่าง

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร GYM agar ที่ปรับ pH 4, 6, 8 และ 10 แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเจริญ

5.1.2.6 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β-1, 3 glucanase

5.1.2.6.1 การเตรียม *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวดีที่สุด 3 ไอโซเลท สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายยกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด

250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป

5.1.2.6.2 การทดสอบ

ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร M9 medium agar ผสม 0.05% Lichenan เป็น medium โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำน้ำกรองจากเชื้อ (culture filtrate) *Streptomyces* spp. แต่ละโซเลท หยดลงในหลุมจำนวน 20 ไมโครลิตรต่อหลุม แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 - 5 วัน ตรวจผลโดยการราด 0.1% Congo red ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 5 นาที ถ้ามีวงใสรอบๆ หลุมวุ้นที่หยดน้ำกรองจากเชื้อ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase ได้ให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีแดงทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ให้ผลเป็นลบทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

5.1.2.7 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ chitinase

5.1.2.7.1 การเตรียม *Streptomyces* spp.

ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1.2.6.1

5.1.2.7.2 การทดสอบ

ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ M9 medium agar ผสม 2.4% colloidal chitin medium ในการทดสอบ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละโซเลท หยดลงในหลุม จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อหลุม แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยการราด 0.1% Congo red ให้ท่วมอาหารถ้ามีวงใสรอบหลุมวุ้นที่หยดน้ำกรองจากเชื้อ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin ได้ ให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีแดงทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ให้ผลเป็นลบ ทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

5.2 การส่งจำแนกเพื่อยืนยันเชื้อ *Streptomyces* spp.

ทำการส่งเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวไปจำแนกชนิดที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ซึ่งจำแนกเชื้อโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis

6. การศึกษาศักยภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens, S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

6.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii*

6.1.1 การเตรียมเชื้อ *S. rolfsii*

เตรียมเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคราก และโคนเน่าของพริกซึ่งมีสาเหตุมาจาก *S. rolfsii* โดยนำเส้นใยที่แยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร GYM บ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

6.1.2 การเตรียม *Streptomyces* spp. ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป

6.1.3 การทดสอบ

เตรียมอาหาร GYM หลอมเหลวให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติ (double strength) ผสมกับน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละโซเลท ที่เตรียมได้จากข้อ 6.1.2 ด้วยอัตราส่วนผสม 1 : 1 เทใส่จานอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเชื้อรา *S. rolfsii* ที่เตรียมได้จากข้อ 6.1.1 วางลงตรงกลางจานอาหารที่ผสมด้วยน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนน้ำกรองจากเชื้อ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีราชุดทดสอบ และชุดควบคุม โดยวัด 2 แนวตั้งฉากกัน นำค่าเฉลี่ยมาหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากสูตร (Gamliel *et al*., 1989)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $100 - \{ (R^2/r^2) \times 100 \}$

R คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารทดสอบ

r คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารควบคุม

6.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

6.2.1 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum*

ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1

6.2.2 การเตรียม *Streptomyces* spp.

เช่นเดียวกับข้อ 6.1.2

6.2.3 การทดสอบ

ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยดูดน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ของแต่ละไอโซเลท หยดในหลุมอาหาร NA ที่ทาไว้ด้วยเชื้อ *R. solanacearum* โดยชุดควบคุมจะหยดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะวงใสที่เกิดขึ้น วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงหาค่าเฉลี่ย

7. ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุม *S. rolfsii* และ *R. solanacearum*

7.1 การเตรียมน้ำเชื้อ

นำเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 และ *S. mycarofaciens* สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งน้ำออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 2 นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป ได้เป็นน้ำกรองจากเชื้อ และน้ำกรองจากเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

7.2 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเส้นใยรา *S. rolfsii*

เตรียมอาหาร GYM หลอมเหลวให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติ ผสมกับน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เตรียมได้โดยการกรอง และโดยการนึ่งของแต่ละไอโซเลททั้ง 2 ส่วน ผสมด้วยอัตราส่วน 1 : 1 เทใส่จานอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร

รอให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเชื้อรา *S. solfsii* วางลงตรงกลางจานอาหารที่ผสมด้วยน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนน้ำกรองจากเชื้อ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีราชุดทดสอบ และชุดควบคุม โดยวัด 2 แนวตั้งฉากกัน นำค่าเฉลี่ยมาหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสูตร เช่นเดียวกับข้อ 6.1.3 และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

7.3 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum*

ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยดูดน้ำกรองจากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เตรียมได้จากการกรอง และการนึ่ง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ของแต่ไอโซเลทหยดลงบนอาหาร NA ที่ทาไว้ด้วยเชื้อ *R. solanacearum* โดยชุดควบคุมหยดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะวงใสที่เกิดขึ้น วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

8. ศึกษาผลของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ต่อการงอกของเมล็ดพริก

8.1 การเตรียมเมล็ด

เมล็ดพริกที่ใช้ในการศึกษาคือ เมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์ Super Hot ตราศรแดง ของบริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด โดยแช่เมล็ดพริกในน้ำปราศจากเชื้อข้ามคืน หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด ด้วย 10% sodium hypochloride (v/v) นาน 2 นาที และล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้ออีกครั้ง

8.2 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ศึกษาทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านการทดสอบว่ามีความสามารถยับยั้งโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp. ทำได้โดยสตรีคเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท บนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman

เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนที่เป็นเส้นใยออกจากส่วนน้ำ จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี spore แขวนลอย เก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

8.3 การเตรียมเชื้อ *T. harzianum*

เชื้อ *T. harzianum* ที่นำมาทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (checked) เนื่องจากการเชื้อดังกล่าวได้มีการทดสอบ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช และควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ การเตรียมเชื้อทำได้โดยเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* บนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 7 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงใน ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB อยู่ 100 มิลลิลิตรเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปรับความเข้มข้นสปอร์แขวนลอย ที่ระดับ 1×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร เก็บไว้ทดสอบต่อไป

8.4 การทดสอบ

นำเมล็ดพันธุ์พริกที่เตรียมไว้คลุกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลทที่เตรียมได้จากข้อ 8.2 และสปอร์แขวนลอย *T. harzianum* ที่เตรียมได้จากข้อ 8.3 ไอโซเลทละ 1 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด หลังจากคลุกเมล็ดแล้ว ผึ่งเมล็ดข้ามคืนในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเพาะลงในกล่องชื้น เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลโดยหาเปอร์เซ็นต์ความงอก วัดความยาวของต้น ราก และหาน้ำหนักสด

กรรมวิธีที่ 1น้ำกลั่น (control)
กรรมวิธีที่ 2 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*
กรรมวิธีที่ 3 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1
กรรมวิธีที่ 4 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2
กรรมวิธีที่ 5 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *T. harzianum*

9. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่1 ในการควบคุมโรคในเรือนทดลอง

9.1 การควบคุมโรคราก และโคนเน่า

9.1.1 การเตรียมเมล็ด

ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.1

9.1.2 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

การเตรียมเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.2

9.1.3 การเตรียมเชื้อ *T. harzianum*

ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.3

9.1.4 การเตรียมเชื้อ *S. rolfsii*

เตรียมข้าวฟ่างสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *S. rolfsii* โดยนำข้าวฟ่างแช่น้ำค้างคืนผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แบ่งชั่งใส่ฟลาสก์ๆ ละ 100 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง นำเชื้อราที่มีอายุ 3 วัน ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เจาะเส้นวุ้นบริเวณขอบเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เขี่ยใส่ฟลาสก์ๆ ละ 1 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำไปผึ่งจนแห้งสนิท บดเป็นผงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

9.1.5 การเตรียมดินประกอบด้วย ดิน 2 ส่วน แกลบ 1 ส่วน ปุ๋ยคอก 1/2 ส่วน ขุยมะพร้าว 1/2 ส่วน จากนั้นนำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง นำ เก็บไว้ทดสอบต่อไป

9.1.6 การทดสอบ

นำเมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์ Super Hot ที่เตรียมไว้คลุกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลทที่เตรียมได้จากข้อ 9.1.2 และสปอร์แขวนลอย *T. harzianum* ที่เตรียมได้จากข้อ 9.1.2 ไอโซเลทละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 400 เมล็ด/ กรรมวิธี ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากคลุกเมล็ดแล้วผึ่งเมล็ดข้ามคืนในสภาพอุณหภูมิห้อง นำไปปลูกลงในตะกร้าที่ผสมดินกับผงเชื้อ *S. rolfsii* ในอัตราส่วน 5 กรัม ต่อดิน 1 กิโลกรัม ทำการให้น้ำ และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ประเมินการงอกของเมล็ด 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังปลูกโดยการนับจำนวนต้นที่งอก และอยู่รอด วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด

กรรมวิธีที่ 1น้ำกลั่น (control)

กรรมวิธีที่ 2 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*

กรรมวิธีที่ 3 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *T. harzianum*

กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดพริกคลุกด้วยสารคาร์บอกซิน 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 500 mgL^{-1})

9.2 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียว

9.2.1 การเตรียมเมล็ด

ทำเช่นเดียวกับข้อ 9.1

9.2.2 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

ทำเช่นเดียวกับข้อ 9.1.2

9.2.3 การเตรียมเชื้อ *T. harzianum*

ทำเช่นเดียวกับข้อ 9.3

9.2.4 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum*

นำเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้จากข้อ 1.2 มาสตรีคบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ลงในอาหาร NB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Mcfarland Standard เบอร์ 0.5 เก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

9.2.5 การทดสอบ

นำเมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์ Super Hot ที่เตรียมไว้คลุกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลทที่เตรียมได้จากข้อ 9.1.2 และสปอร์แขวนลอย *T. harzianum* ที่เตรียมได้จากข้อ 9.1.2 ไอโซเลทละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 400 เมล็ด/ กรรมวิธี ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากคลุกเมล็ดแล้วผึ่งเมล็ดข้ามคืนในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเพาะในกระบะเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุได้ 20 วัน ทำการใช้มีดฆ่าเชื้อกรีดลงบนดินปลูกพริกห่างจากโคนต้น 2 เซนติเมตร ลึก 5 – 10 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดบาดแผล ราดเชื้อ *R. solanacearum* 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อดิน 1 ตะกร้า ทำการให้น้ำ และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ประเมินโดยการนับจำนวนต้นพริกที่อยู่รอด หลังปลูกเชื้อ *R. solanacearum* 7, 14, 21 และ 28 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด

กรรมวิธีที่ 1น้ำกลั่น (control)
กรรมวิธีที่ 2 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*
กรรมวิธีที่ 3 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1
กรรมวิธีที่ 4 คลุกน้ำเลี้ยงเชื้อ *T. harzianum*
กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดพริกคลุกด้วยสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1,000 mgL^{-1})

10. การทดสอบความเข้ากันได้ ของเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. mycarofaciens*

10.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. mycarofaciens* สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการแตะเชื้อ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนของเชื้อออกเพื่อนำมาทำเป็น cell suspensions เพื่อไว้ทดลองต่อไป

10.2 การเตรียม cell suspensions ของ *Streptomyces* ทั้ง 2 ชนิด

นำ cell suspensions ของเชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 2 ชนิด จากข้อ 10.1 มาปรับระดับความเข้มข้นให้มีระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยนำแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อปรับปริมาณโดยใช้ค่าดูดซับแสง OD_{600nm} เท่ากับ 70 (Harris and Adkins, 1999 ; Xiao *et al.*, 2001) เก็บไว้ทดสอบต่อ

10.3 วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. mycarofaciens* ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยใช้สำลีพันไม้นึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มสารแขวนลอย *S. philanthi* หรือ *S. mycarofaciens* ให้เปียกชุ่ม นำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร GYMA อย่างสม่ำเสมอ และทำการวาง disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บนผิวหน้าอาหาร GYMA จำนวน 4 ชิ้นต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ หยด *S. mycarofaciens* หรือ *S. philanthi* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ในจานเลี้ยงเชื้อตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ประกอบด้วย 2 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ชิ้น สังเกตการเกิด หรือไม่เกิดวงใสระหว่างเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท

กรรมวิธีที่ 1 ทา *S. philanthi* + หยด *S. mycarofaciens*

กรรมวิธีที่ 2 ทา *S. mycarofaciens* + หยด *S. philanthi*

11. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ

11.1 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

การเตรียมเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.2

11.2 การเตรียมเชื้อ *T. harzianum*

ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.3

11.3 การเตรียมพืช

เตรียมต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน โดยนำเมล็ดพริกที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 (v/v) เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แช่เมล็ดพริกในน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 + *S. mycarofaciens* และ *T. harzianum* และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งให้เป็นชุดควบคุมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพาะเมล็ดพริกลงดินที่ปราศจากเชื้อ

11.4 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

11.4.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคราก และโคนเน่า

ทำเช่นเดียวกับข้อ 9.1.3

11.4.2 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเขียว

ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1

11.5 การเตรียมดิน

ประกอบด้วย ดิน 2 ส่วน แกลบ 1 ส่วน ปุ๋ยคอก 1/2 ส่วน ขุยมะพร้าว 1/2 ส่วน จากนั้นนำไปบรรจุลงในถุงดำขนาด 8 x 16 นิ้ว ถุงละ 3 กิโลกรัม

11.6 การทดสอบ

ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่1 และ *T. harzianum* ในการควบคุมโรครา และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวของพริก นำต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน ที่เตรียมได้จากข้อ 11.3 ปลูกลงในดินที่เตรียมได้จากข้อ 11.5 โดยปลูกถุงละ 1 ต้น หลังจากนั้นนำถุงไปวางในสภาพแปลงทดลองโดยให้ระยะห่างระหว่างแถวและระหว่างต้น 80 x 80 เซนติเมตร เช่นเดียวกับการปลูกพริกทั่วไป (สาวิตร แสงจันทร์, 2547) จำนวนทั้งสิ้น 480 ต้น หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกหัวเชื้อ *S. rolfsii* ลงในดินโดยใช้หัวเชื้อ *S. rolfsii* 5 กรัมต่อถุง และทำการใช้มีดฆ่าเชื้อกรีดลงบนดินปลูกพริกขี้หนูโดยห่างจากบริเวณโคนต้นพริก 5 เซนติเมตร ลึก 5 - 10 เซนติเมตร เพื่อให้รากพริกบางส่วนเกิดบาดแผล ราดเชื้อ *R. solanacearum* 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อถุงพลาสติก จากนั้นทำการราดดินบริเวณโคนต้นพริกด้วยเชื้อ *S. mycarofaciens* , *S. philanthi* ไอโซเลทที่1, *S. mycarofaciens* + *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1, *T. harzianum* สารคาร์บอกซิน + สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต หรือน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น ทุก 7 วัน ติดต่อกัน ทำการให้น้ำ และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ (นิรนาม, 2550) ทำการตรวจผลโดยการนับจำนวนต้นที่เหี่ยวทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต โดยทำการทดลองเป็นเวลา 3 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 ราดดินด้วยน้ำกลั่น (control)
กรรมวิธีที่ 2 ราดดินด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*
กรรมวิธีที่ 3 ราดดินด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่1
กรรมวิธีที่ 4 ราดดินด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens* + *S. philanthi* ไอโซเลทที่1
กรรมวิธีที่ 5 ราดดินด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *T. harzianum*
กรรมวิธีที่ 6 ราดดินด้วยสารคาร์บอกซิน 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น500 mgL^{-1}) + สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น1,000 mgL^{-1})

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์การทดลอง

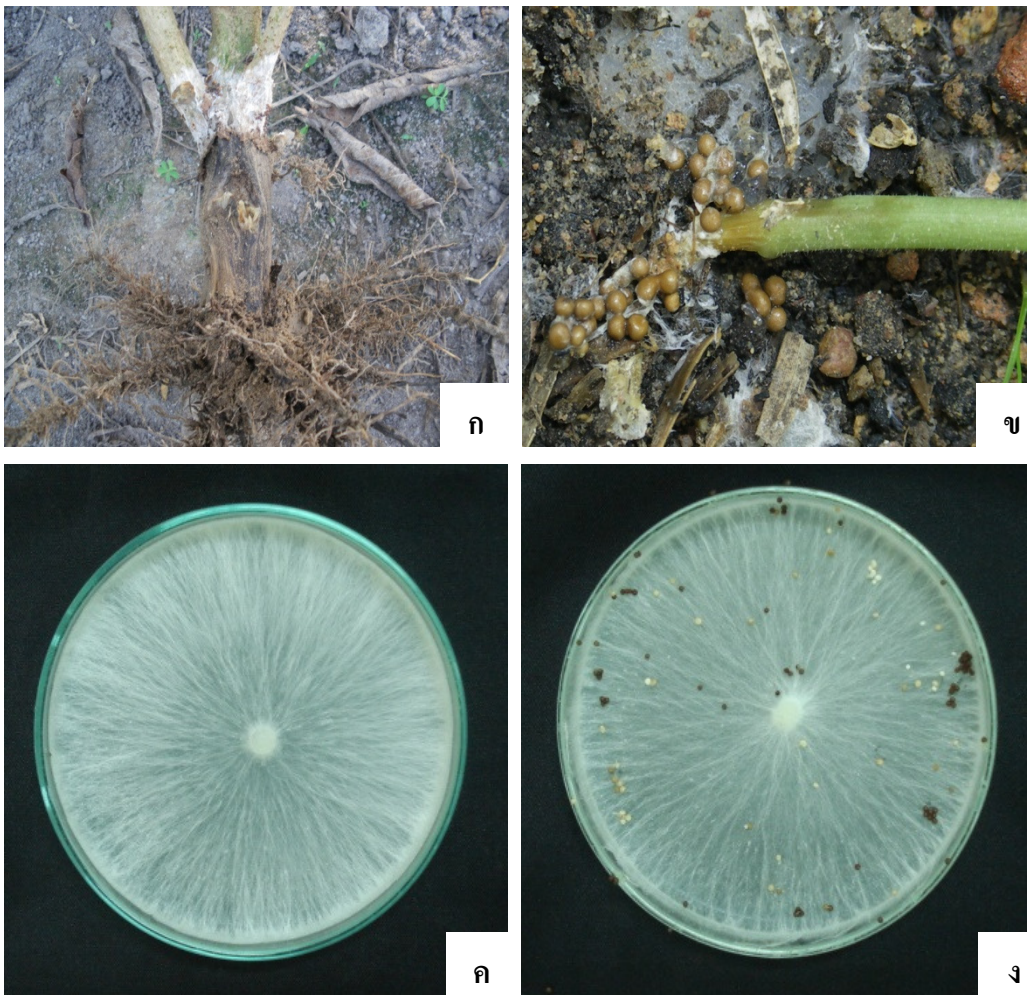
1. เก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการพิสูจน์โรค

1.1 โรครากและโคนเน่าของพริก

เก็บตัวอย่างโรคราก และโคนเน่าของพริกจากอำเภอต่าง ๆ ของจังหวัด สงขลา ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง ลักษณะอาการของโรคที่พบบนต้นพริก ทั้ง 6 ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ บริเวณโคนต้นพริกแตก แผลยุบตัวลง เนื้อเยื่อใต้เปลือกมีสีน้ำตาลดำ มีเส้นใยราสีขาวปกคลุมโคนต้น พบเม็ดสเคลอโรเทียม (sclerotium) เกาะอยู่ตามโคนและราก (ภาพที่ 1) ใบเหลือง ร่วง และพืชยืนต้นตาย

เมื่อทำการแยกเชื้อ สามารถแยกเชื้อได้ 15 ไอโซเลท เชื้อสาเหตุที่แยกได้ทุกไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหยาบแตกแขนงเป็นมุมแหลม มีผนังกั้น และแคล๊มคอนเนคชั่น (clamp connection) โคโลนีเจริญเต็มหน้าผิวอาหารภายใน 4 วัน และเริ่มสร้างเม็ดสเคลอโรเทียม เจริญเต็มหน้าผิวอาหารภายใน 10 วัน ไม่พบสปอร์ชนิดอื่น ลักษณะดังกล่าว ตรงกับเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (Punja,1985)

จากการพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคต่อพริก พบว่าเชื้อ *S. rolfsii* ทุกไอโซเลท สามารถก่อโรคกับพริกโดยหลังจากการปลูกเชื้อ 3 วัน โดยเปลือกยุบตัวลง มีเส้นใยรา สีขาวปกคลุม ในวันที่ 12 หลังทำการปลูกเชื้อ โคนต้นพริกจะหักพับตาย เน่าเปื่อย เป็นสีน้ำตาลดำ เชื้อสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมสีน้ำตาลกลม เกาะบริเวณโคนต้นพริก เมื่อทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งโดยการนำเม็ดสเคลอโรเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อ และได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *S. rolfsii* ไอโซเลท S 12 ซึ่งก่อโรครุนแรงไว้เป็นตัวแทนสำหรับศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1 อาการโรคที่พบในธรรมชาติ จากการปลูกเชื้อ และเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า

ก. พริกที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่าในแปลงเกษตรกร บริเวณโคนต้นมีเส้นใยสีขาว และเม็ดสเคลอโรเทียมของราขึ้นปกคลุม

ข. ต้นพริกขี้หนูอายุ 2 เดือนแสดงอาการโรคโคนและรากเน่าหลังจากการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท S12 เป็นเวลา 4 วัน

ค. โคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โซเลท S12 บน PDA อายุ 4 วัน

ง. โคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท S12 บน PDA อายุ 10 วัน สังเกตเห็นเม็ดสเคลอโรเทียม จำนวนมากบนโคโลนี

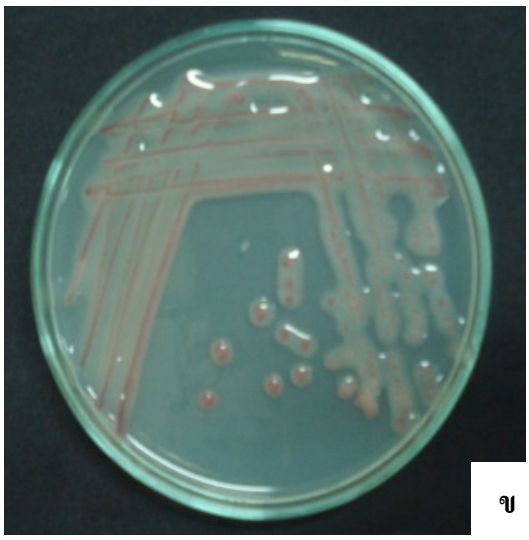
1.2 โรคเหี่ยวเขียว

จากการศึกษาโรคเหี่ยวของพริกในแปลงเกษตรกร พบว่าอาการเหี่ยวมีสาเหตุจากเชื้อหลายชนิด เช่น เป็นโรครากและโคนเน่าจากเชื้อ *S. rolfsii* และการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) มีเพียง 2 ตัวอย่างที่พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวจากแบคทีเรีย คือ เหี่ยวที่ยอดทั้งใบบนและใบล่าง บางต้นมีอาการใบเหลืองหม่น ไม่เหี่ยว และมีรากพิเศษ (adventitious root) เมื่อนำส่วนโคนต้นมาตัดดูตามขวาง พบวงแหวนสีน้ำตาล บริเวณท่อน้ำท่ออาหาร และพบ bacterial ooze หลังจากนำต้นจุ่มในน้ำ 2 - 3 นาที

เมื่อทำการแยกเชื้อ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 22 ไอโซเลท เชื้อสาเหตุที่แยกได้ทุกไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีสีขาว กลมนูน ตรงกลางสีชมพูอ่อน มีสารเมือกรอบ ๆ โคโลนี เมื่อทำการศึกษาลักษณะสีของโคโลนี การย้อมแกรม และการทดสอบเคมี ตามที่รายงานไว้โดย Kelman (1954) ลักษณะดังกล่าว ตรงกับเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

จากการพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคต่อพริก พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* ทุกไอโซเลท สามารถก่อโรคกับพริกโดยพบว่าหลังจากการปลูกเชื้อ 6 วัน ต้นพริกจะเริ่มแสดงอาการเหี่ยวโดยเริ่มเหี่ยวจากบริเวณปลายยอด และบางส่วนของพืช หลังจากนั้นอีก 2 - 3 วัน อาการเหี่ยวจะเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วและพริกยืนต้นตายในที่สุด (ภาพที่ 2) เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสารเมือกไปทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหารของพืชเมื่อทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อแบคทีเรียที่นำมาปลูกเชื้อ และได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท R7 ซึ่งก่อโรครุนแรงไว้เป็นตัวแทนสำหรับศึกษาต่อไป

ก



ข

ค

ภาพที่ 2 อาการโรคเหี่ยวเขียวที่พบในธรรมชาติ เชื้อสาเหตุ และการปลูกเชื้อ

ก. ต้นพริกชี้ฟ้าแสดงอาการเหี่ยวเนื่องจากถูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* เข้าทำลายในธรรมชาติ

ข. โคโลนีของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท R7 หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TZC เป็นเวลา 3 วัน

ค. ต้นพริกขี้หนูอายุ 2 เดือนแสดงอาการโรคเหี่ยวเขียวหลังจากการปลูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท R7 เป็นเวลา 6 วัน

2. การเก็บดิน และการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

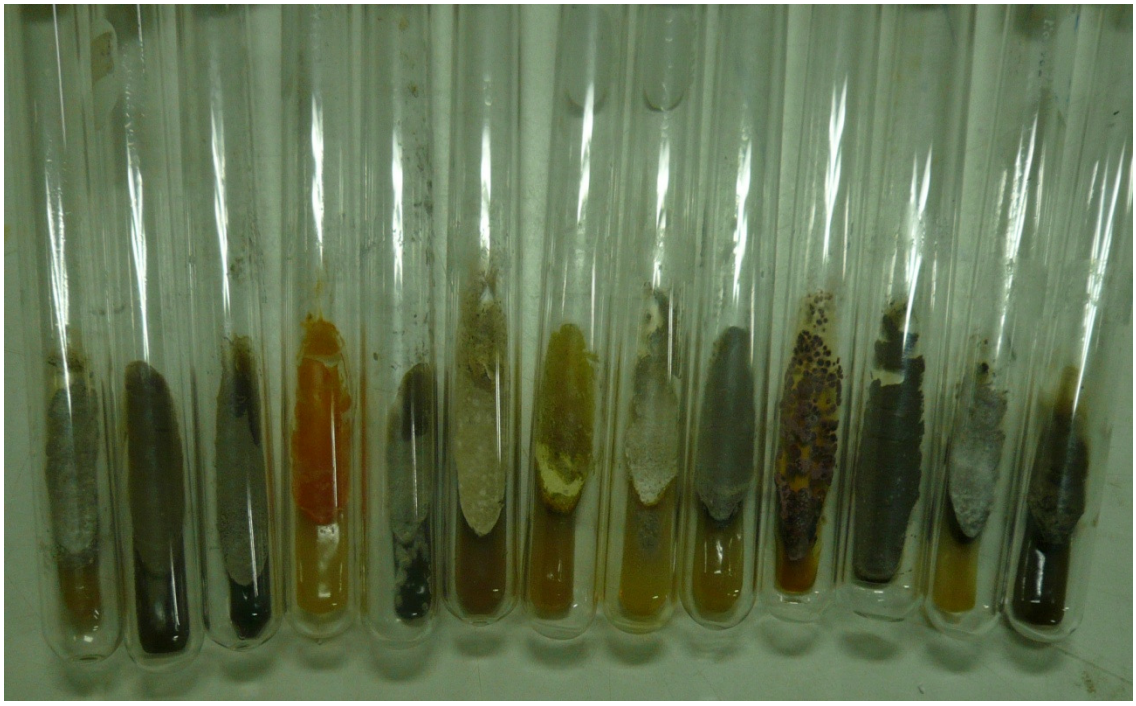
สามารถเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพริกที่ไม่แสดงอาการโรค เพื่อนำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว จากแปลงปลูกพริกขี้หนู และพริกชี้ฟ้าของเกษตรกร ในพื้นที่จังหวัด กระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ปัตตานี พัทลุง ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี ซึ่งมีลักษณะพื้นที่แตกต่างกัน ได้จำนวน 16 ตัวอย่าง

เมื่อนำดินตัวอย่างมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร GYM สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ประมาณ 9 - 16 ไอโซเลท ต่อดิน 1 ตัวอย่าง รวมแยกได้ 178 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในระยะแรกผิวหน้าโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี เช่น สีขาว เทา น้ำตาล ส้ม เหลือง ชมพู และดำ (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้แต่ละสภาพแปลงปลูกสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทุกแหล่งและมีความหลากหลาย เนื่องจากเชื้อ *Streptomyces* spp. มักพบทั่วไปในธรรมชาติ ทุกสภาพแวดล้อม เพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันยังทำให้จำนวนและชนิดของ *Streptomyces* spp. มีความหลากหลาย

นอกจากนั้นยังได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *Streptomyces* spp. จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 87 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกยางพารา จำนวน 7 ตัวอย่าง ในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคใต้ (ตารางที่ 3) เชื้อดังกล่าวได้รับการทดสอบในเบื้องต้นว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้

ในการคัดเลือกแหล่งของดินเพื่อมาแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าดินที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีทางดินน้อยหน้าดินมีการทับถมมีเศษซากพืชมากอาหาร และแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ก็มีมาก (เกษม สร้อยทอง, 2532) จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการนำมาใช้สำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ การทดลองนี้จะทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าดินสวนพริกเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิด เช่น Kochutresiamma และคณะ (1988) รายงานว่าการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากดินจากแหล่งต่าง ๆ ประเทศอินเดีย พบจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา และแอคติโนมัยซีส นอกจากนั้น Hebbar และคณะ (1991) รายงานว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพหลายตัว ที่เป็นแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากใบ ราก และส่วนต่าง ๆ ของพืช เชื้อที่แยกได้จากใบพืชส่วนใหญ่คือแอคติโนมัยซีส ดังนั้นเพื่อให้มีโอกาสได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากขึ้น จึงควรแยกเชื้อปฏิปักษ์จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดินรอบราก (rhizosphere) ผิวราก

(rhizoplane) ลำต้น และใบของพริก ในแหล่งปลูกพริกต่างๆ ทั่วภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อจะได้มีโอกาสได้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* และเชื้อ *R. solanacearum*มากยิ่งขึ้นแม้ว่าจะพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ แต่พบว่าปริมาณเชื้อในไอโซเลทที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชมีน้อย จึงจำเป็นที่จะต้องนำเชื้อมาเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชต่อไป



ภาพที่ 3 ลักษณะ สี และโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร GYM ที่คัดแยกได้จากดินปลูกพริก

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างดิน และเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากแปลงปลูกพริก และสวนยางพาราที่เก็บในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคใต้

สถานที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างดิน		*Streptomyces* spp.	รหัสไอโซเลท
	ปลูกพริก	ปลูกยางพารา	(จำนวน ไอโซเลท)	
จ. กระบี่				
อ. คลองท่อม	1	0	9	KK-2-1 ถึง 9
จ. ชุมพร				
อ. เมือง	2	0	22	CM-1-10 ถึง 31
อ. สวี	1	0	16	CS-1- 32 ถึง 47
จ. ตรัง				
อ. ย่านตาขาว	0	1	10	TY-2-48 ถึง 57
อ. วังวิเศษ	0	1	13	TV-2-58 ถึง 70
จ. นครศรีธรรมราช				
อ. ชะอวด	0	1	12	NC-2-71 ถึง 82
อ.ร่อนพิบูลย์	0	1	9	NR-2-83 ถึง 91
จ. ปัตตานี				
อ. โคกโพธิ์	1	0	9	PK-1-92 ถึง 100
จ. พัทลุง				
อ. ป่าบอน	2	0	28	PtP-1-101 ถึง 128
จ. ระนอง				
อ. เมือง	3	0	37	RM-1-129 ถึง 165
อ. ละอุ่น	3	0	32	RL-1-167 ถึง 197

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สถานที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างดิน		*Streptomyces* spp.	รหัสไอโซเลท
	ปลูกพริก	ปลูกยางพารา	(ไอโซเลท)	
จ. สงขลา				
อ. ควนเนียง	0	1	12	SK-2-198 ถึง 209
อ. คลองหอยโข่ง	1	0	13	SK-1-210 ถึง 222
อ. บางกล่ำ	0	1	7	SB-2-223 ถึง 229
อ. หาดใหญ่	1	0	12	SH-1-230 ถึง 241
อ. สะเดา	0	1	10	SS-2-242 ถึง 251
จ. สุราษฎร์ธานี				
อ. ท่าชะนะ	1	0	14	SuT-1-252 ถึง 265
รวม	**16**	**7**	**265**	

3. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

จากการนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินแปลงปลูกพริกจำนวน 178 ไอโซเลท และแยกจากตัวอย่างดินแปลงปลูกยางพาราจำนวน 87 ไอโซเลท มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยวิธี dual culture plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM โดยทำการขีดเชื้อ *Streptomyces* spp. ไว้เป็นเวลา 7 วัน และทำการลงเชื้อเส้นใยรา *S. rolfsii* ในวันที่ 7 เมื่อทำการตรวจโดยวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Streptomyces* spp. ในวันที่ 4 หลังจากลงเชื้อราทดสอบ พบว่ามีเพียง 36 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ ส่วนไอโซเลทอื่น ๆ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Streptomyces* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 50.00 - 69.64 เปอร์เซ็นต์ และ *Streptomyces* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่4) ลักษณะการยับยั้งระหว่างโคโลนีของเส้นใยรา *S. rolfsii* กับเชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นไปในลักษณะของการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใย (ภาพที่ 4) และการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อรา *S. rolfsii* น้อยลง แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหรือสร้างได้เล็กน้อยเมื่ออยู่บนต้นพริก (Fravel, 1988) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้นในสวนพริก และธาตุอาหารบนใบ มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อศักยภาพในการป้องกันโรค

จากการทดลองพบว่า *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกพริก 28 ไอโซเลท จากจำนวน 178 ไอโซเลท (15.91%) มีความสามารถยับยั้งการเจริญของรา *S. rolfsii* ในขณะที่ดินจากสวนยางพาราพบเพียง 8 ไอโซเลท จากจำนวน 87 ไอโซเลท (8.04%) นอกจากนั้นยังพบว่า *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกพริกมีความสามารถยับยั้ง *S. rolfsii* ได้สูงถึง 80.05 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท RL-1-178) ในขณะที่ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินสวนยางมีความสามารถยับยั้ง *S. rolfsii* ได้สูงสุดเพียง 66.08 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท SS-2-243) มีการรายงานไว้ว่าการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ซึ่งเป็น soil-borne โดยชีววิธี ควรนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในดินปลูกพืชนั้น ๆ มาใช้ในการทดลองควบคุม (Kochutresiamma *et al.,* 1988) ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งดังกล่าว จุลินทรีย์ น่าจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการระบาดของโรค

ในการคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* พบว่ามีเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 36 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ อย่างไรก็ตามในการนำเชื้อปฏิปักษ์ไปใช้จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยในการอยู่รอดของเชื้อในสภาพสิ่งแวดต่าง ๆ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และ พีเอช เป็นต้น และพบว่า *Streptomyces* spp. ที่แยกจากดินในแปลงปลูกพริกมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีกว่าที่แยกจากดินในแปลงปลูกยางพารา เนื่องจากสภาพแวดล้อมในแปลงปลูกพริกมีความเหมาะสมต่อเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถควบคุมโรคพืชในพริกมากกว่าในแปลงยางพาราทำให้เชื้อปฏิปักษ์มีการอยู่รอด และสร้างสารยับยั้งการเจริญเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ น้อยกว่าเชื้อปฏิปักษ์ที่แยกได้จากแปลงปลูกพริก

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ

ลำดับที่	*Streptomyces* spp. ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ *S. rolfsii*
1	RL-1-178	80.05
2	RL-1-179	71.74
3	RL-1-152	71.74
4	PtP-1-125	71.74
5	PK-1-95	71.74
6	RL-1-141	69.64
7	RM-1-143	69.64
8	RM-1-129	66.67
9	RL-1-184	66.57
10	SS-2-243	66.07
11	SKl-1-212	64.29
12	SKl-1-220	61.43
13	RM-1-138	60.72
14	SuT-1-258	60.71
15	SuT-1-259	59.52
16	RL-1-182	57.14
17	CM-1-12	57.14
18	CM-1-29	57.14
19	CM-1-135	57.14
20	SS-2-250	57.14
21	SuT-1-263	57.14
22	CM-1-15	55.35
23	CM-1-17	55.35
24	SuT-1-254	51.78
25	SS-2-249	51.78

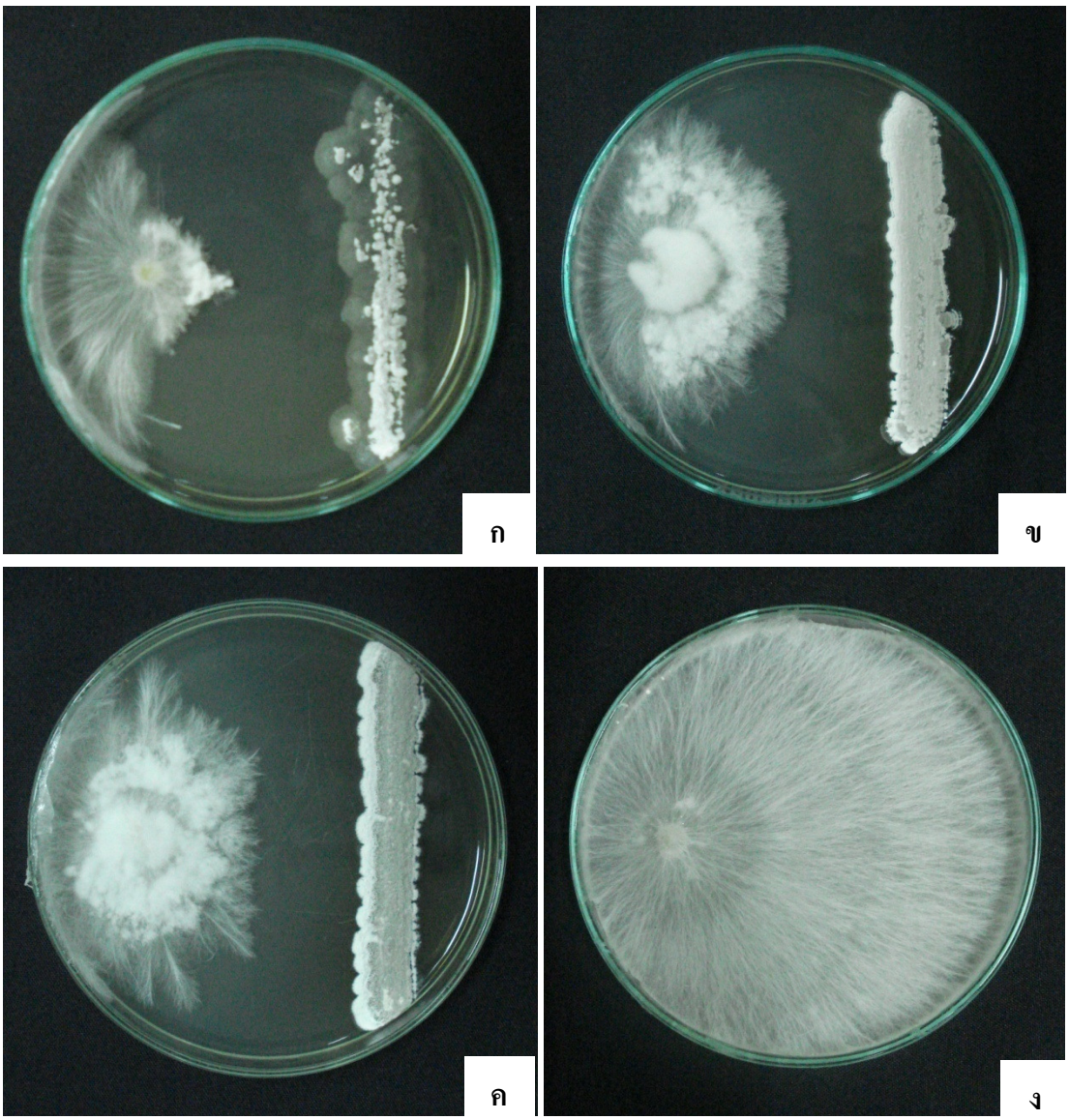
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับที่	*Streptomyces* spp. ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ *S. rolfsii*
26	SS-2-251	51.78
27	SB-2-225	51.78
28	CM-1-18	50.00
29	CM-1-24	50.00
30	TV-2-65	50.00
31	SS-2-247	48.21
32	PtP-1-112	42.85
33	T V-2-60	42.85
34	PtP-1-102	36.42
35	PtP-1-105	33.29
36	PtP-1-108	30.18

หมายเหตุ : คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $\frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ



ภาพที่ 4 การเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร GYM 4 วันหลังการทดลอง

ก. *Sclerotium rolfsii* S 12 และ *Streptomyces* ไอโซเลท 178

ข. *Sclerotium rolfsii* S 12 และ *Streptomyces* ไอโซเลท 179

ค. *Sclerotium rolfsii* S 12 และ *Streptomyces* ไอโซเลท 152

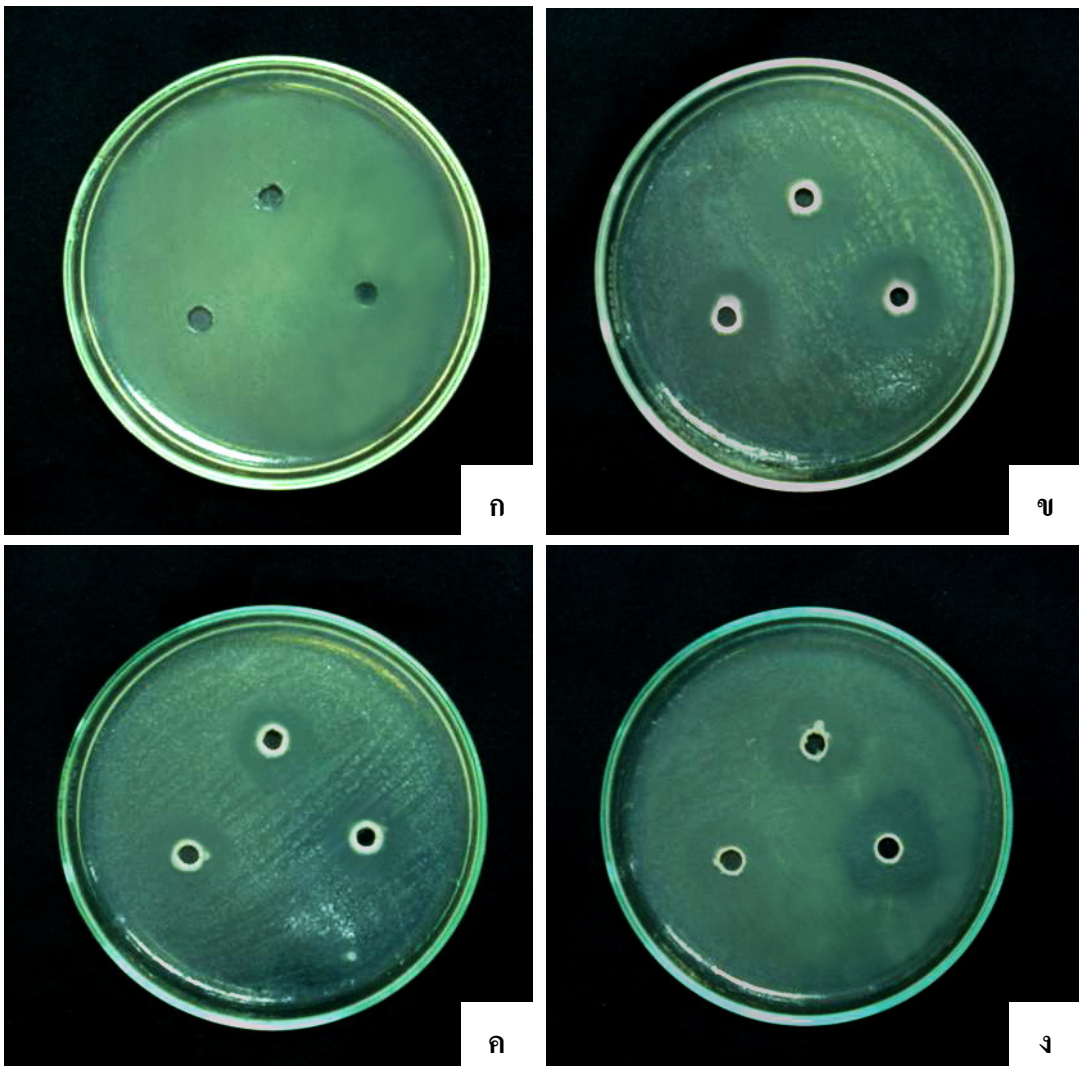
ง. *Sclerotium rolfsii* S 12 ชนิดเดียว (control)

4. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของโรคเหี่ยวเขียว

จากการนำเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 14 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท RM-1-138 เกิดวงใสแนวการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้กว้างมากที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces* ไอโซเลท RL-1-178 และ SS-2-243 ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 5) ส่วนเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลทอื่น ๆ ไม่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* จึงเห็นได้ว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. บางไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้แล้วยังสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้อีกด้วย ตามธรรมชาติในการปลูกพริกมักมีโรคหลายชนิดเข้าทำลายทั้งที่เกิด จากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ดังนั้นหากได้เชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถป้องกันได้ หลายชนิด ก็น่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรคได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อรา หรือแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อปฏิปักษ์ในการนำไปใช้ควบคุมโรคได้หลายชนิด จึงได้นำเชื้อดังกล่าวไปศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ ที่มีความจำเป็นในการตัดสินใจนำไปผลิตเป็นรูปสารชีวภัณฑ์ต่อไป

ตารางที่ 5 ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดย *Streptomyces* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลท	วงใสการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* (มิลลิเมตร)
RL-1-178	26.7
RL-1-179	-
RL-1-152	-
PtP-1-125	-
PK-1-95	-
RL-1-141	-
RM-1-143	-
RM-1-129	-
RL-1-184	-
SS-2-243	26.0
SKl-1-212	-
SKl-1-220	-
RM-1-138	31.0
SuT-1-258	-



ภาพที่ 5 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดย *Streptomyces* spp. โดยวิธี agar well diffusion หลังจากการเลี้ยงร่วมกัน 2 วัน

ก. ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

ข. วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* R7 โดย *Streptomyces* RM-1-138

ค. วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* R7 โดย *Streptomyces* RL-1-178

ง. วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* R7 โดย *Streptomyces* SS-2-243

5. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp. เพื่อจำแนกชนิดตามหนังสือ Bergey's Manual รายละเอียดสรุปใน (ตารางที่ 6) พบว่าเชื้อมีความแตกต่างของสีโคโลนี สปอร์ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน การทนเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นกรด ด่าง ที่สามารถเจริญได้ การสร้าง melanin pigment ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการระบุชนิดของเชื้อ ดังรายงานของ Selman (1967) ศึกษากระบวนการ metabolism สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียได้ ได้แก่ ความไวต่อสารปฏิชีวนะ การสร้างรงควัตถุ การสร้าง diffusible pigment การทดสอบความเป็นกรด ด่าง การเจริญบนแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ การใช้แหล่งไนโตรเจน และการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น β-1, 3 glucanase และchitinase การเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยเมื่อนำลักษณะดังกล่าวมาประกอบกันพบว่าไม่สามารถเทียบเคียงชนิดได้เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบการใช้สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อทำการเทียบเคียงกับหนังสือ Bergey's Manual พบว่าไม่มี *Streptomyces* spp. ไอโซเลทใดให้ผลการทดลองตรงกับ Bergey's Manual จึงได้ทำการส่งเชื้อ *Streptomyces* spp. ไปทำการจำแนกชนิดที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท SS-2-243 ตรงกับ Accession number EU521701 ซึ่งก็คือเชื้อ *S. mycarofaciens* โดยต่างก็มีความเหมือน similarity 100 % และพบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท RL-1-178 และไอโซเลท RM-1-138 ตรงกับ Accession number DQ375790 ซึ่งก็คือเชื้อ *S. philanthi* โดยต่างก็มีความเหมือน similarity 100 % ซึ่งคุณสมบัติของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีดังนี้

1. *S. mycarofaciens*

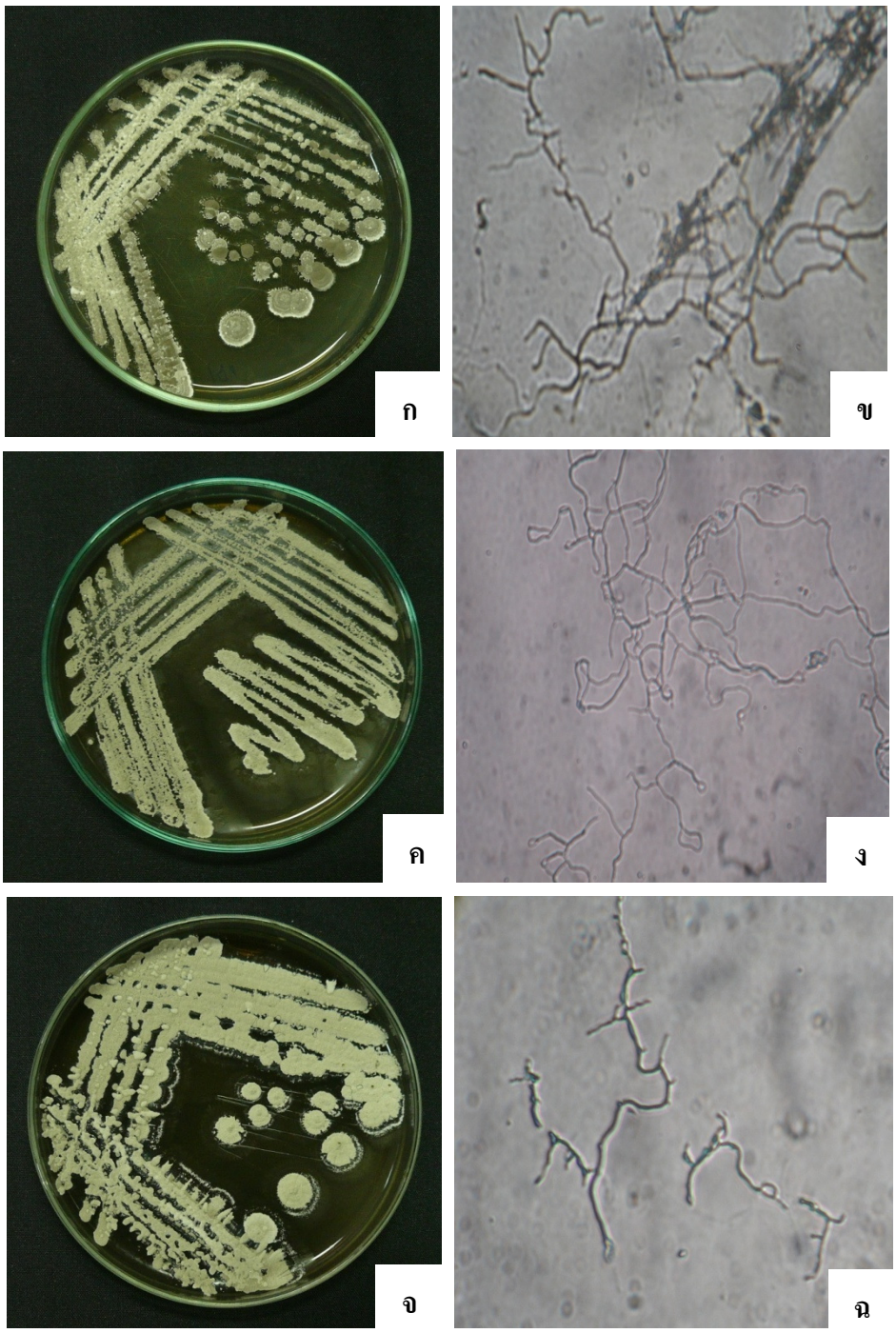
S. mycarofaciens มีลักษณะ โคโลนีสีขาวอมเทา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสายสปอร์เป็นสายตรง (rectiflexibiles) ภาพที่ 6 เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15 - 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 5 - 7 เจริญบนอาหาร GYM ผสม NaCl ได้สูงสุด 7 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการทดสอบเคซีนและเจลาตินเป็นลบ สามารถใช้น้ำตาล D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-lactose, D-mannose, mannitol, cellobiose, dextran, *meso*-inositol และ raffinose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase แต่จะไม่สร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase (ภาพที่ 8 และตารางที่ 7) เมื่อทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ *S. albospinus* strain: NBRC 13846 *S. propurpuratus* strain: NBRC 13842 *S. albospinus* strain JCM 3399 และ *Streptomyces* sp. BS-112 (ภาคผนวก ง)

2. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

S. philanthi ไอโซเลทที่ 1 มีลักษณะ โคโลนีเขียวอมเทา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสายสปอร์มีลักษณะคล้ายลูป (retinaculiaperti) ภาพที่ 6 เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15 - 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 6 - 7 เจริญบนอาหาร GYM ผสม NaCl ได้สูงสุด 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการทดสอบเคซีนและเจลาตินเป็นลบ สามารถใช้น้ำตาล D-glucose, D-galactose, D-lactose, mannitol, cellobiose และ dextran เป็นแหล่งคาร์บอนได้ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase แต่จะไม่สร้างเอนไซม์ chitinase (ภาพที่ 8 และตารางที่ 7) เมื่อทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ *S. philanthi* biovar *capensis S. griseus* subsp. *formicus* strain: NBRC 14886 *S. luteoverticillatus* strain HBUM173698 และ *S. lusitanus* strain NRRL B-5637T (ภาคผนวก ง)

3. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

S. philanthi ไอโซเลทที่ 2 มีลักษณะ โคโลนีสีเทา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสายสปอร์มีลักษณะคล้ายลูป (retinaculiaperti) ภาพที่ 6 เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15 - 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 7 - 9 เจริญบนอาหาร GYM ผสม NaCl ได้สูงสุด 4 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในทำให้อาหารมีสีเปลี่ยนจากเดิม ให้ผลในการทดสอบเคซีน และเจลาตินเป็นลบ สามารถใช้น้ำตาล D-glucose, D-lactose และ mannitol เป็นแหล่งคาร์บอน มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase และ chitinase (ภาพที่ 8 และตารางที่ 7) จากคุณสมบัติของการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 แตกต่างจาก *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 โดย *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ไม่สามารถใช้น้ำตาล D-galactose, Cellobiose และ dextran เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถใช้ได้ เมื่อทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ *S. philanthi* biovar *capensis S. griseus* subsp. *formicus* strain: NBRC 14886 *S. luteoverticillatus* strain HBUM173698 และ *S. lusitanus* strain NRRL B-5637T (ภาคผนวก ง)



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลทต่าง ๆ อายุ 14 วัน

ก,ข. *S. mycarofaciens* (isotate SS-2-243)

ค,ง. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 (isotate RL-1-178)

จ,ฉ. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 (isotate RM-1-138)

ตารางที่ 6 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว

Property	*S. mycarofaciens* (SS-2-243)	*S. philanthi* (1) (RL-1-178)	*S. philanthi* (2) (RM-1-138)
Spore chain rectiflexibiles	+	-	-
Spore chain retinaculiaperti	-	+	+
Diffusible pigment produced	-	-	+
Utilization of			
D-glucose	+	+	+
D-fructose	+	-	-
D-galactose	+	+	-
D-lactose	+	+	+
D-xylose	-	-	-
D-mannose	+	-	-
Mannitol	+	+	+
L-arabinose	-	-	-
Cellobiose	+	+	-
Dextran	+	+	-
meso-inositol	+	-	-
Raffinose	+	-	-
Sucrose	-	-	-
Casein Test	-	-	-
Gelatin Test	-	-	-
Chitinase	+	-	+
β-1, 3 glucanase	-	+	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Property	*S. mycarofaciens* (SS-2-243)	*S. philanthi* (1) (RL-1-178)	*S. philanthi* (2) (RM-1-138)
Growth at			
10 °C	-	-	-
15 °C	+	+	+
30 °C	+	+	+
40 °C	+	+	+
45 °C	-	-	-
pH			
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
10	-	+	+
NaCl tolerance (%w/v)			
4	+	+	+
7	+	-	-

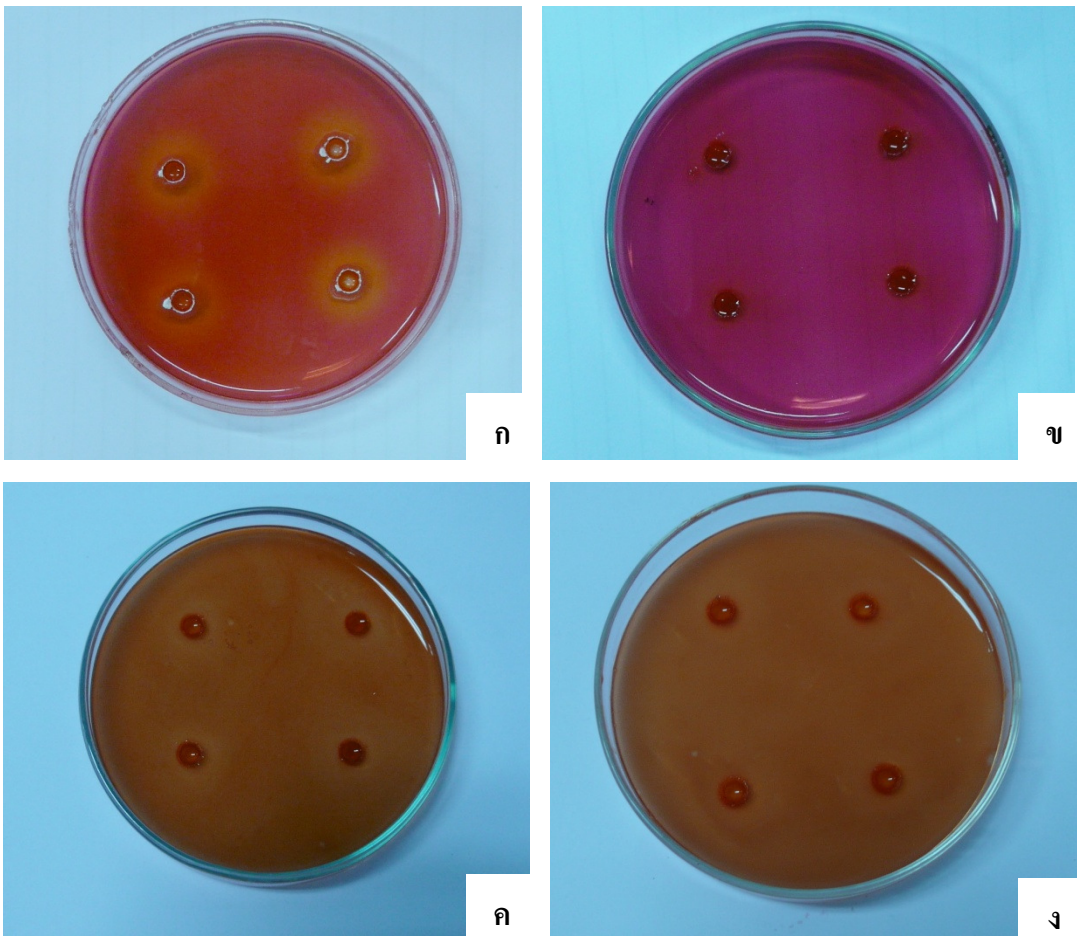
+ = positive, - = negative

ตารางที่ 7 ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase และ chitinase โดยประเมินจากขนาดของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate เฉพาะ

ไอโซเลท	ขนาดของวงใส (มม.) [1/]	
	β-1, 3 glucanase	chitinase
S. mycarofaciens	0.00 c	12.5 a
S. philanthi ไอโซเลทที่ 1	22.5 a	0.00 b
S. philanthi ไอโซเลทที่ 2	13.0 b	14.0 a
F-test	**	**
C.V.	2.10	3.18

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 plate ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



ภาพที่ 7 ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ glucanase และ chitinase ที่เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างขึ้นหลังทดสอบ 5 วัน

ก. เอนไซม์ β-1, 3 glucanase จากเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

ข. เอนไซม์ β-1, 3 glucanase จากเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

ค. เอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

ง. เอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *S. mycarofaciens*

6. การศึกษาศักยภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens, S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

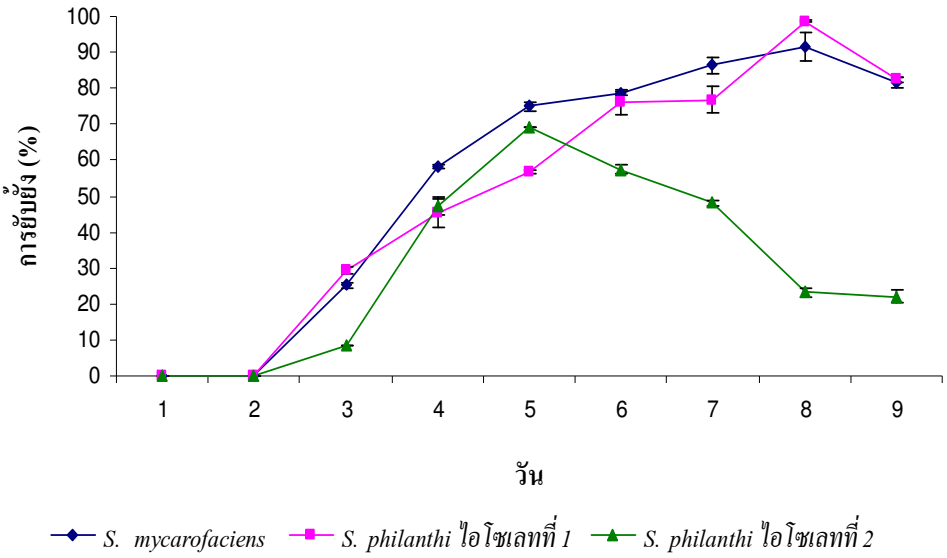
6.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii*

จากการทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* พบว่าเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 3 วันขึ้นไป โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* 8.69-98.7% โดย *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 8 วันแต่เมื่อถึงวันที่ 9 พบว่าศักยภาพในการยับยั้งน้อยลง (ภาพที่ 8) ส่วนเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 5 วัน แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าศักยภาพในการยับยั้งน้อยลง

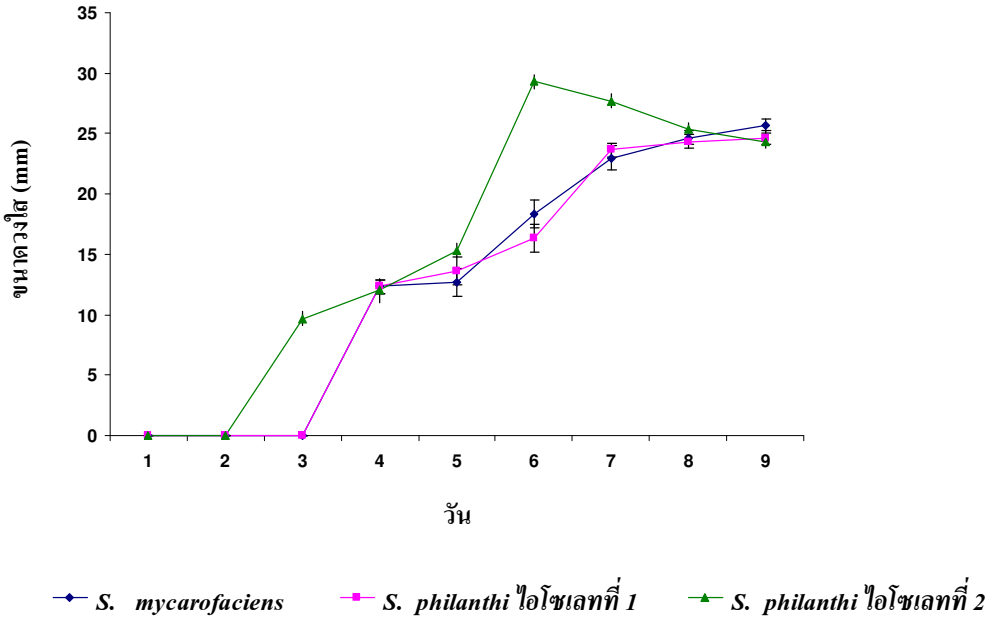
6.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

น้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 3 วันขึ้นไป โดยหลังจากการทดสอบพบว่าสามารถทำให้เกิดวงใสแนวการยับยั้ง 9.6-29.3 มิลลิเมตร *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สามารถผลิตสารยับยั้งได้ตั้งแต่วันที่ 3 และจะผลิตได้ที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 6 วัน ในขณะที่ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. mycarofaciens* สามารถผลิตสารยับยั้งได้เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 4 วันขึ้นไป โดยจะผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 9 วัน (ภาพที่ 9)

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในแต่ละไอโซเลท เพื่อให้เชื้อสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในแต่ละเชื้อ จะใช้ระยะเวลาแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทมีการสร้างสารยับยั้ง และอัตราการใช้อาหารแตกต่างกัน



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* โดย น้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-9 วัน



ภาพที่ 9 การยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens* *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-9 วัน

7. ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุม *S. rolfsii* และ *R. solanacearum*

7.1 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเส้นใยรา *S. rolfsii*

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *S. rolfsii* 56.64-84.65% (ตารางที่ 8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและปลดปล่อยลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นั้นพบว่ามีมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* น้อยลงโดยสามารถยับยั้งได้เพียง 43.75 - 71.00% อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *S. mycarofaciens* มีความสามารถในการทนความร้อนได้ดี เนื่องจากยังคงสามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อไม่มีความแตกต่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 8) ส่วนเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 พบว่ามีความสามารถในทดความร้อนน้อยกว่าเชื้อ *S. mycarofaciens* เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* น้อยกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์สารต้านเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ผลิตโดย *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 เสื่อมสลายไปได้บางส่วนเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารยับยั้งเชื้อราที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท แม้จะเสื่อมสลายไปบ้างเล็กน้อยเมื่อถูกความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แต่พบว่ายังมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีจึงสามารถนำสารยับยั้งดังกล่าวไปพัฒนาต่อเป็นรูปผลิตภัณฑ์ต่อไปได้

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยวิธีการกรองและการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ชุดทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ เจริญ *S. rolfsii*		
	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง	T-test
ชุดควบคุม	0.00 [1/]	0.00	nd
S. mycarofaciens	74.00	68.87	nd
S. philanthi ไอโซเลทที่ 1	84.25	71.00	**
S. philanthi ไอโซเลทที่ 2	56.64	43.75	**

nd ไม่แตกต่างทางสถิติที่ 99 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างทางสถิติที่ 99 เปอร์เซ็นต์

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 plate ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี T-test

หมายเหตุ : คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $100 - \{ (R^2/r^2) \times 100 \}$

R คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารทดสอบ

r คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารควบคุม

7.2 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum*

น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* โดยหลังจากการทดสอบพบว่าสามารถทำให้เกิดวงใสแนวการยับยั้ง 21.0 – 26.2 มิลลิเมตร (ตารางที่ 9) แต่หลังจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ไปนึ่งด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้เลย แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ผลิตโดย *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ผลิตขึ้นนั้นเสื่อมสลายทั้งหมดหากถูกความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เนื่องจากสารยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นสารในกลุ่มโปรตีน เมื่อถูกความร้อนก็จะเสื่อมสลายได้ง่าย จึงทำให้ศักยภาพในยับยั้งเชื้อลดลงหรือไม่สามารถยับยั้งได้เลย

ตารางที่ 9 การยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธีการกรองและการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ชุดทดสอบ	การยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* (มิลลิเมตร)		
	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง	T-test
ชุดควบคุม	0.00[1/]	0.00	nd
S. mycarofaciens	21.0	0.00	**
S. philanthi ไอโซเลทที่ 1	22.4	0.00	**
S. philanthi ไอโซเลทที่ 2	26.2	0.00	**

nd ไม่แตกต่างทางสถิติที่ 99 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างทางสถิติที่ 99 เปอร์เซ็นต์

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 plate ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี T-test

8. ศึกษาผลของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ต่อการงอกของเมล็ดพริก

จากการนำเมล็ดพริกมาแช่ในนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2, *S. mycarofaciens* และเชื้อ *T. harzianum* เพื่อทดสอบการงอกของเมล็ดพริก และความผิดปกติ โดยทำการวัดความยาวลำต้น ความยาวราก หาน้ำหนักสด และเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมการทดลอง พบว่าเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *T. harzianum* ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพริกโดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวลำต้น และความยาวรากไม่แตกต่างจากเมล็ดพริกที่แช่ด้วยน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ส่วนน้ำหนักสดของต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่แช่ด้วยเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *T. harzianum* มีค่ามากกว่าต้นกล้าที่แช่น้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chang และคณะ (1986) ซึ่งทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ในวัสดุพีท (peat) / รำข้าว หรือในรูป conidial suspension แล้วผสมลงในดิน ที่ปลูกพริกไทย เบญจมาศ และแพงพวย พบว่าสามารถช่วยในการส่งเสริมการแตกหน่อ เร่งการบานและออกดอก ช่วยเพิ่มความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง Windham และคณะ (1986) รายงานว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* และ *T. koningii* ช่วยเพิ่มอัตราการงอก การเจริญของเนื้อเยื่อ และน้ำหนักแห้งของข้าวโพด มะเขือเทศ ยาสูบ เป็นต้น และจากการรายงานของ เกษม และวิรัตน์ (2541) ศึกษาผลของการใช้เชื้อรา *T. hamatum* ต่อการเจริญเติบโตของรากผักกาดหัว โดยเติมสปอร์ของเชื้อราในวัสดุปลูก และเปรียบเทียบกับการปลูกในวัสดุที่ไม่เติมสปอร์ของเชื้อรา ผลการทดลองพบว่าการเติมเชื้อรา *T. hamatum* ในวัสดุปลูกจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของรากดีกว่าการปลูกในวัสดุที่ไม่ได้เติมเชื้อราอย่างเด่นชัด รากของผักกาดหัวจะมีปริมาณการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น เมื่อปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่เติมลงในวัสดุปลูกเพิ่มสูงขึ้น และจะมีผลให้น้ำหนักแห้งของรากผักกาดหัวเพิ่มขึ้นมากกว่าการปลูกในวัสดุที่ไม่ได้เติมเชื้อรา ในทางตรงกันข้ามเมล็ดพริกที่แช่ด้วยเชื้อ *S. philanthi* ทั้ง 2 ไอโซเลท ทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริก ความยาวลำต้น ความยาวราก รวมทั้งน้ำหนักสดของต้นกล้า ลดลงจากเมล็ดพริกที่แช่น้ำกลั่นอย่างเดียว โดย *S. philanthi* โอโซเลทที่ 2 มีผลต่อต้นกล้าพริกเป็นอย่างมากโดยต้นกล้าที่ได้ส่วนใหญ่ไม่มีการเจริญของรากอย่างสิ้นเชิง การทดลองในขั้นต่อไปจึงไม่นำ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ไปทดลองอีกต่อไป

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด ของกล้าพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.และ *Trichoderma* sp. ก่อนการเพาะ

กรรมวิธี	ความงอก %	ความยาวลำต้น (mm)	ความยาวราก (mm)	น้ำหนักสด (mg/ ต้น)
น้ำกลั่น	95.80 a [1/]	23.20 a	28.59 ab	25.44 c
S. mycarofaciens	94.82 a	24.40 a	32.92 a	26.86 a
S. philanthi ไอโซเลทที่ 1	85.25 b	18.93 b	25.45 b	22.42 d
S. philanthi ไอโซเลทที่ 2	69.80 c	7.41 c	1.06 c	12.48 e
T. harzianum	94.00 a	22.20 a	29.78 ab	25.70 b
F-test	**	**	**	**
C.V.	8.41	10.34	7.51	10.86

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

9. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่1 ในการควบคุมโรคในเรือนทดลอง

9.1 การควบคุมโรครา และโคนเน่า

จากการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. mycarofaciens* ในการควบคุมโรครา และโคนเน่าจากเชื้อ *S. rolfsii* ในเรือนทดลอง โดยทำการคลุกเมล็ดพริกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 *S. mycarofaciens* และ *T. harzianum* หลังจากนั้นนำไปเพาะลงในดินที่ผสมด้วย หัวเชื้อ *S. rolfsii* ทำการตรวจผลเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ากรรมวิธีการใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการคลุกเมล็ดพริกทำให้ต้นพริกรอดตายสูงถึง 66.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11 ภาพที่ 13) และยังมีเปอร์เซ็นต์รอดตายของต้นพริกสูงกว่า *T. harzianum* (62.25 %) อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 2 กรรมวิธีดังกล่าวข้างต้นนั้นทำให้ต้นพริกรอดตายได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คาร์บอกซิน ซึ่งทำให้ต้นพริกรอดตาย 69.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *S. mycarofaciens* ทำให้ต้นพริกรอดตายได้น้อยกว่าการคลุกเมล็ดด้วย *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1, *T. harzianum* และคาร์บอกซินโดยทำให้ต้นพริกรอดตายได้เพียง 54.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกรรมวิธีควบคุมที่คลุกเมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่น (45.50 %) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kwok และคณะ(1987)ได้ทำการศึกษาใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. และเชื้อ *T. harzianum* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของต้นไม้เนื้อแข็ง พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 สามารถลดอัตราการเกิดโรคเน่าคอดินในระดับเรือนทดลองได้

9.2 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียว

จากการทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* ในเรือนทดลอง โดยทำการคลุกเมล็ดพริกด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* ก่อนนำไปเพาะในกระบะเพาะเมื่อต้นกล้า อายุ 1เดือน ทำการกรีดรากโดยห่างจากโคนต้น 5 เซนติเมตร จากนั้นราดเชื้อ *R. solanacearum* ตรวจผลเป็นเวลา 1 เดือน โดยมีสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต และน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมการทดลอง พบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงสุด คือ การคลุกด้วยเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 (64.25%) รองลงมา คือ การคลุกเมล็ดด้วยสเตรปโตมัยซินซัลเฟต (58.50%) *S. mycarofaciens* (55.75%) *T. harzianum* (52.00%) และน้ำกลั่น (49.00%) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์ (2549) โดยทำการคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท 15, 33 และ 87 ก่อนปลูก และใส่อีกครั้งเมื่อต้นกล้าอายุ 12 วัน ทำการย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุได้ 15 วัน ลงในกระถางที่

มีเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า เชื้อ *Streptomyces* 87 ลดอัตราการเกิดโรคเหี่ยวเขียวได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces* 15 และ 33 โดยพบการเกิดโรคเหี่ยวเขียวเพียง 15 % , 25% และ 35% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่มีเชื้อ *Streptomyces* spp. พบการเกิดโรคที่ระดับ 85% และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ากรรมวิธีการคลุกเมล็ดพริกด้วย *S. philanthi*, *S. mycarofaciens* และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุม (ตารางที่ 11 ภาพที่ 14) ส่วนการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *T. harzianum* ไม่มีผลในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียว โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์อยู่รอดของต้นกล้า ไม่แตกต่างจากน้ำกลั่น

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่คัดเลือกมีศักยภาพในการลดการเข้าทำลายของโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว ได้เทียบเท่ากับสารคาร์บอกซิน และสเตรปโตมัย ซินซัลเฟต ซึ่งจำนวนต้นพริกที่งอกและอยู่รอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และยังพบว่า *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี ซึ่งสอดคล้องกับรายงายของ Rothrock และคณะ (1981) ทำการเพาะเมล็ดหรือกล้าพืชด้วยเชื้อ *Streptomyces* spp. ก่อนปลูก พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถลดอัตราความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

ตารางที่ 11 จำนวนต้นที่งอกและรอดตาย เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens* *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และเชื้อ *T. harzianum* ก่อนการเพาะลงในดิน

กรรมวิธี	จำนวนต้นที่งอกและอยู่รอด (%)	
	S. rolfsii [1/]	*R. solanacear*um [2/]
น้ำกลั่น	45.50 c [3/]	49.00 c
S. mycarofaciens	54.25 bc	55.75 ab
S. philanthi ไอโซเลทที่ 1	66.25 ab	64.25 a
T. harzianum	62.25 ab	52.00 bc
คาร์บอกซิน	69.50 a	ND
สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต	ND	58.50 ab
F-test	**	**
C.V.	3.29	9.83

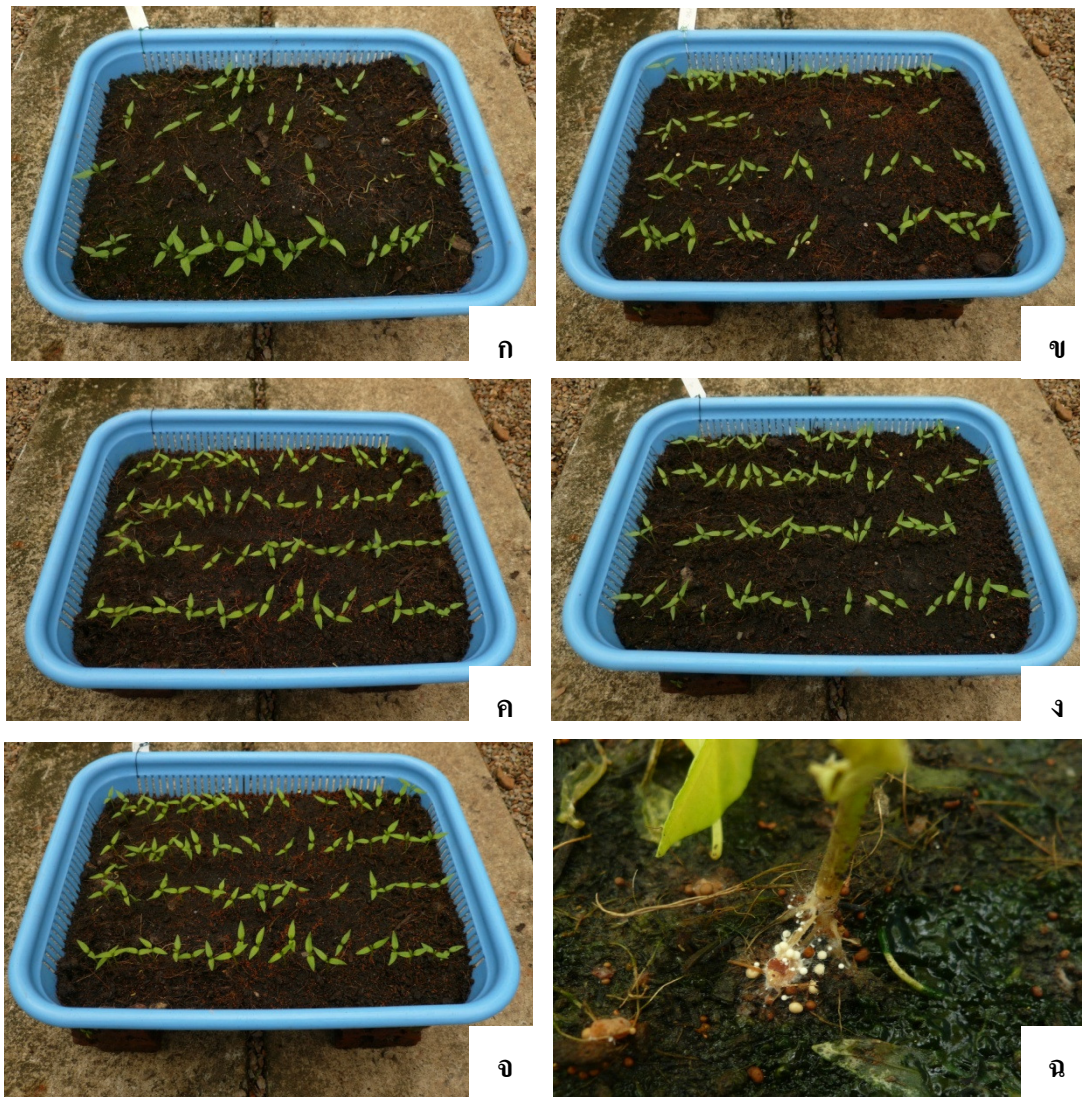
ND = not determined

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01

[1/] ดินที่ใช้ปลูกพริกผสมเชื้อ *S. rolfsii*

[2/] ปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ในต้นกล้าพริกอายุ 1 เดือน

[3/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



ภาพที่10 ต้นพริกที่งอกและมีชีวิตรอดหลังจากปลูกเชื้อ *S. rolfsii* เป็นเวลา 14 วัน

ก. ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

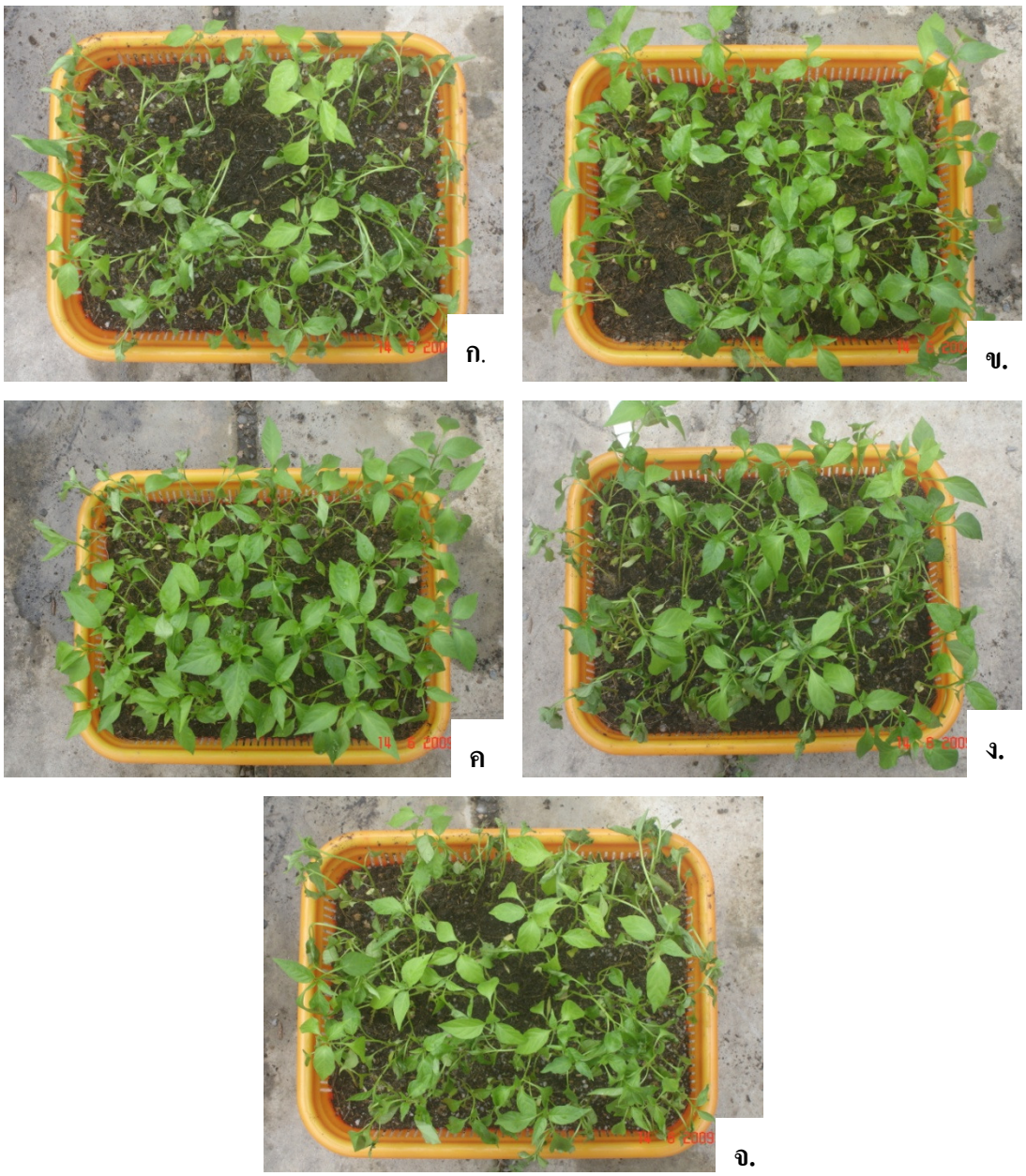
ข. *S. mycarofaciens*

ค. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

ง. *T. harzianum*

จ. คาร์บอกซิน 500 mgL^{-1}

ฉ. ลักษณะต้นพริกที่เชื้อเข้าทำลายอายุ 1 เดือน



ภาพที่ 11 ต้นพริกอายุ 1 เดือน ที่คลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ เชื้อ *T. harzianum* น้ำ และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต แสดงอาการเหี่ยวหลังทำการปลูกเชื้อ *R. solanacearum*

ก. ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

ข. *S. mycarofaciens*

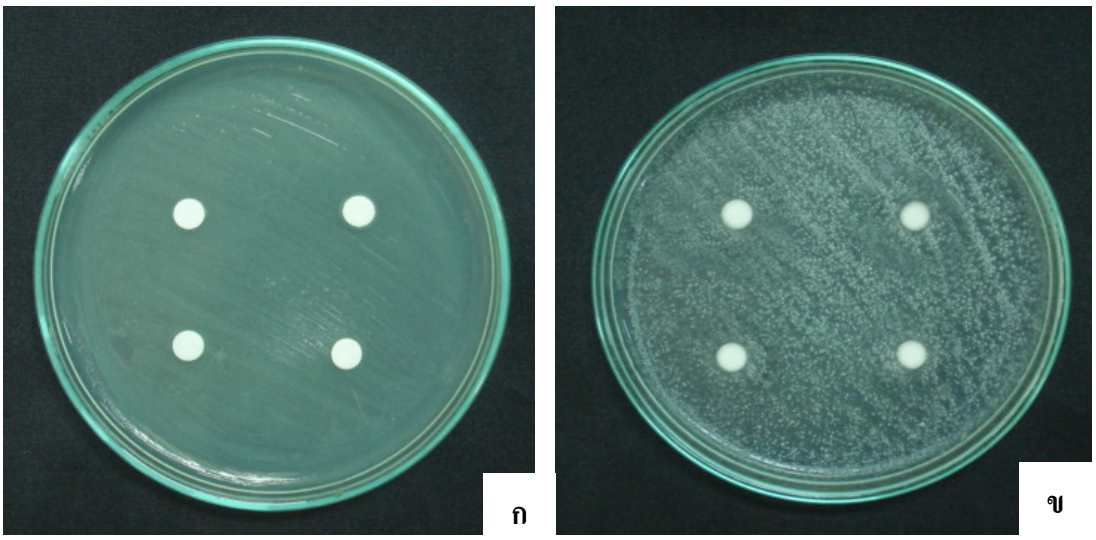
ค. *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

ง. *T. harzianum*

จ. สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 1,000 mgL^{-1}

10. การทดสอบความเข้ากันได้ ของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

จากการสอบความสามารถในเจริญร่วมกันของ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยทาแบคทีเรียแขวนลอย *S. philanthi* ไอโซเลท 1 ให้ทั่วอาหาร GYM ทำการหยดแบคทีเรียแขวนลอย *S. mycarofaciens* ลงบน disc และเกลี่ยแบคทีเรียแขวนลอย *S. mycarofaciens* ให้ทั่วอาหาร GYM ทำการหยดแบคทีเรียแขวนลอย *S. philanthi* ไอโซเลท 1 พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. 2 สายพันธุ์ ไม่แสดงปฏิกิริยายับยั้งต่อกัน (ภาพที่ 16) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. 2 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมาได้นั้นสามารถนำไปใช้ร่วมกันได้ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวของพริกในสภาพแปลงทดลองได้



ภาพที่ 12 ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลท 1 ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร GYM

ก. เชื้อ *S. mycarofaciens* บนแผ่น disc ไม่แสดงอาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. philanthi* บนอาหารวุ้น (ไม่เกิด clear zone)

ข. เชื้อ *S. philanthi* บนแผ่น disc ไม่แสดงอาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mycarofaciens* บนอาหารวุ้น (ไม่เกิด clear zone)

11. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ

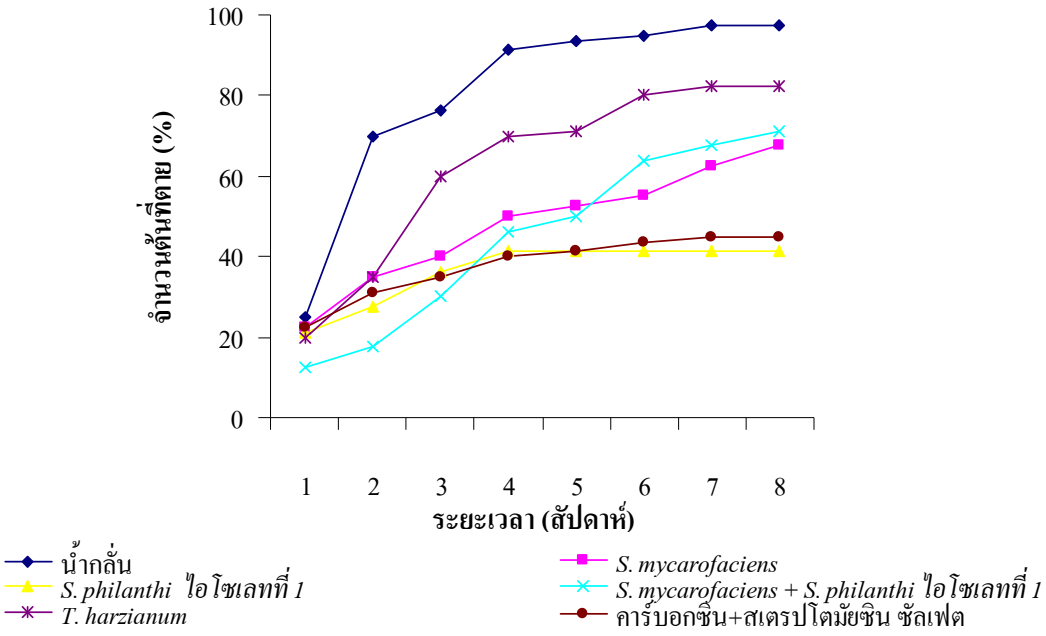
จากการทดสอบการควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวของพริก ในสภาพแปลงทดลอง โดยย้ายต้นกล้าพริกขี้หนูพันธุ์ Super Hot อายุ 30 วันในดินธรรมชาติ (non - sterilized soil) เป็นเวลา 15 วัน จึงทำการปลูกเชื้อ 2 ชนิด คือ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* ลงในดินปลูกพริกทุกถุงที่ทำการทดลอง ก่อนทำการควบคุมโรคด้วยการราดเชื้อปฏิปักษ์ต่างๆ ทุกสัปดาห์ คือ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมี (ตารางที่ 12) พบว่าหลังจากทำการปลูกเชื้อ 7 วัน ต้นพริกถูกเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* เข้าทำลายประมาณ 15- 20 เปอร์เซ็นต์ ในทุกการทดลอง และการตายของต้นกล้าในชุดควบคุมจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยหลังจาก 4 สัปดาห์ ต้นพริกตายประมาณ 91.25 เปอร์เซ็นต์ และเหลือต้นรอดอยู่เพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 17 และตารางที่ 12) ส่วนในชุดที่มีการควบคุมโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่างๆ และสารเคมี พบว่าอัตราการตายของต้นพริกลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 17) โดยสัปดาห์ ที่ 8 เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่1 สามารถควบคุมโรคทั้ง 2 โรค ได้ดีที่สุดโดยมีจำนวนต้นพริกอยู่รอดจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคจำนวน 58.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต ซึ่งมีอัตราอยู่รอด 55.00 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาศักยภาพในการควบคุมโรคราก และโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* เพียงอย่างเดียว พบว่ากรรมวิธีการใช้ *S. mycarofaciens* ร่วมกับ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถลดอัตราการตายของต้นพริกจากการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii* ได้มากที่สุดโดยมีอัตราการตายเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีการใช้เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ กรรมวิธีการใช้ *T. harzianum* โดยมีอัตราการตาย 26.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกรรมวิธีควบคุม โดยมีอัตราการตายสูงถึง 47.50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 18 และตารางที่ 12) เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Alternaria solani, A. alternata, Pusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahliae* และ *S. cerevisiae* (Aghighi *et al.,* 2004) และเมื่อพิจารณาศักยภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* เพียงโรคเดียว พบว่ากรรมวิธีการใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถลดอัตราการตายของต้นพริกจากโรคเหี่ยวได้ดีกว่าการใช้สารเคมีโดยทำให้มีอัตราการตายของต้นพริกเพียง 7.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้สารเคมีทำให้มีอัตราการตายของต้นพริก 11.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีการใช้ *S. mycarofaciens* โดยทำให้มีอัตราการตายของต้นพริก 28.75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ พบว่าไม่สามารถลดอัตราการ

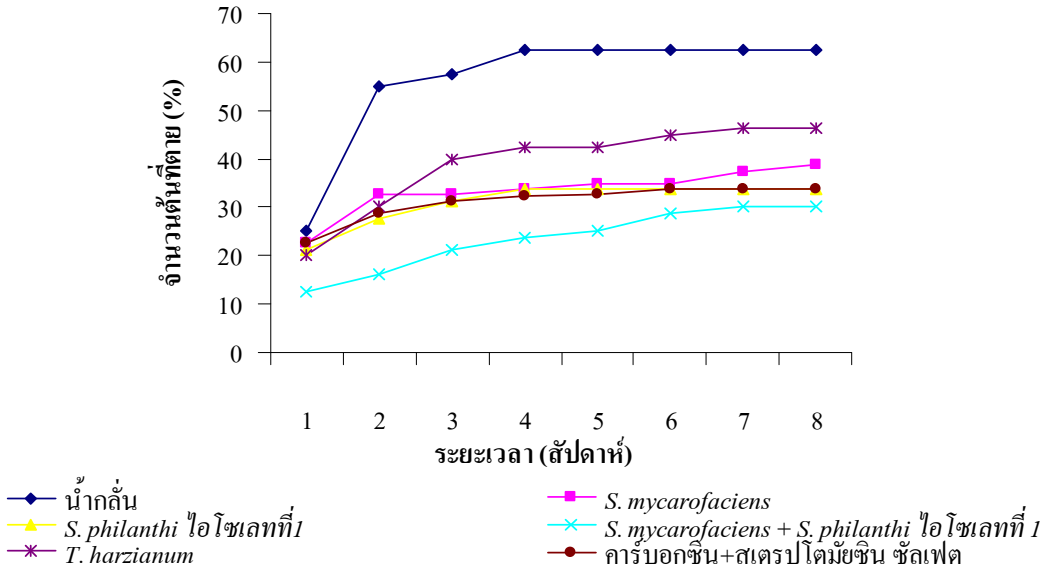
ตายของต้นพริกได้ เนื่องจากอัตราการตายของต้นพริกไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกรรมวิธีควบคุม

จะเห็นได้ว่าในการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อ *T. harzianum* มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีพอสมควร แต่ไม่สามารถควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chamswarng และคณะ (2002) ทำการผสมเชื้อ *T. harzianum* ชนิดสดกับปุ๋ยหมักที่ผสม ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถลดปริมาณเม็ดสเคลอโรเทียมและลดปริมาณการเกิดโรคลำต้นเน่าของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดี ในการทดลองในครั้งนี้ได้ทำการปลูกเชื้อโรค 2 ชนิดลงบนต้นพริก แม้ว่าต้นพริกจะถูกเชื้อ *S. rolfsii* เข้าทำลายน้อย แต่ต้นพริกที่เหลือก็จะถูกเชื้อ *R. solanacearum* เข้าทำลาย ทำให้เหลือต้นพริกที่สมบูรณ์เพียง 17.50 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 ส่วนอัตราการตายของต้นพริกที่เกิดจากการเข้าทำลายของทั้ง 2 โรคร่วมกัน พบว่ากรรมวิธีการใช้ *S. mycarofaciens* ให้ผลการควบคุมได้ดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีโดยทำให้ต้นพริกมีอัตราการตายจากโรคทั้ง 2 ชนิดเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Williams (1982) พบว่า *Streptomyces spp.* ที่อาศัยอยู่ในดินรอบรากสามารถป้องกันรากพืชได้โดยจุลินทรีย์จะสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของสาเหตุโรคพืช ซึ่งการค้นพบครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่ได้นำเชื้อ *S. philanthi* และ *S. mycarofaciens* มาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ทั้ง 2 ชนิดสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ได้อย่างดี เพราะในสภาพธรรมชาติเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เข้าทำลายนั้นมีหลายชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส และไส้เดือนฝอย ดังนั้นเมื่อได้เชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิดแล้ว ก็จะมีประโยชน์ในการนำไปศึกษาต่อในเชิงลึก และนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ หรือสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อไป เพื่อความสะดวกต่อการนำไปใช้ของเกษตรกร ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดอัตราการใช้สารเคมีได้กำจัดศัตรูพืชได้ นอกจากนี้ Kaltenpoth และ Strohm (2007) ยังพบว่า *S. philanthi* จัดเป็นพวก Symbiotic แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับตัวต่อ (wasp) โดยจะทำหน้าที่ป้องกันรังจากการเข้าทำลายของเชื้อรา และยังมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของตัวต่อระยะตัวอ่อนที่อยู่ในรังดิน

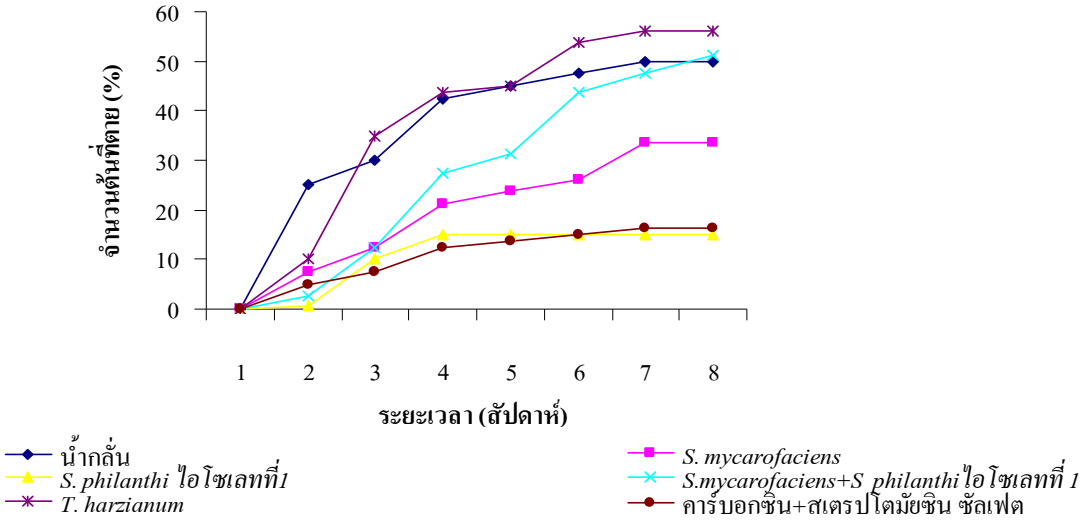
ปริมาณผลผลิตพริกในกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณโคนต้นพริกด้วยเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ได้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 38.32 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกรรมวิธีการใช้สารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต และ *S. mycarofaciens* ร่วมกับ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ซึ่งได้ผลผลิต 38.25 และ 36.89 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ และพบว่าผลผลิตพริกในกรรมวิธีดังกล่าวข้างต้น มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการควบคุม ซึ่งได้ผลผลิตเพียง 7.21 กิโลกรัม /ไร่ ดังตารางที่ 12



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรครากและโคนเน่า (*S. rolfsii*) เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย จากโรคเหี่ยวเขียว (*R. solanacearum*) เมื่อทำการควบคุมโดยเชื้อ*S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ต้นพริกที่ตาย และจำนวนต้นสมบูรณ์ (อยู่รอด) หลังจากปลูกในดินที่มีเชื้อ *S. rolfsii* และเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเวลา 2 เดือน โดยทำการป้องกันโรคด้วยวิธีการต่างๆ

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายจากโรค[1/]			% ต้น[2/] สมบูรณ์	ผลผลิต [3/] (กก/ไร่)
	รากและโคนเน่า (*S. rolfsii*)	เหี่ยวเขียว (*R. solanacearum*)	2 โรคร่วมกัน		
S. mycarofaciens	33.75 b	28.75 c	5.00 e	32.50 b	28.66 a
S. philanthi ไอโซเลทที่1	26.25 c	7.50 d	7.50 d	58.75 a	38.32 a
S.mycarofaciens+ *S philanthi* ไอโซเลทที่ 1	20.00 d	41.25 a	10.00 c	28.75 b	36.89 a
T. harzianum	26.25 c	36.25 b	20.00 a	17.50 c	13.93 b
คาร์บอกซิน+ สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต	28.75 c	11.25 d	5.00 e	55.00 a	38.25 a
น้ำกลั่น	47.50 a	35.00 b	15.00 b	2.5 d	7.12 b
F-test	**	**	**	**	**
C.V.	10.09	9.78	4.50	2.00	1.50

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01

[3/] คำนวณโดยใช้อัตรา 2,750 ต้น/ไร่ (สาวิตร แสงจันทร์, 2547) เก็บผลผลิตจนพริกมีอายุ 3 เดือน

[1/2/ 3/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

ภาพที่ 16 อาการโรค จากการปลูกเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว เป็นเวลา 45 วัน

ก. ต้นพริกขี้หนูยืนต้นตายเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii*

ข,ค. ราก และโคนต้นพริกขี้หนูถูกทำลาย พบเส้นใยเชื้อรา สีขาว และเม็ดสเคลอโรเทียมของราขึ้นปกคลุม

ง. ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยวเขียวเนื่องการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solanacearum*

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และพิสูจน์โรคพริก

1.1 โรครากและโคนเน่า

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรครากและโคนเน่า ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง และสามารถแยกเชื้อได้ 15 ไอโซเลท เมื่อทำการพิสูจน์โรคพบว่า *S. rolfsii* S12 มีศักยภาพในการก่อโรครุนแรงที่สุด

1.2 โรคเหี่ยวเขียว

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวเขียว ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง และสามารถแยกเชื้อได้ 22 ไอโซเลท เมื่อทำการพิสูจน์โรคพบว่า *R. solanacearum* R7 มีศักยภาพในการก่อโรครุนแรงที่สุด

2. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

สามารถเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริกในพื้นที่จังหวัด กระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ปัตตานี พัทลุง ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี ได้จำนวน 16 ตัวอย่าง และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. จากดินแปลงปลูกพริกได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลท และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *Streptomyces* spp. จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 87 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกยางพารา จำนวน 7 ตัวอย่าง

3. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

ทดสอบศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 265 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า พบว่ามีเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 36 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 30.18 – 80.05 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินปลูกพริกมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้สูงถึง 80.05 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท RL-1-178) ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ปลูกยางพารามีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้สูงสุดเพียง 66.08 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท SS-2-243)

4. การคัดเลือก *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของโรคเหี่ยวเขียว

เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 14 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท คือ *Streptomyces* ไอโซเลท RM-1-138, ไอโซเลท RL-1-178 และ ไอโซเลท SS-2-243 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* โดยทำให้เกิดวงใสที่มีขนาด 31.0, 26.7 และ 26.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

5. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

เทียบเคียงชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SS-2-243, ไอโซเลทRL-1-178 และไอโซเลท RM-1-138 โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่าสามารถเทียบเคียง *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SS-2-243 ได้เป็น *S. mycarofaciens* และ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท RL-1-178 และไอโซเลท RM-1-138 ได้เป็น *S. philanthi*

6. การศึกษาศักยภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *R. solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens, S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2

6.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii*

พบว่าเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 3 วันขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *S. rolfsii* 8.69 - 98.7 เปอร์เซ็นต์

6.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

น้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 3 วันขึ้นไป โดยหลังจากการทดสอบพบว่าสามารถทำให้เกิดวงใสแนวการยับยั้ง 9.6 – 29.3 มิลลิเมตร

7. ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุม *S. rolfsii* และ *R. solanacearum*

7.1 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเส้นใยรา *S. rolfsii*

สารยับยั้งเชื้อราที่ผลิตโดยเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 เสื่อมสลายไปเล็กน้อยหลังจากทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณภูมิสูงถึง 121˚C เป็นเวลา 20 นาที แต่พบว่ายังมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *S. rolfsi* ได้ดี

7.2 ความสามารถทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum*

สารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโดย *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ไม่สามารถทนความร้อนได้หลังจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121˚C เป็นเวลา 20 นาที พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ได้

8. ศึกษาผลของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ต่อการงอกของเมล็ดพริก

เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ส่งผลให้การงอก และการเจริญของเมล็ดพริกลดลงเป็นอย่างมาก จึงไม่นำไปศึกษาต่อ ส่วนเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ส่งผลกระทบต่อการงอก และเจริญของเมล็ดพริกเพียงเล็กน้อย และพบว่าเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *T. harzianum* ไม่มีผลต่อการงอก และการเจริญของเมล็ดพริก

9. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมโรในเรือนทดลอง

9.1 การควบคุมโรคราก และโคนเน่า

การใช้ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่าในเรือนทดลอง ทำให้ต้นพริกอยู่รอดสูงถึง 66.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการใช้ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซิน

9.2 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียว

การใช้เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ทำให้ต้นพริกรอดตายสูงที่สุดคือ 64.25 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการใช้สารสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต

(58.50 %) ในการคุมโรคเหี่ยวเขียว ในเรือนทดลอง ส่วนการใช้เชื้อ *T. harzianum* สามารถควบคุมโรคเหี่ยวเขียวได้เพียงเล็กน้อย

10. การทดสอบความเข้ากันได้ ของเชื้อ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถเจริญร่วมกันได้โดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน

11. การทดสอบศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens* และเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียว ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ

เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถควบคุมโรคราก และโคนเน่า และโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูได้ดีที่สุด โดยทำให้มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดของต้นพริก จากการเข้าทำลายของเชื้อโรคจำนวน 58.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต โดยมีอัตราการอยู่รอด 55.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *T. harzianum* มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีพอสมควร แต่ไม่สามารถควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* ได้ ส่วนผลผลิตพริกที่ได้จากการใช้เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 มีปริมาณสูงที่สุดคือ 38.32 กิโลกรัม/ไร่ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (38.25 กิโลกรัม/ไร่)

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช 9 : 28-33.

เกษม สร้อยทอง และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์.2541. ผลของการใช้เชื้อรา *Trichoderma hamatum* ต่อการเจริญเติบโตของรากผักกาดหัว.*ใน* การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24 : 19-21 ตุลาคม 2541 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 888-889.

นิรนาม. 2547. สถิติส่งออก. กรมศุลกากร คลองเตย กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2550. พริกขี้หนูลูกผสมซุปเปอร์ฮอท. ข่าวสารศรแดง 13 : 4-5.

บรรจบ วันกิ่ง. 2549. การจำแนกชนิด *Streptomyces* ปฏิปักษ์ของเชื้อ *Acidovorax avenae* sub sp. *citrulli*, สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยามหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyce s* spp.ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. *Streptomyces* อีกมิติหนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. แก่นเกษตร 30 : 20-27.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ. 2549. ศักยภาพของ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ.*ใน* สัมมนาวิชาการเกษตร. ประจำปี 2549. 23 -24 มกราคม 2549. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2549, หน้า 110-111.

เมธาวี ธิมาศ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ. 2549. ความผันแปรทางฟีโนไทป์ และความสามารถของเชื้อ *Streptomyces spp.* ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum.* *ใน* การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่ 7 -10 พ.ย. 2549, หน้า 358.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2544. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. โรคพืช มข. ปริทรรศน์. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันจำกัด: บริษัทแอคทีฟ พริ้นท์จำกัด. กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และสมบัติ ศรีชูวงศ์. 2546. การคัดเลือดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง. ว. เกษตร 19 : 176 – 188.

สมศักดิ์ วังใน. 2528.จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สาวิตร แสงจันทร์. 2547. พริกขี้หนูศรแดงพันธุ์ซุบเปอร์ฮอต สายพันธุ์ใหม่สร้างชีวิตใหม่แก่เกษตรกรไทย. [online] Available : http :// www. Matichon.co.th/ techno.php?srctag=05/6/24&srcday=2004/02/15&search=no [Accessed November 18, 2008]

หนึ่ง เตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด. 2539. ธาตุเหล็ก ซิเดอร์โรฟอร์ และจุลินทรีย์. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 3 : 95-100.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2546.โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันจำกัด: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. กรุงเทพฯ.

อนันต์ วงเจริญ. 2547. การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อรอุษา ลาวินิจ และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2549. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี.*ใน* สัมมนาวิชาการเกษตร.23 –24 ม.ค. 2549, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, หน้า 109.

Aghighi, S., Shahidi , B.G.H., Rawashdeh, R., Batayneh , S. and Saadoun, I. 2004. First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani, Alternaria alternate, Fusarium solani,Phytophthora megasperma, Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Sciences 3 : 463-471.

Baniasadi, F., Bonjar, G.H. S.,Baghizadeh, A., Karimi Nik, A., Jorjandi, M., Aghighi, S. and Farokhi, P. R. 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates. Agric. Biol. Sci. 4 : 146-151.

Baron, E.J., Chang, R.S., Howard, D.H., Miller, J.M. and Turner, J.A. 1993. Medical Microbiology : A Short Course. A John Wiley- Liss & Sons, Inc.California.

Bressan, W.and Figueiredo, J.E.F.2008. Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of Fusarium disease in maize by *Streptomyces* spp. Plant Pathol. 120 : 311-316.

Bressan, W. and Figueiredo, J. E. F. 2005. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with antagonistic *Streptomyces* sp. isolates. Phytopath. 153 : 623 – 626**.**

Brian, B.M.G. and Deborah, R.F. 2002. Biological control of plant pathogens : research, commercialization, and application in the USA.[Online]. Available : http://www. apsnet.org/online/feature/biocontrol/links.html. [Accessed November 18, 2008]

Dhanasekaran, D., Sivamani, P., Panneerselvam, A., Thajuddin, N., Rajakumar, G. and Selvamani, S. 2005. Biological control of tomato seedling damping off with *Streptomyces* sp. Plant Pathol. 4 : 91-95.

Dietz, A. and Mathews, J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. Appl. Microbiol. 21 : 527-533.

Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y. and Zhou, S. 2005. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activitiesagainst *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Micro Biot. 20 : 501-504.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou,S. 2005. Isolation and characterization of endophytic *streptomycete* antagonists of *fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiology Letters. 247 : 147-152.

Chamswarng, C., Intanoo, W. and Kumchang,T. 2002. Integrated application of *Trichoderma harzianum* with improved compost and urea for biocontrol of stem rot of chili caused by *Sclerotium rolfsii*. p. 36. In Summary of presentation at The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases, November 5-8, 2002. The imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.

Chang, Y. – C. and Baker, R. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 70 : 145-148.

Cheah, L.H., Kent, G. and Gowers, S. 2001. Brassica crop and a *Streptomyces* sp. as potential biocontrol for club root of brassicas. New Zealand Plant Prote. 54 : 80-83.

Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from Surface sterilized wheat roots. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 5603-5608.

Crawford, D.L., Barder, M.J., Pometto, A.L. and Crawford, R.L. 1982. Chemistry of softwood lignin degradation by a *Streptomyces*. Arch. Microbiol. 131 : 140-145.

El-Abyad, M.S., EI-Abyad, M.A., EI-Shanshoury, A.R. and EI-Sabbagh, S.M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant Soil 149 : 185-195.

El-Naggar, M. Y., El-Assa, S. A. and Abdul-Gawad, M. 2006. Meroparamycin production by newly isolated *Streptomyces* sp. strain MAR01: taxonomy, fermentation, purification and structural elucidation. Microbiol. 44 : 432-438.

Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A. and Barakate, M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Micro Biot. 23 : 1503-1509.

Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C. and Candela, M.E. 2007. Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. Phytopathol. 155 : 342-349.

Felse, P.A. and Panda, T. 1999. Studies on application of chitin and its derivatives. Bioproc. Eng. 20 : 505-512.

Gamliel, A., Katan, J. and Cohen, E. 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica. 17 : 101 – 105.

Gupta, R., Sexena, R.K., Chaturvedi, P. and Viridi, J.S. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans* its potential in fungal cell wall lysis. Appl. Bacteriol. 78 : 378-383.

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. 1995. New component of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol. Res. 99 : 440-441.

Harris, A.R. and Adkins, P.G. 1999. Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping – off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Biol. Control. 15 : 10-18.

Hebbar, K.P., Berge, O., Heulin, T. and Singh, S.P. 1991, Bacterial antagonists of sunflower. (Helianthis annus L.) fungal pathogens. Plant Soil 133: 131-140.

Herzog, A. 1964. The action of streptomycin on *Eacherichia coli* ribosomes. Arch. Int. Physiol. Biochem. 72 : 326-327.

Isono, K., Nagatsu, J., Kobinata, K., Sasaki, K. and Suzuki, S. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. Agric. Biol. Chem. 29 : 848-854.

Jones, C.R. and Samac, D.A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. Biol. Control 7 : 196-204.

Kaltenpoth, M. and Strohm, E. 2007. Life within insect antennae: Symbiotic bacteria protect wasp larvae against fungal infestation.Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 146 : 215–223

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopath. 44 : 693-695.

Kochutresiamma, J., Kothandaraman, R. and Jacob, M. 1988. Actionmycetes population of rubber growing soil and its antagonistic activity against *Phytophthora meadii* (Mc Rae). Indian. Nat. Rubb.Res. 1 : 27 – 30.

Kopperl, M.L.S. and Mitchell, D.J.1998. Selection of *Streptomyces* spp. with potential for biocontrol of *Fusarium oxysporum* on tomato. [On-line]. Available : http://www. ICPP98%20Paper%20Number%205_2_76. htm. [Accessed July 3, 2009]

Kutzner, H. J. 1981. The family Streptomytaceae. *In* The Prokaryotes – a handbook on habitats isolate and identification of bacteria. pp 2028 – 2030. Edited by Starr, M. P., Stolp, H., Truper., H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. Berlin : Springer.

Kwok, O.C.H., Fahy, P.C., Hoitink, H.A.J. and Kuter, G.A. 1987. Interaction between bacteria and *Trichoderma hamatum* in Suppression of Rhizoctonia Damping-off in bark compost media. Phytopathology. 77 :1206 - 1212.

Lea, H.H., Christine, A.L. and White, J.G. 1995. The potential for the biological control of basal rot of narcissus by *Streptomyces* sp. Crop Prot. 14 : 539-542.

Lechevalier, R., Acker, F., Corke, C.T., Haenseler, C.M. and Waksman, S.A. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. Mycologia 45 : 155-171.

Lechevalier, H.A. and Lechevalier, M.P. 1970. The Actinomycetales. Gustav Fischer, Jena.

Lee, H.B., Kim, Y., Kim, J.C., Choi, G.J., Park, S.H., Kim, C.J. and Jung, H.S. 2005. Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. Appl. Microbiol. 99 : 836-843.

Lee, J. Y. and Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal actinomycestes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48 : 407- 417.

Mahadevan, B. and Crawford, D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enz. Micro.Tech. 20 : 489- 493.

Mahmoud, Y.A.G., Ebrahim, M.K.H. and Aly, M.M. 2004. Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis fabae*. Turk J. Biot. 28 : 519-528.

McCarthy, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 46 : 145-163.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Prot. 25 : 468-475.

Muller, H., Further, R., Zahner, H. and Rast, D.M. 1981. Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. Arch. Microbiol. 130 : 195-197.

Muller, J.C., Toome, V., Pruess, D.L, Blount, J.F. and Weigele, M. 1983. A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus.* III. Abs. Antibiot. (Tokyo). 36 : 217-225.

Neeno, E.C., Kinkel, L.L. and Schottel, J.L. 2001. Competition and antibiosis in the control of potato scab. Can. Microbiol. 47 : 332-340.

Neugebauer, E., Gamache, B., Dery, C.V. and Brzezinski, R. 1991. Chitinolytic properties of *Streptomyces lividans*. Arch. Microbiol. 156 : 192-197.

Noronha, E.F. and Ulhoa, C.J. 2000. Characterization of a 29-KDa β-1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum.* Fed. Eur. Microbiol. Soc. 183 : 119-123.

Okazaki, K. and Tagawa, K. 1991. Purification and properties of chitinase from *Streptomyces cinereor.* Ferment. Bioeng. 71 : 237-241.

Pang, X., Zhou, X., Sun, Y. and Deng, Z. 2002. Physical map of *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 deduced by analysis of overlapping large chromosomal deletion. Bacteriol. 184 : 1958-1965.

Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3605-3613.

Prabavathy, V.R., Mathivanan, N. and Murugesan, K. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of riceusing antifungal metabolite sproduced by *Streptomyces* sp.PM5. Biol. Control 39 : 313-319.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Biol. Sci. 4 : 330-337.

Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii.* Annu. Rev. Phytopathol. 23. : 97-129.

Rong, Y. W. and Ming, H. C.1995. Identification of the *Streptomyces* strain KS3-5. Bot. Bull. Acad. Sin. 36 : 201-205.

Rothrock, C.S. and Gottlieb, D. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected Streptomyces species to two soil – borne plant pathogens. Antibiot. 34 :830-835.

Sabaratman, S. and Traquair, J. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biol. Control 23 : 245-253

Sadeghi, A., Hessan, A.R., Askari, H., Aghighi, S. and Bonjar, G.H.S. 2006. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. Biol. Sci. 9 : 904-910.

Sasarman, A., Horodniceanu, T., Gritaenco, V., Antohi, M. and Surdeanu, M. 1964. Properties of dwarf colonies of *Streptomyces typhiumurium* obtained with the use of neomycin and streptomycin. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 23 : 911-918.

Sato, K. 1983. Biological properties of kasugamycin, *In* N. Takahashi *et al.* (eds). Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment. (Vol. 2), pp. 293-299. Natural Products, Pergamon Press, Oxford.

Selman, A.W. 1967. The actinomyces. New York : The Ronald press company.

Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. 1993. Chitinolytic enzymes : their contribution to basic and applied research. Micro. Biot. 9 : 468-475.

Shimizu, M., Meguro, A., Hasegawa., S., Nishimura, T. and Kunoh, H. 2006. Disease resistance induced by nonantagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue-cultured seedlings of rhododendron. Gen. Plant Pathol. 72 : 351-354

Skujins, J.J., Potgieter, H.J. and Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and β-1,3-glucanase. Arch. Biochem. Biophys. 11 : 358-364.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In* Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. pp. 1 – 27. C. A.B. International. Wallingford.

Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C. and Salas, J.A. 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Mol. Gen. Genet. 242 : 358-362.

Tachibana, K. and Kaneko, K. 1986. Development of a new herbicide, Bialaphos. Pestic. Sci. 11 : 297-304.

Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Suzuki, M., Miura, K. and Momose, H. 1997. Molecular phylogenetic cauterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. Mol. Environ. 44 : 542-551.

Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H. and Yonehara, H. 1958. Blasticin S, a new antibiotic. Antibiot (Tokyo). Series A 11 : 1-5.

Tan., H. M., Cao, L. X., He, Z. F., Su, G. J., Lin, B. and Zhou, S. N. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum*. Micro. Biot. 22 : 1275-1280.

Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Hassani, H.A., Kenna, F. and Hardy, G.E. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathol. 49 : 573-558.

Thummabenjapone, P. and Pachinburavan, A. 2002. *Streptomyces* potential biological control agent for bacterial fruit blotch and gummy stem blight disease of cucurbits. The First International Conferences on Tropical and Subtropical Plant Diseases. November 5-8. The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand. pp. 6-8.

Tokala, R.K., Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., Bailey, J. F. and Morra, M. J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68 : 2161– 2171.

Tresner, H.D., Davies, M.C. and Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. Bacteriol. 81 : 70-80.

Tronsmo, A. and Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-β-D-glucosaminidase,chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. Anal. Biochem. 208 : 74-79.

Wan, M., Li , G., Zhang , J., Jiang, D. and Huang, H.C. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1on control of plant fungal diseases. Biol. control 46 : 552-559.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 importance of chitinase A1 in chitin degradation. Bacteriol. 172 : 4017-4022.

Wateewuthajarn, K. and Pinphanichakarn, P. 2000. Purification and characterization of xylanases from *Streptomyces* sp. PC22. Sci. Rese. CU. 25 : 245-256.

West, P.A. and Cowell, R.R. 1984. Identification classification of *vibrionaceae* – an overview. 285-363. In R.R. Cowell, *Vibrio*s in the Environment. New York. John Wliey and Sons, Inc.

Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathol. 76 : 518- 521.

Williams, S.T. 1982. Are antibiotics produced in soil Pedobiologia. 23 :427-435

Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces* spp. *In* S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds). pp. 2452-2492 Bergey's Manual of Determinative Bacteria. (Vol 4). Williams & Wilkins : Baltimore.

Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. Antibiot. (Tokyo) 15 : 200-209.

Xiao, K., Kinkel, L.L and Samac, D.A. 2001. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces.* Biol. Control 23 : 285-295.

Yaeram, C., Thummabenjapone, P. and Pachinbruavan, A. 2006. Suitable medium for increasing biomass of antagonistic *Streptomyces* spp. against bacterial fruit blotch disease of watermelon. Khon Kaen Agric. 34 : 12-19.

Yuan, W.M. and Crawford, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3119-3128.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1. Glucose yeast- extract malt -extract agar (GYMA)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Agar	17	กรัม

ละลาย ส่วนประกอบทั้งหมด ลงในน้ำกลั่นปริมาตร500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

2. Glucose yeast- extract malt -extract broth (GYMB)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม

ละลาย ส่วนประกอบทั้งหมด ลงในน้ำกลั่นปริมาตร500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

3. Nutrient ager (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20นาที

4. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

5. Tetra zolium chlium chloride agar (TZC)

Peptone	10.0	กรัม
Casein hydrolysate	1.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	17.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

Tetra zolium chlium chloride (Stock Solution) 0.5 กรัมผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร ดูดมาใช้ 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

6. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

7. **M9 medium agar ผสม 0.05% Lichenan**

Mannitol	10	กรัม
Peptone	2	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม

ละลาย lichenan 0.5 กรัม และส่วนประกอบทั้งหมดของ M9 ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 500มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

10. M9 medium agar ผสม 2.4% Colloidal chitin

Mannitol	10	กรัม
Peptone	2	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม

ละลาย Colloidal chitin 24 กรัม และส่วนประกอบทั้งหมดของ M9 ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

การเตรียม Colloidal chitin (ตามวิธีการของ West and Colwell, 1984)

ละลายไคตินผง 20 กรัม ลงใน 50 % ของ H_2SO_4 ในปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้เติมลงในน้ำที่กำจัดอิออน (deionzed water) ที่เย็นจัดปริมาตร 10 ลิตร แล้วปรับส่วนผสมให้เป็นกลาง (pH 7) ด้วยสารละลาย 10 NaOH จนเกิดเป็นตะกอนขึ้นและตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิเย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้ตะกอน และล้างตะกอนที่ได้ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว (6,000 รอบต่อนาที) ด้วยน้ำกลั่นอีกประมาณ 3 ครั้ง สุดท้ายนำตะกอนมาปรับปริมาตรให้มีตะกอนอยู่ 10 % w/v

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียม McFarland Standard

barium chloride 0.05 M $BaCl_2$ (1.175 % w/v $BaCl_2 . 2H_2O$)

sulfuric acid 0.36 N H_2SO_4 (1 % v/v)

ตารางที่ผนวกที่ 1 การเตรียม McFarland Standard เบอร์ต่าง ๆ

No.	Barium chloride (ml)	Sulfuric acid (ml)	x 10^8 cfu/ml
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.10	9.90	3
2	0.20	9.80	6
3	0.30	9.70	9
4	0.40	9.60	12
5	0.50	9.50	15
6	0.60	9.40	18
7	0.70	9.30	21
8	0.80	9.20	24
9	0.90	9.10	27
10	1.00	9.00	30

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการสร้างเอนไซม์ β-1, 3 glucanase

Source	df	SS	MS	F
Treatment	2	12.507	6.253	62.841**
Error	9	0.896	0.100	
Total	11	32.656		

C.V. 2.10%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการสร้างเอนไซม์ chitinase

Source	df	SS	MS	F
Treatment	2	4.727	2.363	202.186**
Error	9	0.105	0.120	
Total	11	14.195		

C.V. 3.18%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 3 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens* ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	0.116	0.745	3.179	6	0.019	5.6300	1.77113	2.0537	9.2062

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	2.534	.162	6.093	6	.001	13.25000	2.17466	8.8589	17.6410

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *S. rolfsii* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	8.795	.025	8.429	6	.000	12.89000	1.52930	9.1479	16.6320

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 6 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R .solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens* ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	4.585	.076	12.56	6	.000	2.10000	.16708	1.7626	2.4373

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 7 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	7.737	.032	47.04	6	.000	2.24000	.04761	2.1438	2.3361

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ T-test การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 2 ด้วยวิธีการกรองและการนึ่ง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	91% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
A-B	11.30	.015	57.63	6	.000	2.62000	.04546	2.5282	2.71179

A-B : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง – น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกต้นพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.และ *Trichoderma* spp. ก่อนการเพาะ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	1899.116	474.779	119.180**
Error	15	593756	3.384	
Total	19	156448.398		

C.V. 8.41%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวลำต้น ของต้นพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.และ *Trichoderma* spp. ก่อนการเพาะ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	1475.152	368.788	248.737**
Error	15	22.240	1.483	
Total	19	7907.023		

C.V. 10.34%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวราก ของต้นพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.และ *Trichoderma* spp. ก่อนการเพาะ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	3251.037	812.759	86.921**
Error	15	187.011	9.351	
Total	19	17171.544		

C.V. 7.51%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 12 วิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักสด ของต้นพริกอายุ 10 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.และ *Trichoderma* spp. ก่อนการเพาะ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	1.384	0.346	9791.584**
Error	15	0.001	3.53	
Total	19	26.886		

C.V. 10.86%

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 13 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนต้นที่งอกและรอดตาย เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และเชื้อ *T. harzianum* ก่อนการเพาะลงในดิน (ปลูกเชื้อ *S. rolfsii*)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	1792.708	358.542	52.363**
Error	18	123.250	6.847	
Total	23	24181.000		

C.V. 10.09 %

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนต้นที่งอกและรอดตาย เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และเชื้อ *T. harzianum* ก่อนการเพาะลงในดิน(ปลูกเชื้อ *R. solanacear*um)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	3937.708	787.542	142.829**
Error	18	99.250	5.514	
Total	23	21157.00		

C.V. 9.78 %

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนต้นที่งอกและรอดตาย เมื่อคลุกเมล็ดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และเชื้อ *T. harzianum* ก่อนการเพาะลงในดิน (2 โรคร่วมกัน)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	720.833	144.167	123.571**
Error	18	21.000	1.167	
Total	23	3346.000		

C.V. 4.50 %

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 16 วิเคราะห์ความแปรปรวนศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับการใช้สารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่าและโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูในสภาพแปลงทดลอง (เปอร์เซ็นต์ต้นสมบูรณ์)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	9337.500	1867.500	220.426**
Error	18	152.500	8.472	
Total	23	34840.00		

C.V. 2.0 %

*แตกต่างทางสถิติที่ p<0.01

ตารางภาคผนวกที่ 17 วิเคราะห์ความแปรปรวนศักยภาพของเชื้อ *S. mycarofaciens*, *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 และ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับการใช้สารคาร์บอกซินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต ในการควบคุมโรคราก และโคนเน่าและโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนูในสภาพแปลงทดลอง (ผลผลิต กิโลกรัม/ไร่)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	3682.335	736.467	2.756**
Error	18	4810.205	267.234	
Total	23	26238.909		

C.V. 1.50 %

*แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.01$

ภาคผนวก ง

การเทียบเคียงโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : SS-2-243

---

528 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

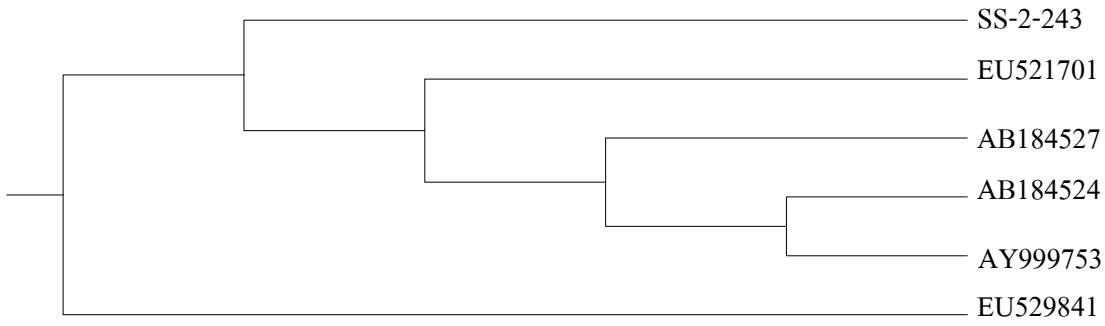
Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
EU521701	Streptomyces mycarofaciens isolate S71-1	953	0.0
AB184527	Streptomyces albospinus strain: NBRC 13846	953	0.0
AB184524	Streptomyces propurpuratus strain: NBRC 13842	953	0.0
AY999753	Streptomyces albospinus strain JCM 3399	953	0.0
EU529841	Streptomyces sp. BS-112	948	0.0

Query ID	lcl|64611
Description	RM-2-180
Molecule type	nucleic acid
Query Length	528
Database Name	nr
Description	All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program	BLASTN 2.2.20+

Reference
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

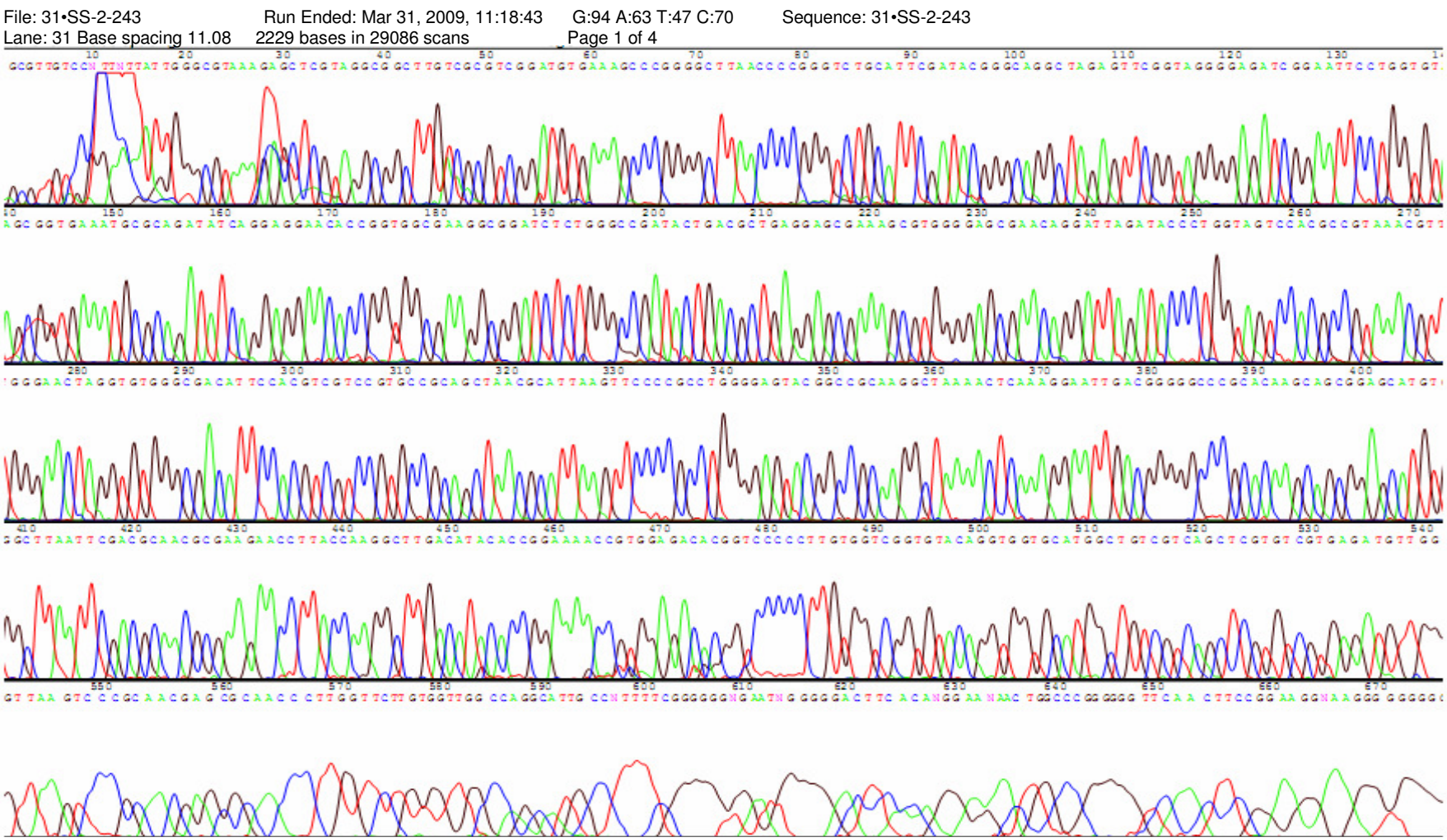
Query Length 528
>SS-2-243
GGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGG
CAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC
TAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCG
GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG
AAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)




```
>gb|EU521701.1|  Streptomyces mycarofaciens isolate S71-1 16S ribosomal RNA
gene,
partial sequence
Length=1462

 Score =  953 bits (1056),  Expect = 0.0
 Identities = 528/528 (100%), Gaps = 0/528 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  40  GGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGG  99
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  518 GGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGG  577

Query  100 CAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA  159
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  578 CAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA  637

Query  160 TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA  219
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  638 TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA  697

Query  220 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC  279
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  698 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC  757

Query  280 TAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCT  339
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  758 TAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCT  817

Query  340 GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCG  399
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  818 GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCG  877

Query  400 GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG  459
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  878 GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG  937

Query  460 AAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC  519
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  938 AAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC  997
```

```
Query  520   AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  567
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  998   AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  1045
```



รูปผนวด ง1 การเทียบเคียงแบคทีเรีย *Streptomyces mycarofaciens* สายพันธุ์ SS-2-243 โดยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : RL-1-178

---

532 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
DQ375790	Candidatus Streptomyces philanthi biovar histrio	960	0.0
DQ375782	Candidatus Streptomyces philanthi biovar capensis	960	0.0
AB184627	Streptomyces griseus subsp. formicus strain: NBRC14886	960	0.0
FJ486315	Streptomyces luteoverticillatus strain HBUM173698	955	0.0
DQ442524	Streptomyces lusitanus strain NRRL B-5637T	955	0.0

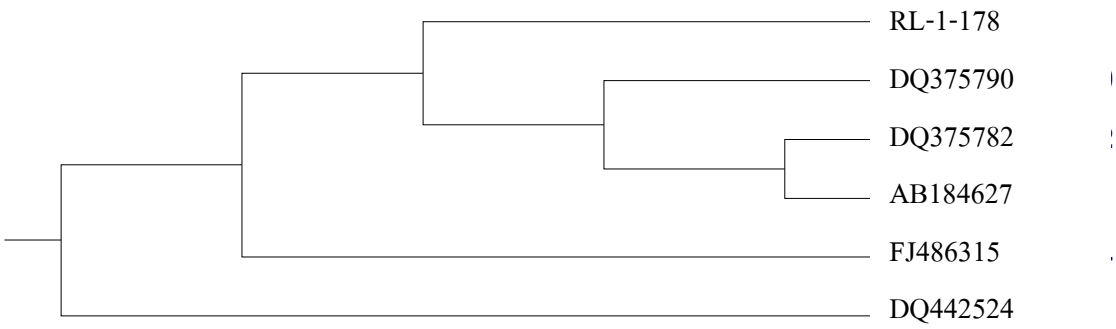
Query ID	lcl|50945
Description	RL-1-178
Molecule type	nucleic acid
Query Length	532
Database Name	nr
Description	All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program	BLASTN 2.2.20+

Reference
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query Length 532
>RL-1-178

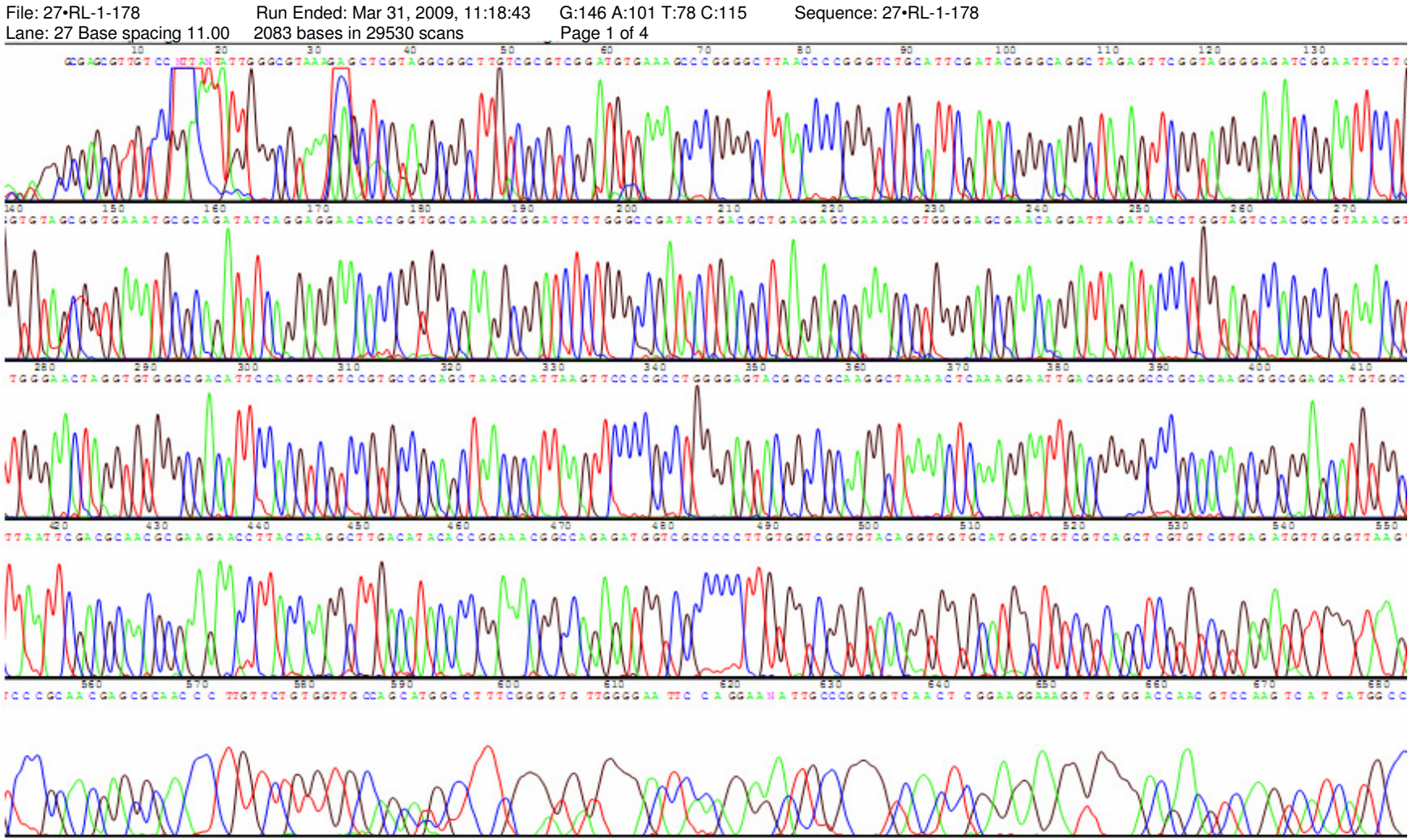
AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA
CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG
GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA
CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)




```
>gb|DQ375790.1|  Candidatus Streptomyces philanthi biovar histrio 16S
ribosomal
RNA gene, partial sequence
Length=1313

 Score =  960 bits (1064),  Expect = 0.0
 Identities = 532/532 (100%), Gaps = 0/532 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  40  AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA  99
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441 AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA  500

Query  100 CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  159
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  501 CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  560

Query  160 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA  219
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA  620

Query  220 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG  279
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  621 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG  680

Query  280 GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC  339
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681 GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC  740

Query  340 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  399
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  741 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  800

Query  400 GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA  459
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  801 GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA  860
```

```
Query  460 CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT  519
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  861 CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT  920

Query  520 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  571
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  921 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  972
```



รูปผนวค ง2 การเทียบเคียงแบคทีเรีย *Streptomyces philanthi* สายพันธุ์ RL-1-178 โดยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : RM-1-138

---

532 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

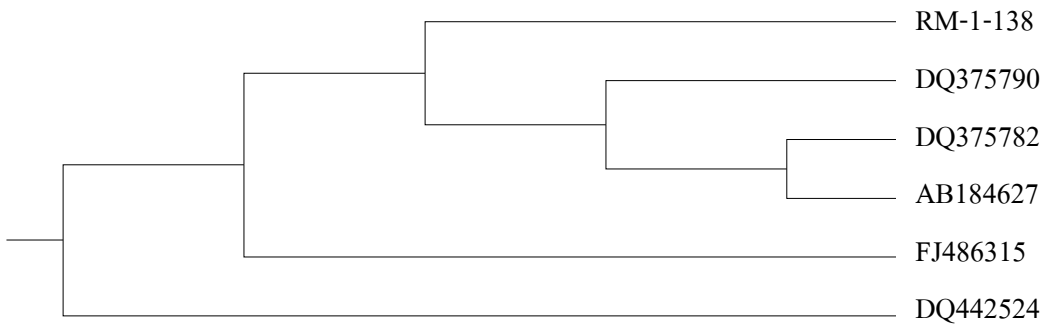
Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
DQ375790	Candidatus Streptomyces philanthi biovar histrio	960	0.0
DQ375782	Candidatus Streptomyces philanthi biovar capensis	960	0.0
AB184627	Streptomyces griseus subsp. formicus strain: NBRC14886	960	0.0
FJ486315	Streptomyces luteoverticillatus strain HBUM173698	955	0.0
DQ442524	Streptomyces lusitanus strain NRRL B-5637T	955	0.0

Query ID	lcl|50945
Description	RM-1-138
Molecule type	nucleic acid
Query Length	532
Database Name	nr
Description	All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program	BLASTN 2.2.20+

Reference
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

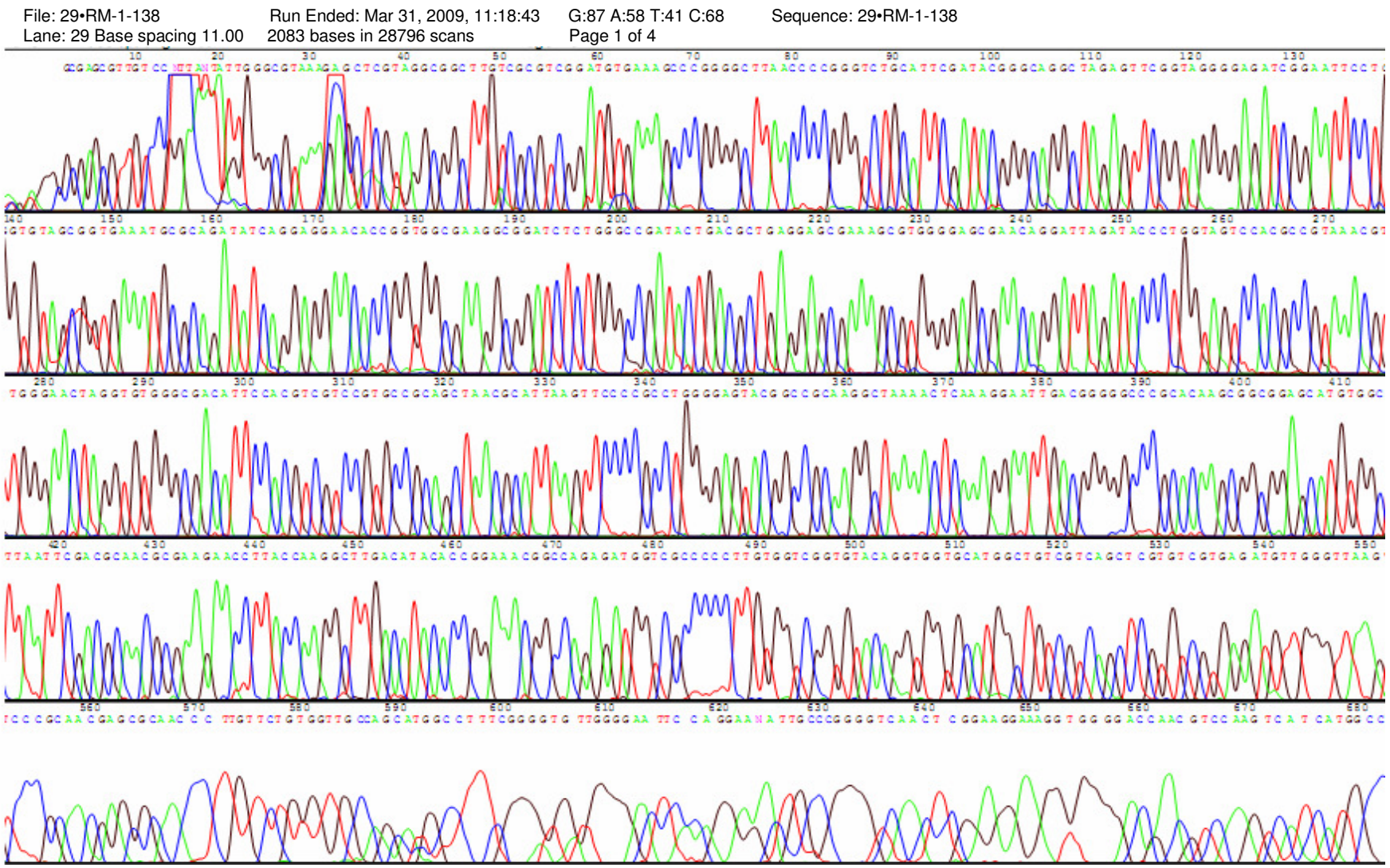
Query Length 532
>RM-1-138
AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA
CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG
GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA
CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)




```
>gb|DQ375790.1|  Candidatus Streptomyces philanthi biovar histrio 16S
ribosomal
RNA gene, partial sequence
Length=1313

 Score =  960 bits (1064),  Expect = 0.0
 Identities = 532/532 (100%), Gaps = 0/532 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  40  AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA  99
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441 AGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATA  500

Query  100 CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  159
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  501 CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  560

Query  160 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA  219
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA  620

Query  220 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG  279
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  621 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGG  680

Query  280 GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC  339
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681 GAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC  740

Query  340 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  399
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  741 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  800
```

```
Query  400 GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA  459
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  801 GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA  860

Query  460 CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT  519
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  861 CCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT  920

Query  520 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  571
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  921 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  972
```



รูปผนวก ง3 การเทียบเคียงแบคทีเรีย *Streptomyces philanthi* สายพันธุ์ RM-1-138 โดยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายไสว บัวแก้ว

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620031

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Boukaew, S., Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2009. Screening of antagonistic *Streptomyces* spp. for controlling *Sclerotium rolfsii* and *Ralstonia solanacearum* on chili pepper. 4th Annual Meeting of Thai Mycological Association (TMA) and Mycology Conference in Thailand. 24 October 2009. Maejo University.

Boukaew, S., Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2009. Biological control capacities of *Streptomyces mycarofaciens* and *S. philanthi* against *Sclerotium rolfsii* , a causal agent of root and stem rot disease of chilli pepper. Asia Mycology Congress (AMC) 2009 and the 11th International Marine and Freshwater Mycological Symposium (IMFMS). 15-19 November 2009. National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan.