



การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมเชื้อ  
*Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ที่เป็นสาเหตุของเชื้อก่อโรคในทุเรียน

อภิญา บุญเจียน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา



455482475

BUU-IThesis 61910022-thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96



61910022\_455482475

การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมเชื้อ  
*Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ที่เป็นสาเหตุของเชื้อก่อโรคราในทุเรียน

อภิญา บุญเขียน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา



45482475

BUU-IThesis 61910022 thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96

SCREENING OF ACTINOMYCETES FROM SOIL IN AGRICULTURAL AREA TO  
DEVELOP A BIOLOGICAL CONTROL AGENT FOR *PHYTOPHTHORA* SP. *FUSARIUM* SP.  
AND *LASIODIPLODIA* SP. THE CAUSAL AGENT OF DISEASES IN DURIAN

APINYA BUNKHEAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR MASTER DEGREE OF ENGINEERING  
IN BIOENGINEERING  
FACULTY OF ENGINEERING  
BURAPHA UNIVERSITY

2023

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY



45482475

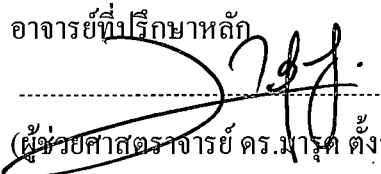
BUU .IThesis 61910022 thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96

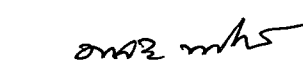
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ อภิญญา บุญเจียน ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

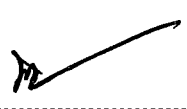
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

  
.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุต ตั้งวัฒนาชูลีพร)

 ประธาน  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. มาลัย ทวีโชติภักดิ์)  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุต ตั้งวัฒนาชูลีพร)  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์)  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ แจ่มเยี่ยม)

  
.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นยศ คุรุกิจโกศล)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย  
บูรพา

  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นุจรี ไชยมงคล)  
วันที่ 25 เดือน 12 พ.ศ. 2566

61910022: สาขาวิชา: วิศวกรรมชีวภาพ; วศ.ม. (วิศวกรรมชีวภาพ)

คำสำคัญ: เชื้อราก่อโรค/แอคติโนมัยซีท/ชีวภัณฑ์

อภิญญา บุญเขียน : การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ที่เป็นสาเหตุของเชื้อก่อโรคในทุเรียน. (SCREENING OF ACTINOMYCETES FROM SOIL IN AGRICULTURAL AREA TO DEVELOP A BIOLOGICAL CONTROL AGENT FOR *PHYTOPHTHORA* SP. *FUSARIUM* SP. AND *LASIODIPLODIA* SP. THE CAUSAL AGENT OF DISEASES IN DURIAN) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: มารุต ตั้งวัฒนาชูลิพร ปี พ.ศ. 2566.

ปัญหาของการเพาะปลูกทุเรียน อาทิ โรครากเน่า โคนเน่า มักมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora*, *Fusarium* และ *Lasiodiplodia* เมื่อทำการแยกเชื้อราจากรอยโรคของต้นทุเรียน ศึกษาลักษณะทางมหัศจรรย์ จุลลักษณะ และศึกษาพันธุศาสตร์ของเชื้อบริเวณยีนส์ ITS สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อราในจีนัส *Phytophthora* Taxon, *Fusarium decemcellulare* และ *Lasiodiplodia theobromae* ต่อมาได้รวบรวมตัวอย่างดินจำนวน 50 ตัวอย่าง จากจังหวัดจันทบุรี ตราดและชลบุรี เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท ได้แอคติโนมัยซีทจำนวน 160 ไอโซเลท จากนั้นนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะ พบว่ามีแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินจำนวน 5 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช โดยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ได้แก่ *Phytophthora* taxon เท่ากับ 77.77 *Fusarium decemcellulare* 88.88 และ *Lasiodiplodia theobromae* 88.85 ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อปฏิชีวนะทั้ง 5 ไอโซเลทไปศึกษาลำดับเบส พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces cavourensis* ต่อมาเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทถูกทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ พบว่าทุกไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส อะไมเลส และมี 3 ไอโซเลท ที่แสดงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตสและแคตาเลส อย่างไรก็ตามทุกไอโซเลทไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลทนี้ สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ส่งเสริมการเจริญของพืช อีกทั้งพบว่า กระบวนการผลิตทำได้ง่าย ไม่พึ่งพาเครื่องมือราคาสูง และลดค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาที่จะตามมาในอนาคต

61910022: MAJOR: BIOENGINEERING; M.Eng. (BIOENGINEERING)

KEYWORDS: PLANT PATHOGENS/ACTINOMYCETES/BIOCONTROL AGENT

APINYA BUNKHEAN : SCREENING OF ACTINOMYCETES FROM SOIL IN AGRICULTURAL AREA TO DEVELOP A BIOLOGICAL CONTROL AGENT FOR *PHYTOPHTHORA* SP. *FUSARIUM* SP. AND *LASIODIPLODIA* SP. THE CAUSAL AGENT OF DISEASES IN DURIAN. ADVISORY COMMITTEE: MARUT TANGWATTANACHULEEPORN, 2023.

The major problem of durian cultivation are root and stem rot disease caused by *Phytophthora*, *Fusarium* and *Lasiodiplodia*. Therefore, the pathogens were isolated from durian tree which infected, identified, and were studied on morphological and molecular analysis based on internal transcribed spacer (ITS)-nrDNA sequence. Tree isolates were confirmed as *Phytophthora taxon*, *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae*. Fifty soil samples were collected from 3 different sites located in Chanthaburi Province, Trat Province and Chonburi Province. All 160 *Actinomyces* isolates from soil were screened for antagonistic activity among them, the results shown that only 5 isolates were strongest inhibited the mycelium growth of phyto-pathogens such as *P. taxon*, *F. decemcellulare* and *L. theobromae* (77.77, 88.88, 85.88 % respectively). Then the result of sequencing analysis shown that those antagonistic are *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces silaceus* and *Streptomyces cavourensis*. A total of 5 antagonistic bacteria isolates were tested for their enzyme production. The results showed 3 isolates have ability to produce phosphatase, urease and amylase but unavailable to produce cellulase enzyme and 3 isolates have ability to produce catalase enzyme. Selection of effective antagonistic bacteria 5 isolates for controlling of all pathogen and the ability to produce enzymes in vitro to generate the wettable powder from a part of spores. The results showed that the wettable powder formulation were effective, production process easy to handle, no rely on expensive tools and reduce preventive maintenance cost.

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในระดับมหาบัณฑิตของข้าพเจ้านี้ได้รับการสนับสนุนทุนผู้ช่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา รุ่นที่ ๑ ประจำปีภาคปลาย ปีการศึกษา ๒๕๖๒ (ทุนผู้ช่วยวิจัยประเภทที่ ๒) ตามประกาศ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ ๑๘๐/๒๕๖๒

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร. มารุต ตั้งวัฒนาสุทธิพร อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆมาโดยตลอด ระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำหลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ และคณาจารย์คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่กรุณาให้การสั่งสอนทั้งความรู้ด้านทฤษฎี ปฏิบัติการทางเคมีและจุลชีววิทยา รวมถึงสร้างแรงผลักดันให้เกิดความวิริยะอุตสาหะต่อการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์จนบรรลุผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมชาย บุญเขียน และคุณแม่ไพรัชต์ ทรงกลิ่น รวมทั้งเพื่อน นิสิตปริญญาโท ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บुरพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่าทุกวันนี้

อภิญญา บุญเขียน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง .....	ฌ
สารบัญภาพ .....	ญ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
3. สมมติฐานของการวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	4
5. ขอบเขตของการทดลอง.....	4
บทที่ 2 .....	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ลักษณะทั่วไปของทุเรียน .....	6
2. ทุเรียนและความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย.....	9
3. โรคที่สำคัญของทุเรียน .....	11
4. การป้องกันและกำจัดโรคที่เกิดในทุเรียน.....	21
5. ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท .....	23
6. ความสำคัญของแอกติโนมัยซีทต่อพืช .....	26



455482475

BUU\_1Thesis 61910022 thesis / recv : 27042566 11:35:34 / seq : 96

7. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของสารชีวภัณฑ์ .....	27
8. ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	28
บทที่ 3 .....	33
วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี .....	33
2. วิธีดำเนินการวิจัย .....	34
บทที่ 4 .....	42
ผลการทดลอง.....	42
1. การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากต้นทุเรียน .....	42
2. การคัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทจากดินในพื้นที่การเกษตร.....	52
3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอสคิโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค .....	57
4. การศึกษาผลของแสงยูวี กรด-ด่าง และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการเจริญ.....	61
5. การจำแนกชนิดของแอสคิโนมัยซีทด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA .....	66
6. การศึกษาคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์บางชนิด.....	67
7. การพัฒนาชีวภัณฑ์จากแอสคิโนมัยซีท .....	70
บทที่ 5.....	74
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง .....	74
บรรณานุกรม.....	77
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	93



455482475

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายละเอียดการใส่ปุ๋ยและให้น้ำต้นทุเรียนในแต่ละช่วงการเจริญ .....	7
ตารางที่ 2 รายละเอียดของแหล่งที่มาของตัวอย่าง โรครากเน่าโคนเน่าจากต้นทุเรียน .....	43
ตารางที่ 3 จำนวนไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างรอยโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน .....	45
ตารางที่ 4 ผลการแยกเชื้อราก่อโรคจากตัวอย่างรอยโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน .....	51
ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบการจำแนกเชื้อราทั้งสามชนิดด้วยวิธีต่าง ๆ .....	52
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินในพื้นที่เกษตรซึ่งเจริญบนอาหาร ISP-2 มีอายุ 7 วัน .....	54
ตารางที่ 7 สรุปจำนวนแอกติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช .....	61
ตารางที่ 8 ผลของแสงยูวีต่อเชื้อแอกติโนมัยซีท .....	63
ตารางที่ 9 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเชื้อแอกติโนมัยซีท .....	64
ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อเชื้อแอกติโนมัยซีท .....	66
ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยวิธี Phenotypic identification, MALDI-TOF MS Identification และ 16S rRNA gene sequence .....	67
ตารางที่ 12 ความสามารถของเชื้อ Super-Actinomyces ในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ .....	70
ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของสูตรชีวภัณฑ์รูปแบบผงที่ผลิตจากเชื้อ Super-Actinomyces .....	73



455482475

BUU\_1Thesis 61910022 thesis / rev: 27042566 11:35:34 / seq: 96

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพรวมการศึกษาวิจัย .....	5
ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของต้นทุเรียน .....	8
ภาพที่ 3 องค์ประกอบของช่อดอกทุเรียน .....	8
ภาพที่ 4 องค์ประกอบทั่วไปของผลทุเรียน .....	9
ภาพที่ 5 ลักษณะอาการของรอยโรคที่เกิดจากเชื้อรา <i>Phytophthora</i> .....	14
ภาพที่ 6 ลักษณะของโคโลนี Sporangium และ Chlamydospore ของเชื้อรา <i>Phytophthora</i> .....	15
ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp.....	17
ภาพที่ 8 ลักษณะของสปอร์เชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> .....	17
ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA.....	19
ภาพที่ 10 โครงสร้างสปอร์ของเชื้อรา <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	20
ภาพที่ 11 สัดส่วนค่าใช้จ่ายต้นทุนในการผลิตทุเรียนต่อไร่ .....	22
ภาพที่ 12 การฉีดยาเข้าลำต้นเพื่อรักษาอาการเน่าของลำต้นและทุเรียนยืนต้นตาย.....	22
ภาพที่ 13 ลักษณะสปอร์ของแอกติโนมัยซีทในสกุล <i>Streptomyces</i> .....	25
ภาพที่ 14 ตัวอย่างของสารแอนติไบโอติกที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีท .....	26
ภาพที่ 15 ภาพรวมบทบาทของแอกติโนมัยซีทในดินต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช .....	27
ภาพที่ 16 ขั้นตอนการประสานงานและการยืนยันตำแหน่งของรอยโรค.....	34
ภาพที่ 17 แผนภาพการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ Super-Actinomyces .....	38
ภาพที่ 18 แผนภาพการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของ Super-Actinomyces .....	39
ภาพที่ 19 การเก็บตัวอย่างรอยโรคทุเรียนบริเวณที่ปรากฏอาการเน่า.....	42
ภาพที่ 20 รอยโรคที่เกิดบริเวณส่วนต่าง ๆ ของทุเรียน .....	43



455482475

BUU\_1Thesis 61910022 thesis / recv : 27042566 11:35:34 / seq: 96

ภาพที่ 21 การแยกเชื้อ *Phytophthora* spp. *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia* spp. ด้วยวิธี Tissue transplanting..... 45

ภาพที่ 22 ลักษณะมหัศจรรย์ จุลสังฐาน และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophthora*..... 48

ภาพที่ 23 ลักษณะมหัศจรรย์ จุลสังฐาน และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. G1S12-Fu..... 49

ภาพที่ 24 ลักษณะมหัศจรรย์และจุลสังฐานของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. Lt-G1S15..... 50

ภาพที่ 25 ลักษณะของเชื้อที่ปรากฏบนอาหาร ISP-2 agar + cycloheximide + nalidixic acid เมื่อป้อนาน 7 วัน ..... 53

ภาพที่ 26 การทดสอบประสิทธิภาพแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* spp. G1S12-Phy ..... 58

ภาพที่ 27 การทดสอบประสิทธิภาพแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G2S3-Fu..... 58

ภาพที่ 28 การทดสอบประสิทธิภาพแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15..... 59

ภาพที่ 29 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Super-Actinomyces..... 59

ภาพที่ 30 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* taxon ..... 60

ภาพที่ 31 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G1S12-Fu..... 60

ภาพที่ 32 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ..... 61

ภาพที่ 33 ผลของแสงยูวีต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท ..... 62

ภาพที่ 34 ผลของความเป็นกรด-ด่าง 5, 6, 7, 8 และ 9 ต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท ..... 64

ภาพที่ 35 ผลของอุณหภูมิ 25, 30, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ต่อเชื้อแอคติโนมัยซีท ..... 65

ภาพที่ 36 ผลการศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อ Super-Actinomyces..... 67

ภาพที่ 37 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลล์ลูโคสของเชื้อ Super-Actinomyces ที่ 5 ไอโซเลท ..... 68

ภาพที่ 38 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ Super-Actinomyces ที่ 5 ไอโซเลท ..... 69

ภาพที่ 39 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ Super-Actinomyces. 69

ภาพที่ 40 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของเชื้อ Super-Actinomyces. 70

ภาพที่ 41 ผลการนับจำนวนโคโลนีเพื่อยืนยันปริมาณของเชื้อ Super-Actinomyces..... 71

ภาพที่ 42 การเก็บเกี่ยวสปอร์และเส้นใยอากาศเพื่อใช้ผลิตชีวภัณฑ์ผงพร้อมใช้..... 72

ภาพที่ 43 บรรจุภัณฑ์และการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์รวม ..... 73



455482475

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทุเรียนเป็นไม้ยืนต้นที่ทรงพุ่มแผ่ในบริเวณกว้าง ไม่มีการผลัดใบ สามารถเจริญและให้ผลผลิตได้ดีในพื้นที่อากาศร้อนชื้น ปริมาณน้ำฝนอยู่ระหว่าง 1,600 ถึง 3,000 มิลลิเมตร/ปี มีช่วงแล้งต่อเนื่องน้อยกว่า 3 ปี และ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 30 มีแหล่งน้ำเพียงพอโดยประมาณ 600 ถึง 800 ลูกบาศก์เมตรต่อไร่ และมีสารละลายเกลือไม่มากกว่า 1,400 มิลลิโมล ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและให้ผลผลิตของทุเรียนคือดิน สภาพพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกต้องมีความอุดมสมบูรณ์สูง มีคุณสมบัติระบายน้ำได้ดี หน้าดินบริเวณลาดชันจะต้องลึกมากกว่า 50 เซนติเมตร และมีความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 5.5 ถึง 6.5 โดยความสูงของต้นทุเรียนอายุ 10 – 30 ปี เฉลี่ยอยู่ที่ 12 – 30 เมตร ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการขยายพันธุ์ พบว่าทุเรียนที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะสามารถสูงได้ถึง 40 เมตร (แสวง ภูศิริ 2530) อย่างไรก็ตามประเทศไทยถือว่าเป็นแหล่งเพาะปลูกทุเรียนมากแห่งหนึ่งของโลกและมีความหลากหลายของสายพันธุ์ สายพันธุ์ทุเรียนที่ได้รับความนิยมปลูกในประเทศไทย และเป็นพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการค้า ได้แก่ หมอนทอง ชะนี ก้านยาว และกระดุมทอง เป็นต้น ซึ่งทุเรียนเหล่านี้สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ด ทาบกิ่ง ติดตา หรือใช้วิธีการเสียบยอด ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกทุเรียนมากที่สุดในภาคตะวันออก อาทิ จันทบุรี ระยอง และตราด รองลงมาคือพื้นที่ในแถบภาคใต้ของไทยอย่าง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และกระบี่ (กรมวิชาการเกษตร) เมื่อคำนึงถึงรายได้ปัจจุบันที่เกิดจากผลผลิตทุเรียนในรูปแบบที่เป็นผลสดพบว่ามีมูลค่าสูงขึ้นและส่งผลกระทบต่อบทบาทของระบบเศรษฐกิจมากยิ่งขึ้นจากการบริโภคภายในประเทศ ตลอดจนการส่งออกทุเรียนสดไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก และสร้างรายได้ให้แก่ประเทศในปี 2557 คิดเป็นมูลค่า 9,000 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องกระทั่งปี 2563 ซึ่งมีมูลค่าเท่ากับ 44,576 ล้านบาท ไม่เพียงเท่านั้นยังมีการส่งออกทุเรียนแช่แข็งและแปรรูปของไทยยังคงติดอยู่อันดับที่ 1 ของโลก และมีมูลค่าโดยรวมอยู่ที่ 46,960.08 ล้านบาท ในไตรมาสแรกของปี 2564 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2564) แม้ว่าแนวโน้มการส่งออกทุเรียนไทยจะสร้างรายได้แก่ประเทศได้อย่างมหาศาล แต่ในขณะเดียวกันเกษตรกรผู้เพาะปลูกทุเรียนยังคงเผชิญกับปัญหาภัยแล้งที่สร้างผลกระทบต่อ การเพาะปลูกทุเรียนอยู่เสมอ และปัญหาที่ทำให้เกิดความเสียหายของผลทุเรียนคือปัญหาทางด้านโรคพืช เนื่องจากมีโรคหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายในทุกระยะของการผลิต นับตั้งแต่ เมล็ด ต้นกล้า จนถึงต้นโต ซึ่งหากต้นทุเรียนที่ติดเชื่อได้รับการรักษาไม่ทันการณต้นทุเรียนอาจตายได้ และหากคิดเป็นมูลค่าความเสียหายต่อทุเรียน 1 ต้น อายุ 20 ปี จะอยู่ที่ประมาณ

100,000 บาทต่อต้น ด้วยเหตุนี้การระบาดของโรคจึงถือได้ว่าเป็นสาเหตุหลักประการหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากการใช้ยาและปุ๋ย แต่ผลผลิตที่ได้กลับลดลงทั้งที่เกษตรกรได้รับค่าตอบแทนจากผลผลิตเพียง 1 ครั้งต่อปีเท่านั้น (ศิริพร วรกุลดำรงไชย 2558)

โรคที่ระบาดในสวนทุเรียนมีความหลากหลาย แต่มีหลายชนิดที่สร้างความเสียหายได้ทุกระยะของทุเรียน คือ โรครากเน่า โคนเน่า หรือผลเน่า หรือโรยโรคอื่นๆที่ปรากฏขึ้น อาทิ กิ่งแห้ง ใบเหลือง เป็นต้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในกลุ่ม *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. และมักพบว่ามีการระบาดที่รุนแรงในช่วงฤดูฝน โดยเชื้อจะแพร่เข้าสู่ส่วนต่าง ๆ ผ่านท่อน้ำเลี้ยงและเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นทุเรียน อาทิ ใบ กิ่งก้าน ยอด และผล อาการของโรคที่พบได้เช่น ดอกและผลเน่าหลุ่ร่วง ต้นและใบจะแห้งตายในที่สุด โดยไม่ต้องอาศัยแผลเปิดธรรมชาติ สปอร์ที่เชื้อ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สร้างมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทำให้ยากต่อการกำจัด เนื่องจากเชื้อสามารถหลบซ่อนใต้ดิน โดยเฉพาะ *Phytophthora* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความผันแปรสูงและมีลักษณะพิเศษคือมีการผลิต zoospores ที่สามารถแพร่ไปยังต้นทุเรียนต้นอื่นผ่านน้ำที่ไหล กระแสลม และแมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ความเสียหายของสวนทุเรียนในแต่ละปีกระจายเป็นวงกว้าง (พรพิมล อธิปัญญาคม 2551)

การควบคุมการระบาดของเชื้อราก่อโรคซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยในดินนั้นทำได้ยาก หากอาศัยเพียงการพ่นด้วยสารเคมีหรือยา เนื่องจากสารที่ใส่จะอยู่เพียงบริเวณผิวหน้าดิน เมื่อมีการชะล้างของน้ำฝนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารเคมีลดลง ซึ่งนอกจากจะไม่สามารถยับยั้งการระบาดได้ยังส่งผลให้เชื้อก่อโรคมีการพัฒนาเซลล์ให้เกิดความต้านทานต่อสารเคมี เมื่อเกษตรกรใช้สารเคมีและยาในระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้เชื้อก่อโรคต้านทานได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นทุเรียนจึงได้รับผลกระทบและสูญหายจากดินไปในที่สุด เมื่อความสมดุลทางชีวภาพในดินสูญเสียและสารเคมีใช้ไม่ได้ผล เกษตรกรจึงมักใช้สารเคมีอื่น ๆ ร่วมด้วยมากกว่า 2-3 ชนิด ซึ่งอาจทำให้ดินสูญเสียความสมดุลอย่างถาวร ด้วยเหตุนี้หากมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญหรือสามารถทำลายโอกาสการรอดชีวิตของเชื้อราก่อโรคในดิน และส่งเสริมการเจริญให้แก่พืชได้ อาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ยับยั้งหรือควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในสวนทุเรียน รวมถึงฟื้นฟูความเสียหายจากการใช้สารเคมีสะสมยาวนาน อาจทำได้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นในแต่ละปีและส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศต่อไป (สมคิด ดิเสถพร 2540)

ตัวควบคุมทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีความนิยมในการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช นั่นคือแอกติโนมัยซีท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการออกซิเจนในการเจริญ จัดอยู่ในไฟลัม

*Actinobacteria* และมีความสามารถในการสร้างเส้นใย (hyphae) ทั้งเส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีความหลากหลายของจินัสสูง มีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส และ โปรโตซัว อย่างไรก็ตามกลุ่มที่มีการสร้างสารสำคัญที่มีฤทธิ์ ในการจำกัดการเจริญของเชื้ออื่นมักพบอยู่ในจินัส *Streptomyces* โดยปกติมักเจริญอยู่ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีการสร้างสปอร์จำนวนมากส่งผลให้เชื้อเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากยาคูณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ อาทิ การสร้างสารเมตาบอไลต์ออกสู่ภายนอกเซลล์มีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์และเส้นใยของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยสารที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้นอยู่ในกลุ่ม cyclic peptides และ quinones นอกจากนี้ยังมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ได้ทันที (Xiao, Kinkel et al. 2002) จากปัญหาการระบาดของเชื้อและความสามารถของเชื้อ แอคติโนมัยซีทจึงนำไปสู่การศึกษาในครั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทจากดินและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทไปปฏิบัติเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp. *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia* sp. ตลอดจนพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ สำหรับเป็นแนวทางในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* sp. *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุของโรครากเน่า โคนเน่า และผลเน่า ในทุเรียนในระดับแปลงต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 คัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. จากดินในพื้นที่การเกษตร
- 2.2 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท
- 2.3 ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท
- 2.4 พัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบจากแอคติโนมัยซีทเพื่อใช้ในสวนทุเรียน

## 3. สมมติฐานของการวิจัย

- 3.1 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ก่อโรคในทุเรียน ได้แก่ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.
- 3.2 แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดได้
- 3.3 แอคติโนมัยซีทสามารถนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ในทุเรียนได้

#### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

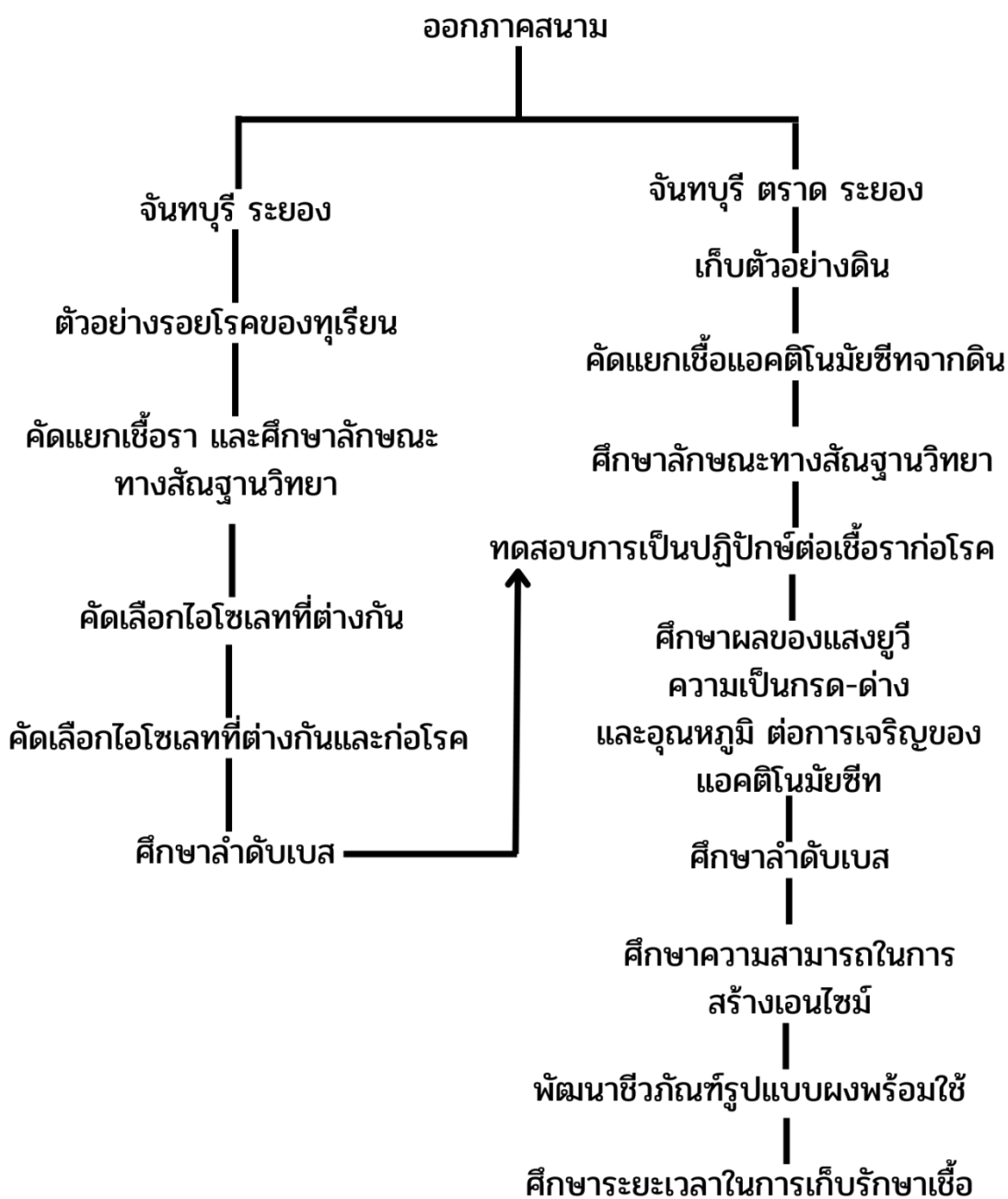
- 4.1 ได้องค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสกีโนมัยซีท
- 4.2 ได้องค์ความรู้ในด้านประสิทธิภาพของแอสกีโนมัยซีทในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค ได้แก่ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.
- 4.3 ได้องค์ความรู้ในด้านการสร้างเอนไซม์บางชนิดของเชื้อแอสกีโนมัยซีท
- 4.4 ชีวภัณฑ์จากแอสกีโนมัยซีทสำหรับควบคุมโรค *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.

#### 5. ขอบเขตของการทดลอง

ออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของต้นทุเรียนที่ปรากฏรอยโรค เช่น ราก ลำต้น กิ่ง และใบ ซึ่งมีลักษณะ เน่า ดำ หรือเป็นสีน้ำตาล บริเวณรอยแผลน้ำ กดยุบ หรือมีรอยแดง น้ำ เป็นต้น จากนั้นทำการแยกเชื้อราก่อโรคและจำแนกเบื้องต้น โดยศึกษาจากมหัณฐาน จุลสัณฐาน และทำการยืนยันชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

ออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรสำหรับคัดแยกและคัดเลือกแอสกีโนมัยซีท โดยการจำแนกเบื้องต้นจะเริ่มจากการศึกษาลักษณะทางมหัณฐาน ซึ่งโคโลนีของแอสกีโนมัยซีทจะมีการสร้างเส้นใยหรือมีลักษณะเป็นผง สร้างรงควัตถุหลากสี เช่น สีเทา ขาว เขียว เหลือง ส้มแดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น

ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอสกีโนมัยซีทในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคในทุเรียน ได้แก่ *Fusarium* spp. *Lasiodiplodia* sp. และ *Phytophthora* sp. จากนั้นนำแอสกีโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบปัจจัยทางกายภาพ อาทิ อุณหภูมิ แสงยูวี ค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมถึงศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์บางชนิด ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเชื้อ และอาจส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งในรูปแบบทางตรง และทางอ้อม จากนั้นจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) แอสกีโนมัยซีทที่ได้รับคัดเลือกจะถูกนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 1 ภาพรวมการศึกษาวิจัย



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ลักษณะทั่วไปของทุเรียน

ต้นทุเรียน (*Durio zibetthinus* Murr.) เป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่มหนาขนาดใหญ่ แผ่กว้าง และไม่มีการผลัดใบตลอดทั้งปี ความสูงของต้นทุเรียนอายุ 20-30 ปีจะมีความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 20-30 เมตร หรืออาจจะสูงได้ถึง 40 เมตรหากเป็นต้นทุเรียนที่ได้จากการเพาะเมล็ด ในขณะที่ต้นทุเรียนที่ขยายพันธุ์โดยการเสียบยอดจะมีความสูงอยู่ที่ 8-12 เมตร มักพบเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ดีในภูมิภาคที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ 10 – 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศควรอยู่ที่ประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ ทุเรียนเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีลักษณะของใบเป็นแบบใบเดี่ยว ยาว 8-20 เซนติเมตร กว้าง 4-6 เซนติเมตร ปลายใบแหลม มีก้านใบและท้องใบมีสีน้ำตาล ด้านบนของใบมีสีเขียวอ่อนถึงเขียวเข้มเป็นมัน ลักษณะของเส้นท้องใบคล้ายร่างแหสานกันซึ่งจะแตกต่างกันไป ดังแสดงในภาพที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและให้ผลผลิตของทุเรียนคือดิน สภาพพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกต้องมีความอุดมสมบูรณ์สูง มีคุณสมบัติระบายน้ำได้ดี หน้าดินบริเวณลำต้นจะต้องลึกมากกว่า 50 เซนติเมตร และมีความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 5.5 ถึง 6.5 ปริมาณน้ำฝนอยู่ระหว่าง 1,600 ถึง 3,000 มิลลิเมตร/ปี มีช่วงแล้งต่อเนื่องน้อยกว่า 3 ปี และ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 30 มีแหล่งน้ำเพียงพอโดยประมาณ 600 ถึง 800 ลูกบาศก์เมตรต่อไร่ และมีสารละลายเกลือไม่มากกว่า 1,400 มิลลิโมล การหาอาหารของทุเรียนจะอาศัยรากพิเศษที่เรียกว่ารากตะขาบที่มีอยู่มากมายตามผิวดินและรากอาหารที่ซ่อนไขลงผิวดินจะอยู่ในระดับความลึกไม่เกิน 50 เซนติเมตร ในขณะที่การออกดอกของทุเรียนมักออกดอกเป็นช่อ ในหนึ่งช่อจะมี 1-30 ดอก ในแต่ละดอกจะประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยงที่มีสีน้ำตาลอยู่ชั้นนอกสุด กลีบดอกด้านในเป็นสีขาวนวล รูปร่างคล้ายระฆัง มีเกสรตัวผู้ 5 ชูด และก้านเกสร 5-8 อัน ดังแสดงในภาพที่ 3 ในส่วนของผลจะมีหนามแหลมจำนวนมาก และมีเปลือกค่อนข้างหนา รูปทรงค่อนข้างรีและมีขนาดแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ในแต่ละผลจะแบ่งออกในลักษณะเป็นพู ในแต่ละพูมีเนื้อทุเรียนจำนวนมากสีคล้ายดอกจำปาหรือเหลืองอ่อนเป็นที่อยู่ของเมล็ดทุเรียน มีรสหวานและมีกลิ่นเฉพาะแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยทุเรียนจะเริ่มให้ผลผลิตเมื่อมีอายุตั้งแต่ 5- 6 ปี เป็นต้น พันธุ์ของทุเรียนในประเทศไทยมีทุเรียนมากกว่า 200 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่นิยมบริโภคและเพาะปลูกเพื่อการค้าได้แก่ พันธุ์ชะนี พันธุ์หมอนทอง พันธุ์ก้านยาว พันธุ์พวงมณี และพันธุ์กระดุม นอกจากนี้ยังมีทุเรียนบางสายพันธุ์ซึ่งเป็นสินค้าสายที่บ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical indication : GI) อาทิ ทุเรียนนนท์ ทุเรียนป่าละอู ทุเรียนปราจีน ทุเรียนหลงลับแล



455482475

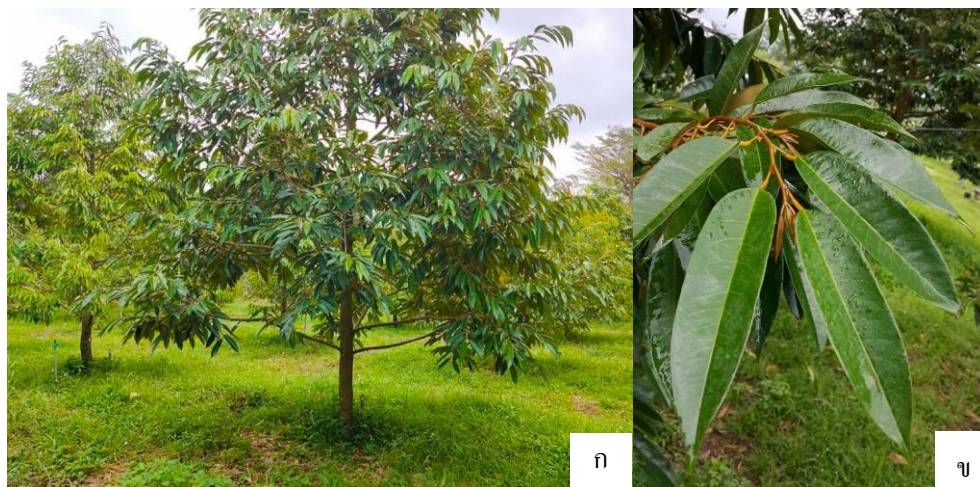
BUU 1Thesis 61910022 thesis / recv : 27042566 11:35:34 / seq: 96

อุตรดิตถ์ ทุเรียนหลงลับแลอุตรดิตถ์ ทุเรียนภูเขาไฟศรีสะเกษ ทุเรียนในวงระนอง และทุเรียนสาธิตาพังงา เป็นต้น สำหรับการดูแลใส่ปุ๋ยทุเรียนจะแตกต่างกันไปตามระยะของการเจริญ ซึ่งรายละเอียดการใส่ปุ๋ยและให้น้ำต้นทุเรียนในแต่ละช่วงการเจริญดังแสดงใน ตารางที่ 1 (Ketsa, Wisutiamonkul et al. 2020)

**ตารางที่ 1** รายละเอียดการใส่ปุ๋ยและให้น้ำต้นทุเรียนในแต่ละช่วงการเจริญ

ระยะการเจริญเติบโตของต้นทุเรียน	การให้น้ำ	การให้ปุ๋ย
หลังปลูก	ให้น้ำอย่างสม่ำเสมอโดยดูความชื้นที่ผิวดิน	ให้โดยการเตรียมหลุมปลูก หรือวัสดุปลูก
ต้นอายุ 1-5 ปี	80-120 ลิตรต่อต้น ทุก 3-4 วัน	ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ที่หมักตัวดีแล้ว 20-30 กิโลกรัมต่อต้นต่อปี ร่วมกับปุ๋ยเคมีสูตรเสมอ อัตรา 1/3 ของขนาดทรงพุ่ม
กระตุ้นการออกดอก	งดน้ำไม่น้อยกว่า 10 วัน	ปุ๋ยเคมีสูตร 8-24-24 อัตรา 1/3 ของขนาดทรงพุ่ม
ต้นเริ่มออกดอกติดผล	ให้น้ำ 1/3 ของการให้น้ำปกติ เช่น ปกติให้น้ำ 240 ลิตร ลดลงเหลือ 80 ลิตร	ระยะไข่ปลา ฟันด้วยปุ๋ย 10-0-46 อัตรา 100-200 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ให้ทั่วทรงพุ่ม
ระหว่างต้นติดผล	80-110 ลิตรต่อต้น ทุก 3-4 วัน	ใส่ปุ๋ยสูตร 8-24-24 1/3 ของขนาดทรงพุ่ม
หลังเก็บเกี่ยวผลผลิต	80-110 ลิตรต่อต้น ทุก 3-4 วัน	ปุ๋ยอินทรีย์ 20-50 กิโลกรัมต่อต้น ร่วมกับปุ๋ยเคมีสูตรเสมอ น้ำหนัก 1/3 ของขนาดทรงพุ่ม





### ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของต้นทุเรียน

(ก) ลักษณะของต้นทุเรียนหมอนทองอายุ 3 ปี มีขนาดความสูงประมาณ 3 เมตร ทรงพุ่มหนาและรัศมีมีความกว้างประมาณ 2 เมตร

(ข) ลักษณะใบของต้นทุเรียนหมอนทองมีกึ่งสีน้ำตาลและมีขนสีน้ำตาลเล็กน้อย ด้านบนของใบเขียวเป็นมัน ด้านล่างใบมีสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแบบใบเดี่ยวต่อหนึ่งก้านใบ ยาว 8-20 เซนติเมตร กว้าง 4-6 เซนติเมตร และมีปลายใบแหลม (Ketsa, Wisutiamonkul et al. 2020)



### ภาพที่ 3 องค์ประกอบของช่อดอกทุเรียน

ดอกทุเรียนพันธุ์หมอนทองมีลักษณะคล้ายระฆัง โดยดอกของทุเรียนจะเป็นแบบสมบูรณ์เพศประกอบด้วยกลีบเลี้ยงซึ่งมีสีเขียว หรือสีน้ำตาลเมื่อแก่ กลีบเลี้ยงจำนวน 2-3 กลีบ กลีบรองสีขาวขนาดจำนวน 5 กลีบ ก้านเกสร 5-8 อัน และมีเกสรตัวผู้จำนวน 5 ชูด (Youryon and Supapvanich 2022)



ภาพที่ 4 องค์ประกอบทั่วไปของผลทุเรียน

ผลของทุเรียนหมอนทองประกอบไปด้วยก้านผลที่ยึดระหว่างกิ่งของลำต้นและขั้วที่อยู่ติดกับผล ปากปลิงและปลิง ขั้วผลและพลูซึ่งมีบรรจุน้ำและเมล็ดไว้ภายใน (Youryon and Supapvanich 2022)

## 2. ทุเรียนและความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย

ราชาผลไม้ของทุเรียนสามารถสร้างรายได้แก่ประเทศไทยมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ประเภทอื่น ๆ ประเทศไทยมีแหล่งเพาะปลูกและมีผลผลิตผลสดตลอดจนผลิตภัณฑ์แปรรูปมากที่สุดในภูมิภาคเอเชีย และมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกอย่างต่อเนื่อง โดยแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของไทยจะอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ โดยทุเรียนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะออกผลผลิตในช่วงเดือนเมษายน - มิถุนายน พื้นที่เพาะปลูกได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด และปราจีนบุรี ในส่วนของทางภาคใต้จะมีผลผลิตของทุเรียนเพียงพอต่อความต้องการของตลาดในช่วง มิถุนายน - สิงหาคม พื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ยะลา และนราธิวาส โดยข้อได้เปรียบทางการค้าของไทยในปัจจุบันคือไม่ถูกเรียกเก็บภาษีนำเข้าใน 16 ประเทศคู่ค้าที่ไทยมีข้อตกลงการค้าเสรี (FTA) ด้วย ได้แก่ จีน ฮองกง ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ญี่ปุ่น เวียดนาม สิงคโปร์ อินโดนีเซีย สปป.ลาว กัมพูชา เมียนมา ฟิลิปปินส์ บรูไน อินเดีย ชิลี และเปรู ในปี 2562 ไทยมีการส่งออกทุเรียนและผลิตภัณฑ์รวม 692,720 ตัน คิดเป็นมูลค่ารวม 51,170.4 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 32.65 และร้อยละ 50.68 ตามลำดับโดยสามารถจำแนกเป็นรายผลิตภัณฑ์ได้ดังนี้ ทุเรียนสดมีปริมาณการส่งออก 655,362 ตัน มูลค่า 45,485.5 ล้านบาท

ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 32.65 และ 50.68 ตามลำดับ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ จีน เวียดนาม ฮองกง ใต้หวัน สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และแคนาดา โดยมีสัดส่วนส่งออกมากที่สุดใน จีน (ร้อยละ 57.92) เวียดนาม (ร้อยละ 24.43) และฮองกง (ร้อยละ 15.57) ทูเรียนแช่แข็ง มีปริมาณส่งออก 25,932 ตัน มูลค่า 5,353.5 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 29.47 และ 15.17 ตามลำดับ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ จีน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ฮองกง เกาหลีใต้ ใต้หวัน เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เวียดนาม โดยมีสัดส่วนการส่งออกมากที่สุดในจีน (ร้อยละ 84.19) สหรัฐอเมริกา (ร้อยละ 9.51) และออสเตรเลีย (ร้อยละ 1.55) ทูเรียนอบแห้งมีปริมาณส่งออก 215 ตัน มูลค่า 199.7 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าลดลงร้อยละ 48.56 และ 42.32 ตามลำดับ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ จีน ฮองกง ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม ใต้หวัน สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ และเกาหลีใต้ โดยมีสัดส่วนส่งออกมากที่สุดในจีน (ร้อยละ 53.52) ฮองกง (ร้อยละ 18.72) ออสเตรเลีย (ร้อยละ 8.87) และสหรัฐอเมริกา (ร้อยละ 8.15) และทูเรียนกวน มีปริมาณส่งออก 1,211 ตัน มูลค่า 131.7 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าลดลงร้อยละ 20.22 และ 15.31 ตามลำดับ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ รัสเซีย โครเอเชีย ยูเครน ออสเตรเลีย ลัตเวีย อาเซอร์ไบจาน แคนาดา เยอรมนี สหรัฐอเมริกา และจีน โดยมีสัดส่วนการส่งออกมากที่สุดในรัสเซีย (ร้อยละ 35.14) โครเอเชีย (ร้อยละ 12.66) และยูเครน (ร้อยละ 10.63) ในขณะที่ปี 2563 ในช่วง 7 เดือนของปี 2563 (ม.ค. – ก.ค.) ไทยส่งออกทูเรียนและผลิตภัณฑ์รวม 515,002 ตัน มูลค่า 54,840.5 ล้านบาท โดยมีการขยายตัวทั้งปริมาณและมูลค่าร้อยละ 8.59 และร้อยละ 66.34 ตามลำดับ โดยเป็นการส่งออกทูเรียนสด 501,439 ตัน มูลค่า 50,072.2 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 8.09 และร้อยละ 61.74 ตามลำดับ การส่งออกทูเรียนแช่แข็ง 12,645 ตัน มูลค่า 2,572.8 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 13.86 และ 25.49 ตามลำดับ การส่งออกทูเรียนอบแห้ง 91 ตัน มูลค่า 84.9 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าลดลงร้อยละ 30.53 และ 30.18 ตามลำดับ และการส่งออกทูเรียนกวน 827 ตัน มูลค่า 110.6 ล้านบาท ปริมาณลดลงร้อยละ 3.95 แต่มูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.42 อย่างไรก็ตามในสถานการณ์จากนี้ทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาการระบาดของโควิด-19 แต่การส่งออกทูเรียนสดกลับสวนกระแสมีการส่งออกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะประเทศจีนที่นำเข้าทูเรียนจากไทยเป็นอันดับ 1 ซึ่งมีมูลค่ามากถึง 4.68 หมื่นล้านบาท เดิมโตขึ้นร้อยละ 77.57 เมื่อเทียบกับปีต่อปี สะท้อนให้เห็นว่าทูเรียนของไทยยังเป็นที่ต้องการของตลาดโลกอีกมาก และในอนาคตอาจมีแนวโน้มขยายตลาดไปยังยุโรปอันนำมาซึ่งมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2564)

แม้ว่าไทยจะเป็นแหล่งทูเรียนรายใหญ่ และมีที่ตั้งของประเทศใกล้เคียงกับตลาดรายใหญ่อย่างสาธารณรัฐประชาชนจีน ฮองกง มากที่สุด แต่ในสถานการณ์ที่ผ่านมา นับตั้งแต่ปี 2565 นี้

การส่งออกทุเรียนประสบปัญหาการตกค้างของทุเรียนในบริเวณด่านพรมแดนกักกันโรคระหว่างประเทศเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปัจจุบันตลาดรายใหญ่ของประเทศจีนได้สร้างมาตรการและตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมี แมลง และจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ของสินค้านำเข้าจากไทยอย่างเข้มงวด ในอนาคตมีแนวโน้มที่จะรับซื้อเฉพาะทุเรียนที่ได้รับมาตรฐานรับรอง Good Agricultural Practice : GAP ซึ่งเป็นมาตรฐานการผลิตทุเรียนที่เกษตรกรต้องปฏิบัติเพื่อที่จะได้รับการขึ้นทะเบียนตามที่มาตรฐานสินค้าเกษตร (เดลินิวส์ ออนไลน์) มกษ. 3-2556 ทุเรียน อาทิเช่น พื้นที่เพาะปลูกต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคหรือแมลงศัตรูพืช และต้องไม่มีสารพิษในผลทุเรียน ตลอดจนการควบคุมการใช้สารเคมีตลอดกระบวนการผลิตอย่างเคร่งครัด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2564)

### 3. โรคที่สำคัญของทุเรียน

ทุเรียนจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจและเป็นผลิตภัณฑ์ส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากทุเรียนเป็นผลไม้ที่มีกลิ่นและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ ปัจจุบันการบริโภคทุเรียนเพิ่มมากขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศ ส่งผลให้มีความต้องการผลผลิตที่สูง จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกเพื่อรองรับปริมาณความต้องการที่มีจำนวนมาก ในปัจจุบันมูลค่าการส่งออกทุเรียนมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยประเทศที่นำเข้าทุเรียนเป็นอันดับต้น ๆ ได้แก่ ประเทศจีน ฮองกง ไต้หวัน และอินโดนีเซีย ในปี 2560 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกทุเรียนทั้งหมด 766,972.68 ไร่ โดยปี 2561 มีเนื้อที่ปลูกทุเรียนเพิ่มขึ้นเป็น 830,938.73 ไร่ และมีผลผลิต 627,619.70 ตัน เห็นได้ชัดว่ามีพื้นที่ปลูกทุเรียนขยายเป็นจำนวนมากโดยมีพื้นที่ปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศ ดังนี้ ภาคใต้ ภาคตะวันออก ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีพื้นที่ปลูก 426,998.09 270,102.25 27,954.25, 13,079.25 และ 11,773.50 ไร่ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่จะผลิตทุเรียนให้มีคุณภาพและผลผลิตสูง เกษตรกรต้องดูแลรักษาให้ต้นทุเรียนมีการเจริญเติบโตที่ดี แข็งแรง เนื่องจากปัญหาสำคัญในการปลูกทุเรียน คือ โรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน หากเกิดการระบาดแล้วจะส่งผลกระทบต่อปลูกทุเรียนเป็นอย่างมาก ซึ่งเชื้อราสาเหตุสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วน ได้แก่ ส่วนของราก ลำต้น กิ่ง ใบ และผล เมื่อนำรอยโรคไปทำการแยกเชื้อจึงพบว่าเชื้อสาเหตุคือเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* spp. นอกเหนือจากปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าแล้วยังพบโรคที่มีความสำคัญอีกหลายชนิด ได้แก่ โรคราสีขาวกริมอมชมพูซึ่งเกิดเชื้อราในกลุ่ม *Nectriaceae* ซึ่งเป็นราในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Fusarium* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ยังเป็นสาเหตุของอาการโรคอื่นของทุเรียน อาทิ โรคใบจุด และโรคผลเน่า อีกทั้งยังพบการระบาดของเชื้อก่อโรคที่เจริญเร็วอย่าง *Lasiodiplodia theobromae* ที่มักเป็น



สาเหตุของโรคผลเน่าของผลไม้เศรษฐกิจหลังเก็บเกี่ยวอย่างทุเรียน (Dean, Van Kan et al. 2012) ซึ่งเชื้อราก่อโรคเหล่านี้มีกระบาดในช่วงที่มีฝนตกมากและมีสภาพความชื้นสูง ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อราก่อโรคจะอาศัยในดินและสามารถพักตัวอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน โดยอาศัยเศษซากพืชเป็นแหล่งอาศัย เพื่อแก้ปัญหาการระบาดของเชื้อราก่อโรคส่งผลให้เกษตรกรใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นจำนวนมาก เมื่อใช้ในระยะเวลานานทำให้เชื้อเกิดการต้านต่อสารเคมีที่ใช้ เกษตรกรหลายรายจึงมักใช้สารเคมีร่วมกันมากกว่า 2 ชนิด อีกทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้การควบคุมเชื้อราก่อโรคมีประสิทธิภาพลดลงอาจเกิดจากการหลบซ่อนตัวของเชื้อในดินทำให้เชื้อไม่สัมผัสกับสารเคมี หรือการใช้สารเคมีควบคุมโรคในช่วงฤดูฝนที่ส่งผลต่อความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ ด้วยเหตุนี้หากมีการนำชีวภัณฑ์ที่สามารถเจริญได้เร็ว และขยายพันธุ์ได้ในสภาวะเดียวกันกับเชื้อราก่อโรค หรือทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ตลอดจนมีแหล่งอาศัยในดิน สามารถสร้างสปอร์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อก่อโรคได้ ชีวภัณฑ์ดังกล่าวอาจนำมาซึ่งแนวทางในการจัดปัญหาด้านเชื้อก่อโรคของเกษตรกรในระยะยาวและเพิ่มผลผลิตของทุเรียนรวมถึงสร้างมูลค่าให้แก่ประเทศต่อไปได้ในอนาคต (Aloi, Zamora-Ballesteros et al. 2021)

*Phytophthora* spp. สาเหตุหลักของโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน จัดอยู่ในดิวิชัน Eumycota คลาส Oomycetes และอยู่ในอันดับ Peronosporales ตระกูล Pythiaceae ในจีนัส *Phytophthora* มีหลายสปีชีส์ อาทิ *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora crassamura* และ *Phytophthora ornamentata* ซึ่งเชื้อก่อโรคเหล่านี้มีความผันแปรสูง อย่างไรก็ตามเชื้อที่เกษตรกรผู้เพาะปลูกให้ความสนใจและระมัดระวังเป็นพิเศษคือ *P. palmivora* (Drenth and Guest 2004) โดยลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora* มีขนาดเส้นใยประมาณ 3.6 – 5.7 ไมโครเมตร ผนังเรียบ และ Sporangiophore เรียวยาว แดกกิ่งก้านแบบไม่แน่นอน มีความกว้าง 2.3 – 4.5 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์เรียกว่า Sporangium เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีลักษณะของสปอร์แบนหรือยาวรีปลายของสปอร์แหลมเล็ก ขนาดโดยทั่วไปเมื่อคิดเป็นสัดส่วนความยาวต่อความกว้างคือ 3.5-11.5 x 23-26 ไมโครเมตร ผนังหนา 4.7 ไมโครเมตร ภายในถุง Sporangium จะบรรจุ zoospore สามารถเคลื่อนที่ได้จำนวน 10-64 zoospores โดยแต่ละ zoospore จะมี flagella 2 เส้น ขนาด 7-8 x 11-14 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีการสร้าง Chlamydospore รูปร่างกลมจำนวนมาก โดยมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 30 ไมโครเมตร ผนังเรียบและบาง ในส่วนของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *P. palmivora* จะเป็นแบบ heterothallic โดยเชื้อจะสร้าง Oogonium รูปร่างกลม ผนังบาง ขรุขระ ขนาด 20 – 28 ไมโครเมตร มีสี่เหลี่ยมถึงสี่ทอ Antheridium เป็นแบบ Amphigynous รูปร่างกลม มีขนาดเฉลี่ย 13 x 13 ไมโครเมตร หากเป็น Oospore ที่เจริญเกือบเต็ม Oogonium จะมี

ขนาดเฉลี่ย 22 ไมโครเมตร ผนังหนา 2.1 ไมโครเมตร เชื้อก่อโรคนี้นี้เจริญสามารถเจริญได้ที่ อุณหภูมิระหว่าง 16 – 32 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 28 องศาเซลเซียส (อุดม ภูพิพัฒน์ 2532) จุดกำเนิดของเชื้อราชนิดนี้มาจากทวีปอเมริกาใต้และมีการระบาดในประเทศไทยครั้งแรกที่อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี โดยเชื้อที่สร้างความเสียหายในช่วงดังกล่าวคือ *P. palmivora* และยังคงถือเป็นโรคที่ต้องให้ความระมัดระวังมากที่สุด เนื่องจากเป็นโรคที่ส่งผลให้ต้นทุเรียนที่กำลังเจริญเติบโตยืนต้นตายได้ ซึ่งความเสียหายเกิดขึ้นกับแหล่งเพาะปลูกเกือบทุกแหล่งทั่วประเทศ ทำให้บางสวนขาดทุนจากการยืนต้นตายและไม่สามารถปลูกพืชเศรษฐกิจซ้ำในพื้นที่เดิมได้เนื่องจากอาจเกิดการระบาดซ้ำ (Kongtragoul, Ishikawa et al. 2021) ทั้งเชื้อรามักอาศัยอยู่ในดินและสามารถแพร่ระบาดได้ทั้งในน้ำ กระแสลมพัด และการเดินทางของสิ่งมีชีวิตอย่างมนุษย์และแมลง ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อราเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ลักษณะอาการของโรคที่เป็นโรครากเน่าโคนเน่า เมื่อเชื้อเข้าทำลายที่รากทุเรียนจะพบว่าเริ่มแรกจะเห็นใบที่ปลายกิ่งมีสีซีดไม่เป็นมันเงาเหี่ยวลู่ลง เมื่ออาการรุนแรงมากขึ้น ใบจะเหลืองและหลุดร่วง โดยใบอ่อนจะมีอาการรุนแรงมากที่สุด บริเวณรากจะพบรากฝอยแสดงอาการเน่ามีลักษณะเปลือกอ่อน เปื่อยยุ่ยเป็นสีน้ำตาลข้ำและเน่า เมื่อโรครุนแรงอาการเน่าจะลามไปยังลำต้น เปลือกของลำต้นจะแตก (patch canker) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลม่วง เมื่อสภาพอากาศมีความชื้นสูงจะเกิดเมือกเยิ้มสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ออกมาจากเปลือกลำต้น อาการดังกล่าวสามารถมองเห็นได้จากบริเวณโคนต้นในระดับผิวดิน ในขณะที่อาการที่ปรากฏบนผลของทุเรียนจะเป็นจุดสีน้ำตาลและลุกลามเข้าไปในเนื้อ โดยเฉพาะในผลทุเรียนใกล้สุกทำให้ผลหลุดร่วง ดังแสดงในภาพที่ 5-6 (Kongtragoul, Ishikawa et al. 2021)



455482475

BUU-1Thesis 61910022 thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96



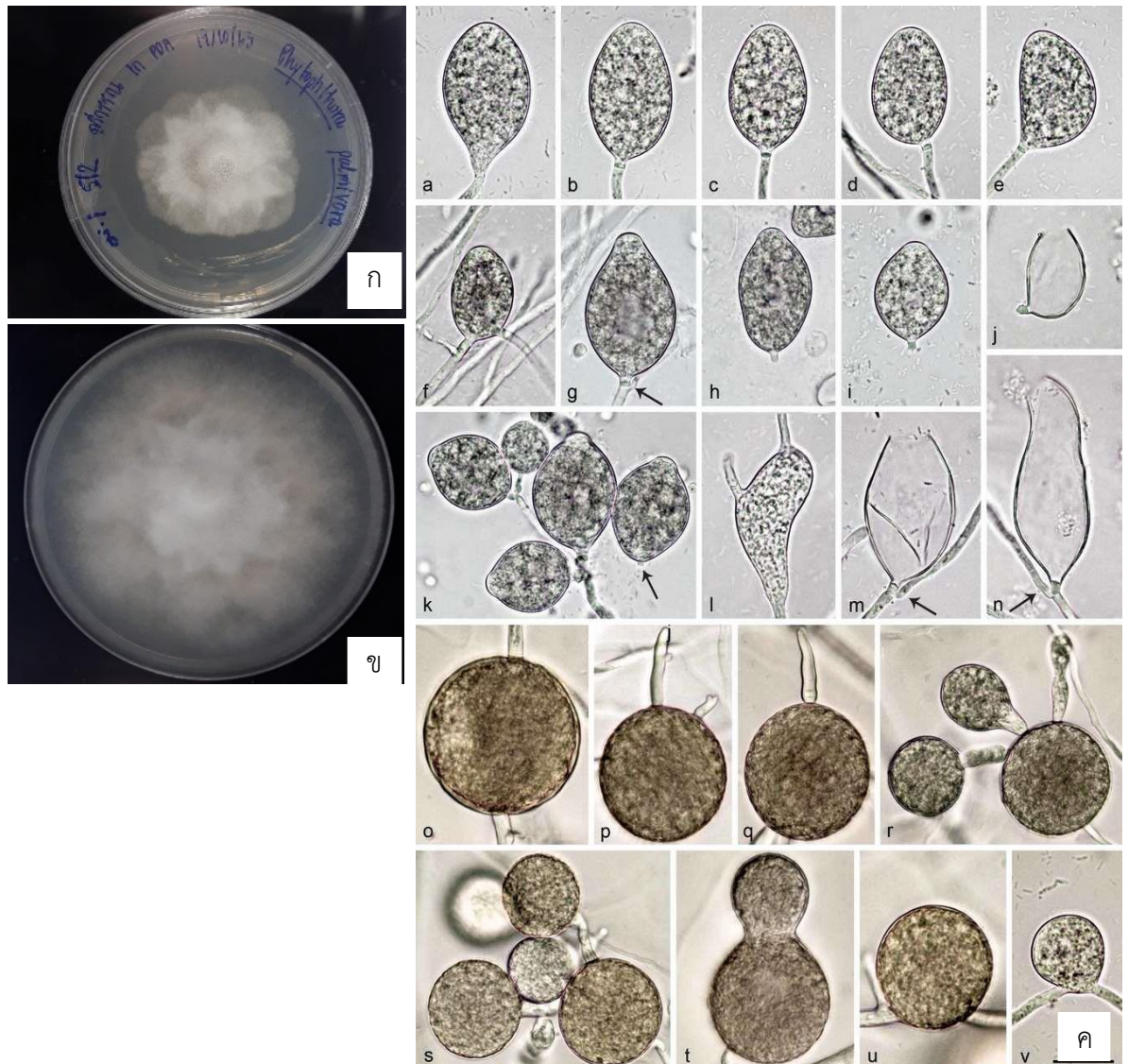
ภาพที่ 5 ลักษณะอาการของรอยโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora*

(ก) รอยโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora* บริเวณโคนต้น มีลักษณะเป็นสีดำและน้ำน้ำ

(ข) รอยโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora* บริเวณลำต้นซึ่งทำให้เกิดรอยแยกและมีลักษณะเป็นสีดำเนื่องจากอาการเน่า

(ค) อาการยอดและใบสลัดเมื่อเชื้อ *Phytophthora* เข้าติดเชื้อบริเวณราก

(ง) ลักษณะอาการผลเน่าที่เกิดการทำลายโดยเชื้อรา *Phytophthora* ทำให้บางบริเวณมีสีดำ (Suksiri, Laipasu et al. 2018)



ภาพที่ 6 ลักษณะของโคโลนี Sporangium และ Chlamydospore ของเชื้อรา *Phytophthora*

(ก) เชื้อรา *Phytophthora* ขณะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน

(ข) ลักษณะ โคโลนีของเชื้อรา *Phytophthora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 14 วัน

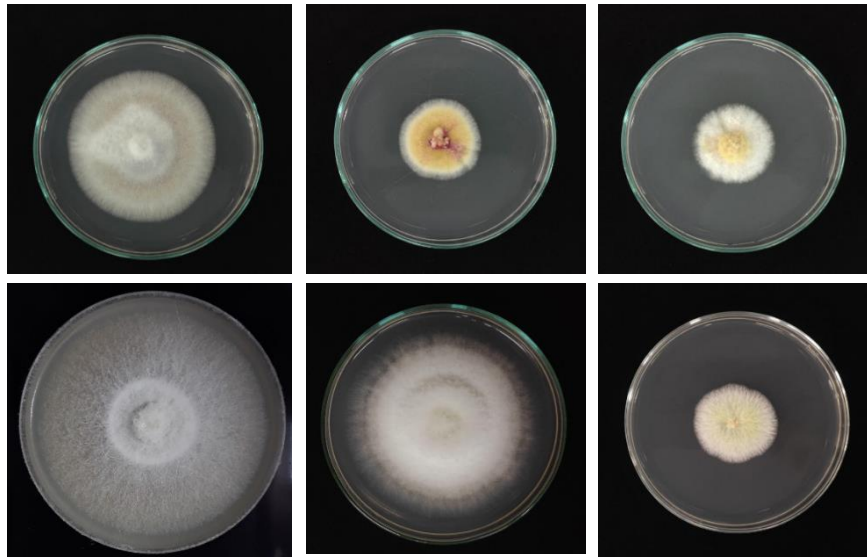
(ค) a-i ลักษณะของ Sporangia ที่อยู่บน Sporangiophore j Sporangia ที่ปลดปล่อย zoospores

แล้ว k ลักษณะของฐานรอง Sporangia ที่หลุดออกจาก Sporangiophore l ลักษณะของ Sporangium

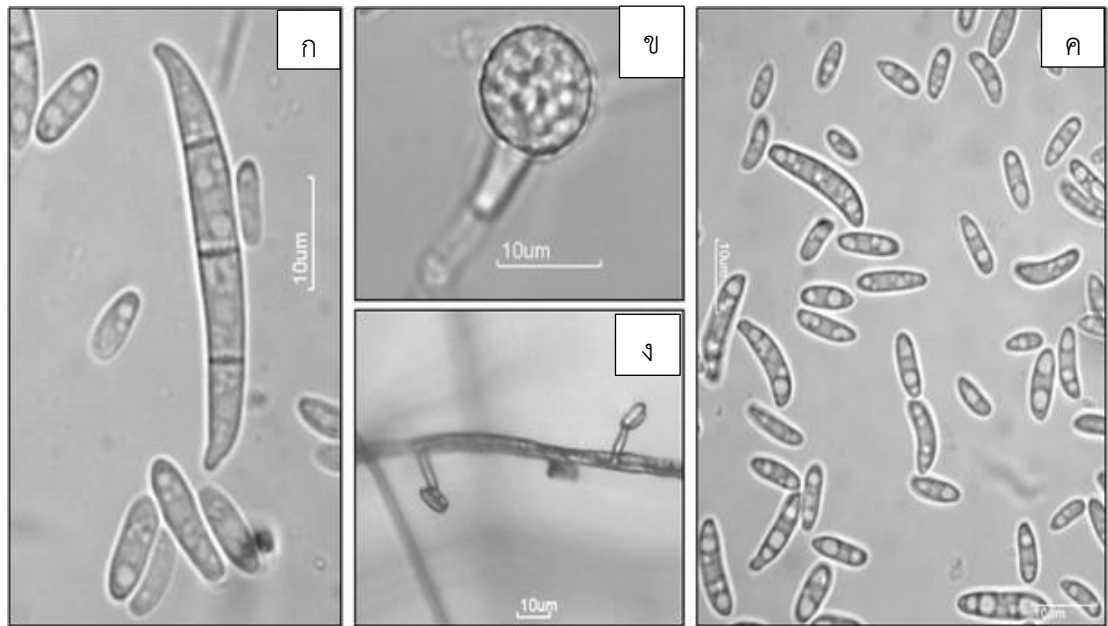
ที่เจริญอย่างไม่สมบูรณ์ m-n ลักษณะ Sporangia ที่กำลังปลดปล่อย zoospores o-v ลักษณะของ

Chlamydospore ที่มีรูปแบบการเจริญแตกต่างกัน (Jung, Scanu et al. 2017)

ประเทศไทยเป็นประเทศแห่งการเกษตรกรรมและตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นทำให้เชื้อก่อโรคสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดี เชื้อรา *Fusarium* spp. บางสายพันธุ์เป็นราก่อโรคที่รุนแรง หรือบางสายพันธุ์อาจเป็นเชื้อราที่พบร่วมกับเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าโคนเน่า อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่มีการรายงานการก่อโรคในทุเรียนคือ *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* และ *Fusarium oxysporum* โดย *Fusarium* spp. ถูกจัดอยู่ใน subdivision deuteromycotina, form-class hyphomycetes, form-order tuberculariales, form family tuberculariaceae ลักษณะของโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหาร PDA มีความหลากหลาย อาทิ โคลนีเส้นใยฟูสีขาวเจริญเต็มเพลท หรือเส้นใยสีส้มฟู ตลอดจนมีโคโลนีสีม่วง หรือสีชมพู เป็นต้น มีโคนิดี 2 แบบ คือ macroconidia และ microconidia โดยลักษณะของ macroconidia จะคล้ายกับพระจันทร์เสี้ยวหรือคล้ายหอม โดยในแต่ละ conidia ของ macroconidia จะมีลักษณะคล้ายผนังกัน โดยภายในผนังกันจะเป็นที่อยู่ของเซลล์ ในหนึ่ง macroconidia จะมีเซลล์ประมาณ 3-4 เซลล์ ส่วนหัวท้ายจะมีปลายแหลมโค้งเล็กน้อย มีขนาดเฉลี่ยความกว้างต่อความยาวอยู่ที่ 1.85 x 5.68 ไมครอน ในขณะที่ microconidia จะมีขนาดที่เล็กกว่าและเป็นแบบเซลล์เดี่ยวคล้ายทรงกระบอกหัวท้ายมน มีขนาดความกว้างต่อความยาวเฉลี่ย 1.04 x 2.37 ไมครอน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีการสร้าง Chlamydospore เป็นผลให้ *Fusarium* ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 20-35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไป *Fusarium* มักอาศัยในดิน สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย มีความหลากหลายทางสายพันธุ์และการแปรผันของเชื้อสูง อีกทั้งยังพบได้บ่อยกว่าราชนิดอื่นๆ เชื้อรา *Fusarium* สามารถก่อโรคและมีอาการแสดงของโรคได้หลายลักษณะ ได้แก่โรครากเหี่ยว (*Fusarium* wilt disease) โรคผลเน่า (*Fusarium* fruit rot) ซึ่งพืชผลทางการเกษตรที่ส่งออกทั้งในและต่างประเทศมีรายงานความเสียหายที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้อยู่เสมอ ลักษณะอาการเมื่อเชื้อเหล่านี้เข้าติดเชื้อในทุเรียนจะทำให้มีอาการกิ่งแห้ง บริเวณกิ่งมีเชื้อราสีขาวหรือสีชมพูเจริญเป็นหย่อมๆ ใบจะมีสีเหลืองร่วงหล่น และทำให้ทุเรียนยืนต้นตายในที่สุด และหากเชื้อเข้าสู่ผลจะทำให้ผลหลุดร่วงจากต้นมีอาการเน่าเมื่อใช้มีดกรีดจะเห็นเนื้อมีสีแดงหรือส้ม นอกจากนี้เชื้อรา *Fusarium* ยังพบระบาดเสมอ โดยเฉพาะในช่วงเวลาที่มีฝนตกชุกติดต่อกันเป็นเวลานาน และเกิดขึ้นได้ในสวนทุเรียนทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังแสดงในภาพที่ 7-8 (Callaghan, Puno et al. 2016)



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium* sp.



ภาพที่ 8 ลักษณะของสปอร์เชื้อรา *Fusarium oxysporum*

(ก) Macroconidia

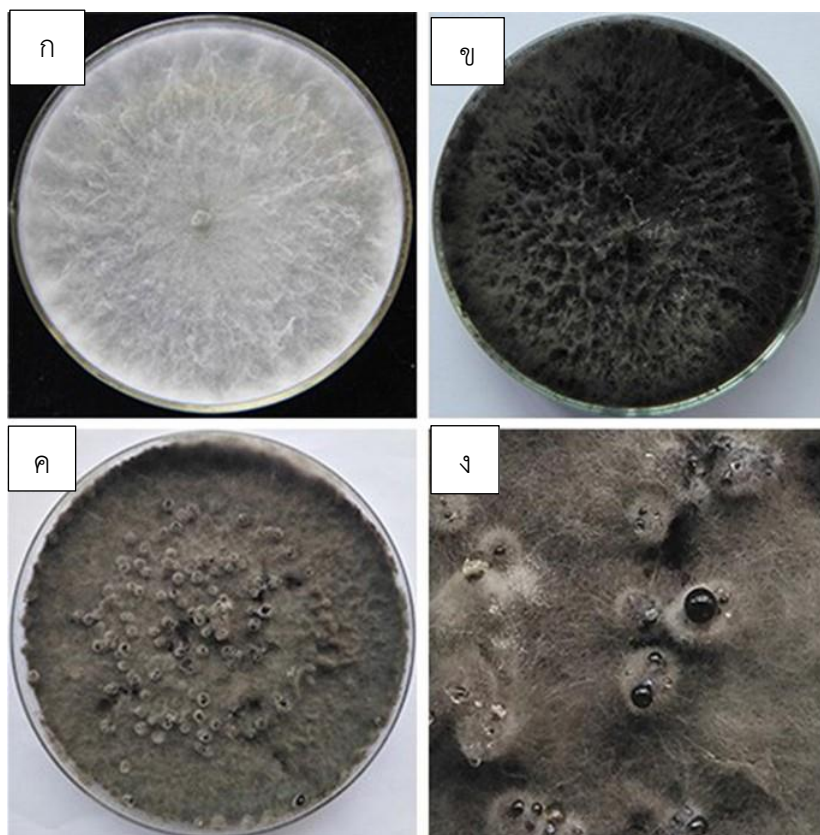
(ข) Chlamydospore

(ค) Microconidia

(ง) ลักษณะของ Microconidia ที่ยึดกับ monophialides สั้น ๆ (Callaghan, Puno et al. 2016)

*Lasiodiplodia theobromae* (synonyms: *Botryodiplodia theobromae* Lat., *Diplodia natalensis* Pole Evans.) เป็นเชื้อราที่มีความซับซ้อนในการเรียกชื่อ เนื่องจากเชื้อมีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphism) จัดอยู่ใน Division-Amastigomycota, Subdivision-Deuteromycotina, Class-Deuteromycetes, Subclass-Coelomycetidae, Order Sphaeropsidales, Family Sphaeropsidaceae โคลโคเนียของ *L. theobromae* แรกเริ่มมีสีขาวและเจริญได้เร็วภายใน 72 ชั่วโมงพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เส้นใยอากาศฟูหนา และมีผนังกัน เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น โคลโคเนียจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและดำในที่สุด มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศผ่านการสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia ซึ่งภายใน pycnidia จะเป็นกลุ่มของเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี และมีผนังกันเช่นเดียวกัน นอกจากนี้เชื้อ *L. theobromae* ยังมีการสร้าง conidiogenous cells ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิต conidia ที่มีรูปร่างกลม-รี เมื่ออยู่ใน pycnidia จะใสไม่มีสี หากถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และสร้างผนังกันมีขนาดประมาณ 26.2-27 x 14-14.4 ไมครอน และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินด้านในทำให้มองเห็นเป็นริ้วเรียงตัวในแนวยาว เป็นเชื้อราที่แพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย สามารถเข้าทำลายต้นทุเรียนผ่านรอยแผลเปิด จะทำให้เกิดจุดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดงบริเวณดังกล่าว หรือมีอาการเปื่อยช้ำในบริเวณเปลือกลำต้นหรือราก หากทำการลอกเปลือกนอกออก จะปรากฏรอยสีน้ำตาลเป็นเส้น ๆ ตามเนื้อเยื่อในชั้นคอร์เท็กซ์ หากเชื้อโจมตีต้นทุเรียนในส่วนของรากจะทำให้ใบเหลืองและร่วงหล่น หากยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไม่ทันอาจถึงขั้นร้ายแรงคือการยืนต้นตาย นอกจากนี้มักพบว่า *L. theobromae* เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคแคงเกอร์ในไม้เนื้อแข็ง สามารถพัฒนาเป็นสะเก็ดลูกกลมไปทั่วบริเวณที่ใกล้เคียง เมื่อเชื้อมีจำนวนมากขึ้นจะส่งผลให้กิ่งตายและใบเหี่ยวแห้ง นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อราสำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในผลไม้หลังเก็บเกี่ยวอีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 9-10 (Siriphanich 2011)

การควบคุมเชื้อร่าก่อโรคในทุเรียนซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย นั้นมีหลากหลายวิธีในปัจจุบัน นอกเหนือจากการควบคุมและป้องกันด้วยวิธีการใช้สารเคมีแล้ว การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรค่าแก่การวิจัยและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในสวนทุเรียน เนื่องด้วยมีการทดลองที่ยืนยันว่ามีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่อาจมีศักยภาพในการใช้เป็นมาตรการในการควบคุมต้นทุเรียนและป้องกันการเกิดโรคภายหลังการเก็บ



ภาพที่ 9 ลักษณะ โคลโลนีของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ที่เจริญบนอาหาร PDA

(ก) ลักษณะ โคลโลนี *L. theobromae* อายุ 4 วัน มีสีขาวเส้นใยฟู

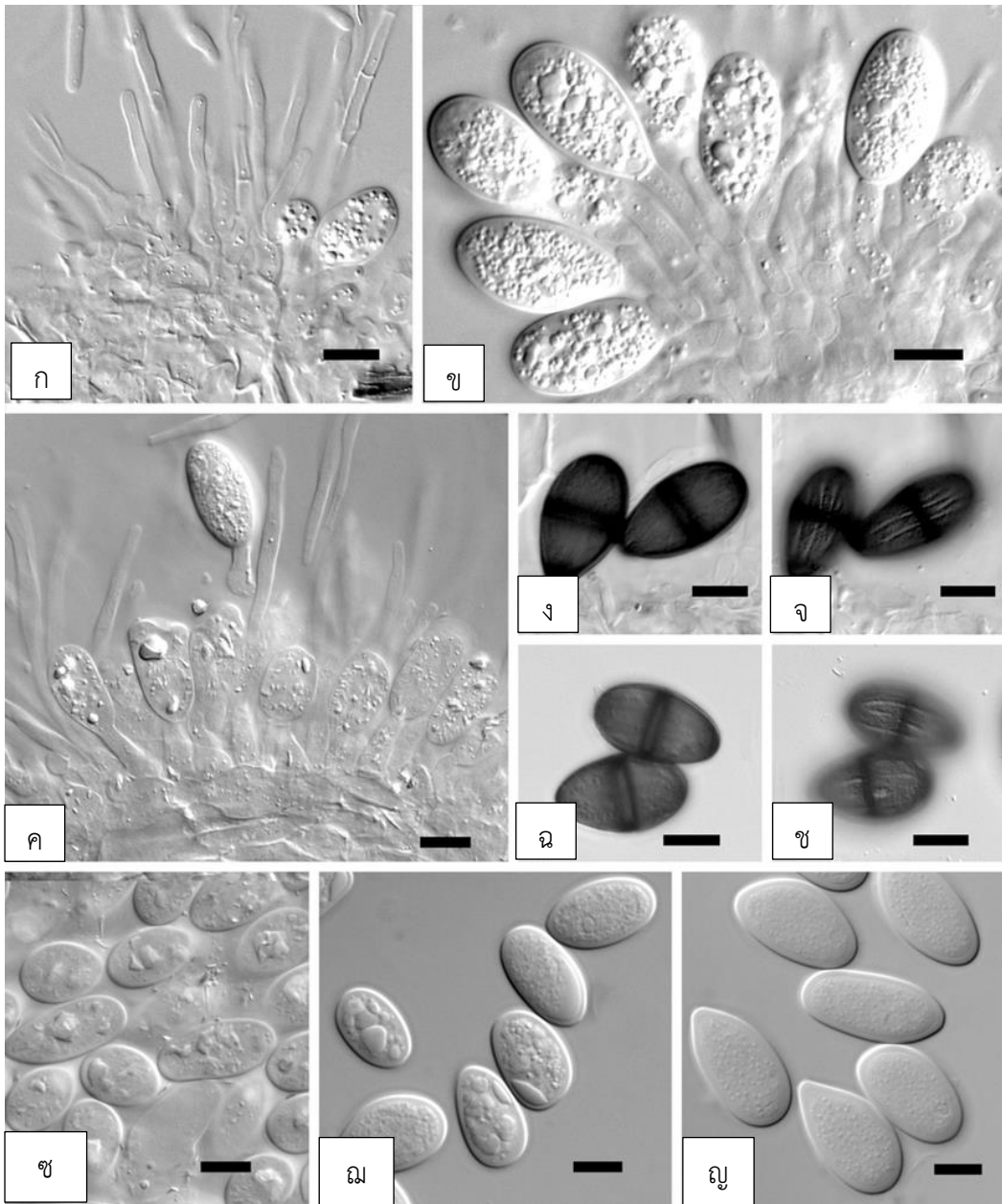
(ข) ลักษณะ โคลโลนี *L. theobromae* อายุ 7 วัน โคลโลนีมีสีเทา-ดำ

(ค) *L. theobromae* อายุ 10 วันมีการสร้าง Pycnidia

(ง) มีการปลดปล่อยของเหลวแสดงถึงการแตกออกของ Pycnidia (Liang, Li et al. 2020)



455482475



ภาพที่ 10 โครงสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

(ก) Paraphyses

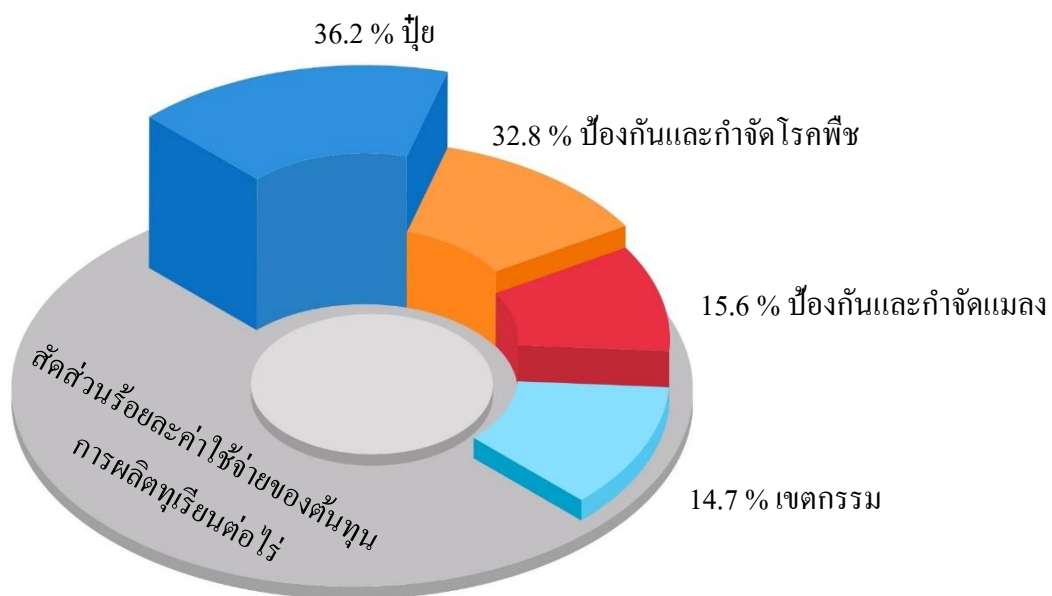
(ข-ค) Conidiogenous cells และ Conidia แรกเกิด

(ง-ช) โคนิเดียที่เจริญเต็มที่

(ซ-ญ) โคนิเดียที่ Hyaline ยังเกิดไม่สมบูรณ์ (Alves, Crous et al. 2008)

#### 4. การป้องกันและกำจัดโรคที่เกิดในทุเรียน

ทุเรียนเป็นพืชที่ต้องการ การเอาใจใส่เป็นพิเศษและสม่ำเสมอ ตลอดการปลูกจะพบว่ามี การใช้สารเคมีตลอดวงจรนับตั้งแต่การเพาะกล้าจนกระทั่งให้ผลผลิต หรือตลอดจนอายุขัยของต้น ทุเรียน ต้นทุนการผลิตทุเรียนมีค่าใช้จ่ายอยู่ที่ 12,000 บาทต่อไร่ โดยค่าใช้จ่ายทั้งหมดแบ่งออกเป็น ค่าใช้จ่ายในการใส่ปุ๋ย 36.9 เปอร์เซ็นต์ ค่าใช้จ่ายในการป้องกันและกำจัด โรค 32.8 เปอร์เซ็นต์ ค่าใช้จ่ายในการป้องกันและกำจัดแมลง 15.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่าใช้จ่ายในด้านเกษตรกรรม 14.7 เปอร์เซ็นต์ ภาพที่ 11 (สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก, ศิริพร วรกุลดำรงชัย et al. 2545) ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้กำจัดศัตรูพืชมากขึ้น อีกทั้งสารกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้มีความเป็นพิษร้ายแรงทั้งผู้ใช้งาน และผู้ซื้อผลไม้มที่มีสารเคมีตกค้างมารับประทาน เมื่อมีการใช้ที่มากเกินไปจนความจำเป็นและไม่กำจัดด้วยวิธีที่ ถูกต้อง จะทำให้เกิดการสะสมลงดิน แหล่งน้ำ อากาศ ในขณะที่ประสิทธิภาพของการกำจัดศัตรูพืช มีเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่จะไปถึงศัตรูพืชเป้าหมาย แต่อีก 99 เปอร์เซ็นต์ จะปนเปื้อนลงสู่ สิ่งแวดล้อม สำหรับสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันและกำจัด โรค อาทิ ออร์กาโน ฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน คาร์บาเมต เมทาแลกซิล ฟอสเอทิลอะลูมิเนียม เทอร์ราคลอร์ ฟอสฟอรัสแอซิด เมื่อมีการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องส่งผลให้เกิดการสะสม ดังแสดงในภาพที่ 12 (ปีทมา เสนทอง, กชพรรณ หนูชนะ et al. 2563) ได้ทำการศึกษาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างใน ดินด้วยชุดทดสอบยามาแมลงและสารพิษตกค้าง จีที ตลอดจนน้ำที่ใช้บริโภคของครัวเรือนในสวน ทุเรียน จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 48 ครัวเรือน ผลการทดสอบว่าที่สารพิษตกค้างในดิน และ น้ำบริโภคร้อยละ 54.17 และ 56.25 ตามลำดับ อีกทั้งจากรายงานการส่งออกทุเรียนและบริโภคใน ประเทศ พบปัญหาการตกค้างของสารเคมีซึ่งเป็นผลให้ราคาการส่งออกของทุเรียนไทยถูกกดให้ ต่ำลง และอาจร้ายแรงจนถึงขั้นสูญเสียตลาดให้แก่ประเทศคู่แข่ง (โศกนาฏกรรมทุเรียนไทย ไทยรัฐ ออนไลน์, 2560) ดังนั้นการดูแลรักษาต้นทุเรียนให้แข็งแรง เกิดความต้านทานต่อโรค และฟื้นฟูดิน และสิ่งแวดล้อมในสวน ควรมุ่งเน้นไปที่แหล่งที่มาของปัญหานั้นคือการสะสมของเชื้อก่อโรคใน ดินที่สารเคมีไม่สามารถซึมไปถึง ในการนี้การเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติทนทานต่อ สิ่งแวดล้อม เจริญได้เร็ว เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรค และเป็นตัวช่วยย่อยสลายสารอาหารในดินให้ อยู่ในรูปที่พร้อมใช้สำหรับพืช เมื่อดินอุดมสมบูรณ์ โรคน้อย เกษตรกรจึงจะสามารถเพาะปลูก ทุเรียนได้อย่างยั่งยืน ดังนั้นเชื่อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทจึงมีแนวโน้มที่จะพัฒนาให้เป็นชีวภัณฑ์ ควบคุมโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ (Sreevidya, Gopalakrishnan et al. 2016)



ภาพที่ 11 สัดส่วนค่าใช้จ่ายต้นทุนในการผลิตทุเรียนต่อไร่  
(สุขวัฒน์ จันทรปรณิก, ศิริพร วรกุลดำรงชัย et al. 2545)

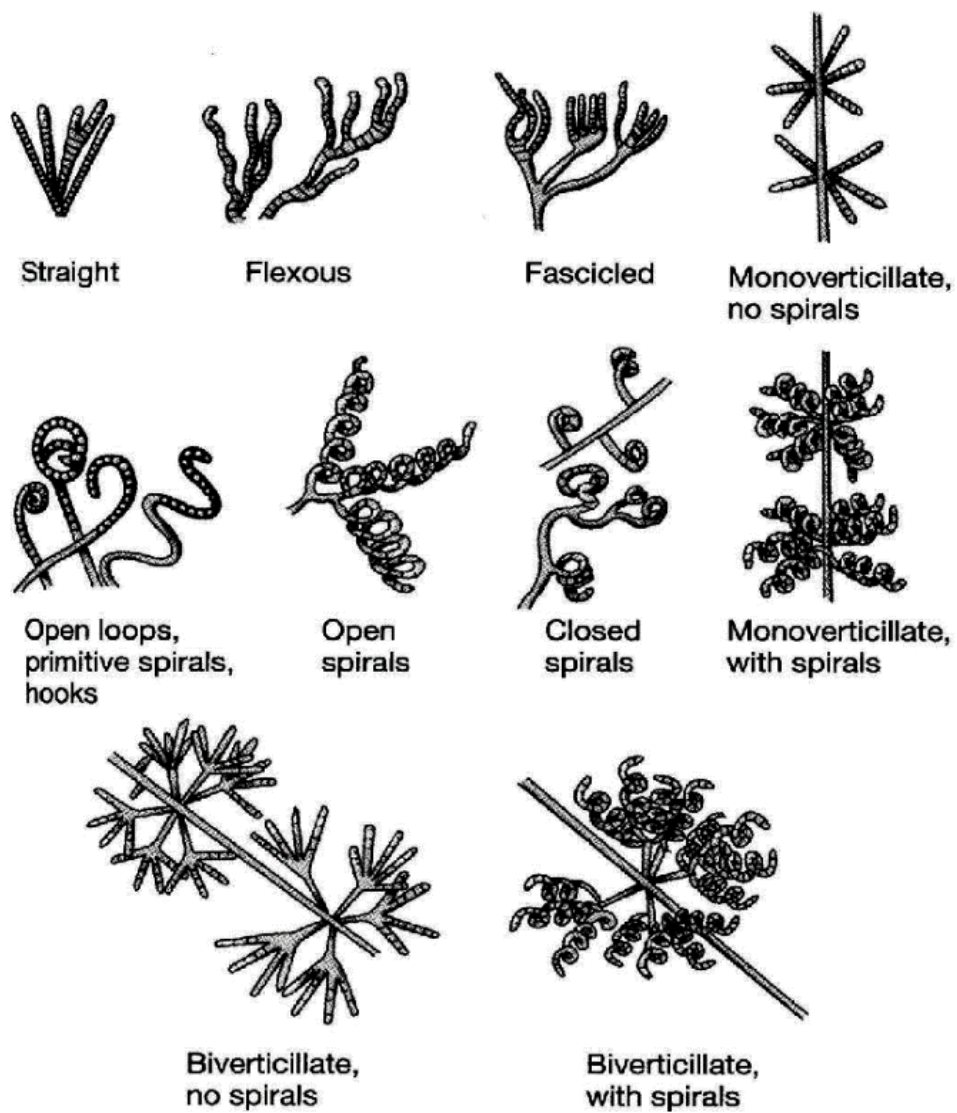


ภาพที่ 12 การฉีดยาเข้าลำต้นเพื่อรักษาอาการเน่าของลำต้นและทุเรียนยืนต้นตาย

## 5. ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท

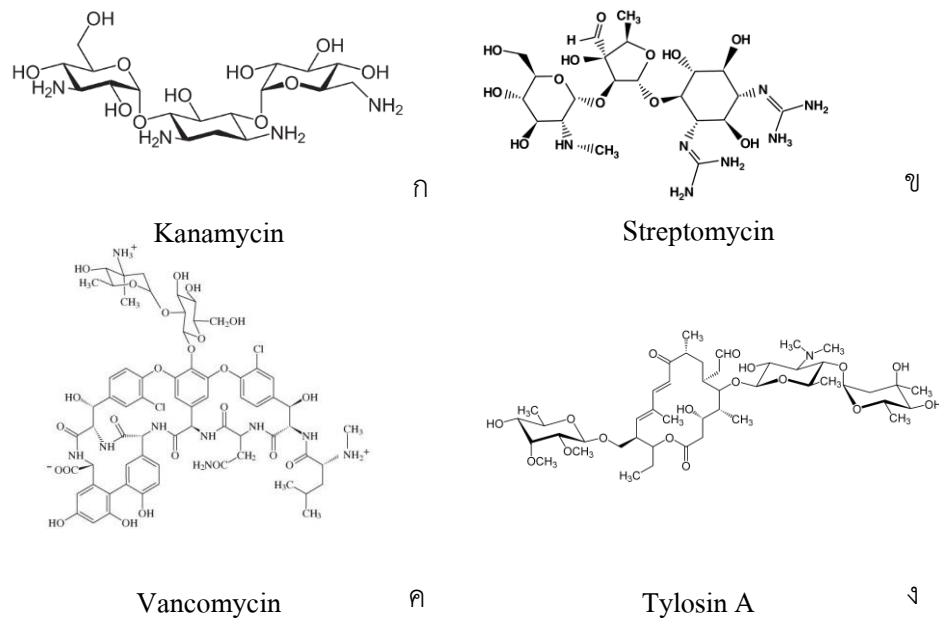
แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ส่วนใหญ่พบในดินที่อุดมสมบูรณ์ สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) เป็นสายยาวซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร เส้นใยเดี่ยว ๆ มีความหนาประมาณ 0.4-1.3 ไมโครเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วมีผนังและยึดยาวออกที่ส่วนปลายเส้นใย และสามารถสร้างเป็นกิ่งแขนงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะเวลาที่มีการเจริญ องค์ประกอบภายในเซลล์ของเส้นใยก็เช่นเดียวกับองค์ประกอบในเซลล์ของโปรคาริโอตทั่วไป คือมีไซโทพลาซึมที่มี fibrillar DNA มี ribosome และ โครงสร้างขนาดเล็กที่อยู่ในภายในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างที่สะสมอาหาร เช่น โพลีฟอสเฟต ไลปิด หรือสาร โพลีแซคคาไรด์มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmamembrane) และอาจมี mesosomes ซึ่งจะต่อเชื่อมกับโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยผนังของเส้นใยจะประกอบด้วยผนังชั้นเดียวหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ผนังเส้นใยของ vegetative hyphae ที่ไม่แตกหักก็มีลักษณะโครงสร้างเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเรียกได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ Mol %G+C ที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือประมาณ 55-78 % ในขณะที่เส้นใยเหนือผิวอาหารจะประกอบด้วย fibrous sheath ซึ่งเป็นชั้นบาง ๆ ที่ห่อหุ้มผนังเส้นใยอีกชั้นหนึ่งและ fibrous sheath นี้พบใน aerial hyphae ที่มีการสร้างสปอร์ด้วย ขึ้นกับลักษณะของสปอร์แต่ละชนิดว่าจะเป็นชนิดมีหนามหรือเป็นชนิดมีปุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 13 โคลโลนีของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจาก โคลโลนีของแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีลักษณะที่บ แสดงเส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งและมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า และสามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวโคลโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้น ๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น ผิวหน้าโคลโลนีอาจเรียบ (smooth) เป็นสันนูน (ridged) เหี่ยวย่น (wrinkled) เป็นเม็ด (granular) หรืออาจพบเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส (squamous) บางโคลโลนีอาจอัดกันแน่นหรืออาจมีหลาย ๆ โชนของการเจริญในลักษณะของ โคลโลนีที่เป็นวง ๆ หรือกระจายออกจากจุดศูนย์กลางในลักษณะรัศมี และมักจะมีสองโชน ส่วนขนาดของ โคลโลนีจะขึ้นอยู่กับอายุและภาวะของการเจริญและอาจมีความแตกต่างกันได้ตั้งแต่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรขึ้นไปจนถึงหลายเซนติเมตร (Moncheva P. and 2012) นอกจากการเจริญของ โคลโลนีและเส้นใยแล้วการสร้างสปอร์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญทางสัณฐานวิทยาที่ทำให้สามารถจำแนกลักษณะของแอกติโนมัยซีทได้ การสร้างสปอร์มีความหมายรวมไปถึงการแตกหักของเส้นใยเป็นท่อน ๆ ซึ่งสามารถเห็นได้จากแอกติโนมัยซีทในสกุล *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* และ *Intrasporangium* โดยสปอร์นั้นอาจเกิดขึ้นเดี่ยว ๆ หรือเกิดเป็นเส้นสายสั้น ๆ และโดยทั่วไปแล้ว

บริเวณที่จะทำหน้าที่เป็นสปอร์จะมีความหนามากกว่าเส้นใย แต่ในบางชนิดที่มีการสร้างสปอร์เป็นเส้นสายยาว ๆ มักจะมีขนาดเท่า ๆ กับขนาดของเส้นใย ความหนาของสปอร์จึงมีประมาณ 1-2 ไมโครเมตร ในแอกติโนมัยซีทบางจำพวกสามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้อีกด้วย (planospores หรือ zoospores) ยกตัวอย่างเช่น ในสกุล Actinoplanes สปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (aplanospore) อาจมีผิวเรียบ หรือมีผิวที่ขรุขระ ยกตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม *Streptomyces* นั้นมีผิวสปอร์อยู่หลายแบบ เช่น ผิวเรียบ (smooth) มีขน (hairy) เป็นหนามแหลม (spine) เป็นปุ่ม ๆ (warty) เขี้ยวขุ่น (rugose) เรียงต่อกันเป็นสาย หรือเป็นตุ่มเล็ก ๆ ตลอดจนเป็นสปอร์ที่สร้างอยู่ภายในอับสปอร์ เป็นต้น และมีรูปร่างหรือผิวสปอร์ที่แตกต่างกันไป และที่สำคัญแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่ม แอกติโนมัยซีทสามารถสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะและสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส และ โปรโตซัว (Bundale, Begde et al. 2018) โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทสามารถมีชีวิตอยู่ได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์เพียงเล็กน้อยที่มีอยู่ในดินนั้น อย่างไรก็ตาม แอกติโนมัยซีทในดินมักพบอยู่ในระยะพักตัวในลักษณะของสปอร์ ต่อเมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเหมาะสมเช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมก็จะมีการงอกของสปอร์และสร้างเป็นเส้นใยขึ้น นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทสามารถทนความร้อนและความเย็นได้ดี เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ pH ต่ำกว่า 6 ในด้านการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของแอกติโนมัยซีทนั้น สกุลที่พบว่ามีการสร้างสารแอนติไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด ได้แก่สกุล *Streptomyces* และเมื่อเปรียบเทียบการสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่าแอกติโนมัยซีทยังเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารเหล่านี้มากที่สุดถึง 2 ใน 3 ของสารแอนติไบโอติกทั้งหมดที่มีการใช้ในปัจจุบัน ตัวอย่างแอนติไบโอติกที่ผลิตจากเชื้อแอกติโนมัยซีทได้แก่ Chloramphenicol Cycloheximide, Cycloserine และ Erythromycin ซึ่งถูกค้นพบในปีคริสต์ศักราช 1948 - 1952 ในส่วนของยาปฏิชีวนะ อาทิ Kanamycin, Lincomycin, Neomycin, Nystatin, Rifamycin, Streptomycin, Tetracycline และ Vancomycin ถูกค้นระหว่างปีคริสต์ศักราช 1943 - 1957 ดังแสดงในภาพที่ 14 (Kumar, Mishra et al. 2010) นอกจากนี้ แอกติโนมัยซีทยังมีบทบาทที่สำคัญในทางนิเวศวิทยาช่วยให้มีการหมุนเวียนของสารต่าง ๆ ในธรรมชาติโดยการช่วยย่อยสลายอินทรีย์สารต่าง ๆ เพื่อนำกลับมาใช้ได้ใหม่โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดฮิวมิก นับว่าหากนำแอกติโนมัยซีทเหล่านี้มาใช้ในทางการเกษตรจะสามารถจะช่วยลดการระบาดของโรคพืชและส่งเสริมการเจริญแก่พืชได้เป็นอย่างมาก (Chaiharn, Theantana et al. 2020)



ภาพที่ 13 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*

(Ranjani, Dharumadurai et al. 2016)



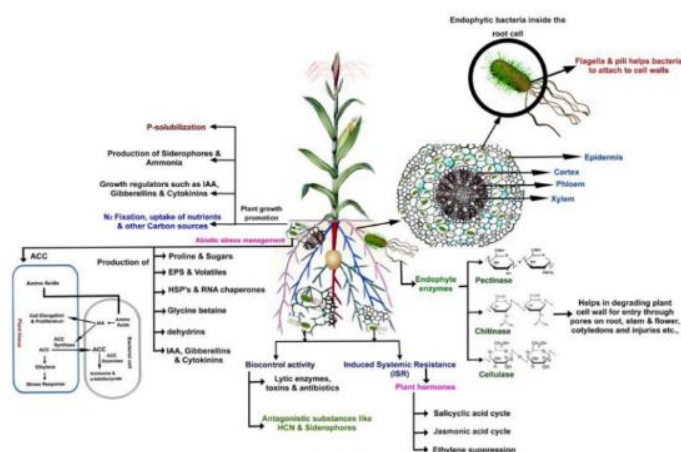
#### ภาพที่ 14 ตัวอย่างของสารแอนติไบโอติกที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีท

(Gao, Wu et al. 2017) (Daniel 2005) (Rubinstein and Keynan 2014) (Sanderson, Brown et al. 2019)

#### 6. ความสำคัญของแอคติโนมัยซีทต่อพืช

ปัจจุบันมีการวิจัยและใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมโรคพืชเพื่อลดการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัด ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทต่อการเกษตร เช่นเดียวกัน โดยถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมโรคระบาดของพืชหรือเรียกโดยทั่วไปว่าการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี แอคติโนมัยซีทมีความสามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราและสารต้านแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้หลากหลาย อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร และมีการสร้างสารเมตาบอไลต์หรือ เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ไซลันเนส (xylanase) เซลลูเลส (cellulase) อะไมเลส (amylase) และไคตินเนส (chitinase) เป็นต้น (Mohan and Charya 2012) แอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้นั้นมักพบได้ในดินที่อยู่บริเวณรอบรากพืช โดยกลไกที่แอคติโนมัยซีทใช้ในการอารักขาพืชนั้นมีด้วยกันหลายวิธีทั้งทางตรงและทางอ้อม อาทิ การที่แอคติโนมัยซีทสามารถย่อยสลายอินทรีย์สารให้อยู่ในรูปที่พร้อมใช้งานสำหรับพืชจะช่วยให้พืชได้รับสารอาหารที่เพียงพอต่อการแตกยอด การยึดของลำต้นผนังเซลล์มีความแข็งแรงทำให้ยากต่อการเข้าติดเชื้อของเชื้อก่อโรค พืชเกิดความต้านทานต่อโรคที่หลากหลยและมีความคงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ และส่งผลให้เกิดการยึดครองพื้นที่ทำให้เชื้อราก่อโรคต่าง ๆ ไม่สามารถเจริญขึ้นมาได้ และจุดเด่นสำคัญของแอคติโนมัย

ซึ่งนั่นคือการสร้างสารทุติยภูมิซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเมื่อสารที่แอคติโนมัยซีทผลิตขึ้นนี้แพร่ลงสู่ดินจะช่วยยับยั้งการงอกของสปอร์และเส้นใยเชื้อราได้เป็นอย่างดี (D'angelo, de Souza et al. 2016) ซึ่งหากมีการนำแอคติโนมัยซีทมาใช้ในแปลงเพาะปลูกอาจทำให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนในการซื้อสารเคมีจำนวนมาก ข้อดีอื่น ๆ ที่จะตามมาคือการช่วยฟื้นฟูสภาพดินในระยะยาว ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ ลดสารเคมีตกค้าง อีกทั้งยังถือว่าการแก้ปัญหาได้อย่างตรงจุดเนื่องด้วยเชื้อก่อโรคส่วนใหญ่อยู่ในดินดังนั้นการใช้แบคทีเรียแอคติโนมัยซีทจากดินจึงจะตอบสนองต่อการแก้ปัญหาการระบาดของเชื้อก่อโรคได้ดีกว่า ดังแสดงในภาพที่ 15 (Yanti, Zainon et al. 2012)



ภาพที่ 15 ภาพรวมบทบาทของแอคติโนมัยซีทในดินต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช (Vurukonda, Giovanardi et al. 2018)

## 7. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของสารชีวภัณฑ์

ประสิทธิภาพที่ของจุลินทรีย์เมื่อนำไปใช้งานจริงส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตและองค์ประกอบของชีวภัณฑ์ ซึ่งชีวภัณฑ์มีหลากหลายรูปแบบในปัจจุบัน อาทิ เชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ผลิตให้อยู่ในรูปแบบแกรนูล (granule) รูปแบบเม็ด (tablet) รูปแบบครึ่งบนกระดาศ ตลอดจนรูปแบบผง (power) โดยสำหรับการผลิตเพื่อการค้านั้นพบว่ามักอยู่ในรูปแบบผง ดังนั้นการผลิตชีวภัณฑ์ให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสะดวกต่อการใช้งานในแปลงเกษตรจึงต้องมีการศึกษาสูตรที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตรที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่สามารถรักษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไว้ได้มากและนานที่สุด (Shahid, Han et al. 2021)

ผลิตภัณฑ์ในชื่อทางการค้า OMRI listed<sup>®</sup> ได้ผลิตสารชีวภัณฑ์โดยใช้ชื่อทางการค้า Soil-Balance เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับบำรุงพืช โดยผลิตจากเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces*

ถึง 12 สปีชีส์ ได้แก่ *Streptomyces janthinus*, *Streptomyces cinerochromogenes*, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptomyces atratus*, *Streptomyces aurantiogriseus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces violaceus*, *Streptomyces violascens*, *Streptomyces viridodiasticus*, *Streptomyces rectiverticillatum* และ *Streptomyces griseus*

ชวลิตร ตนะทิพย์ (2561) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ โดยการเก็บสปอร์ที่สร้างบน aerial mycelium ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้โดยเพิ่มปริมาณบนอาหารสังเคราะห์ IMA-2 และทดสอบวางกระดาษกรองชนิดต่าง ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรบนผิวหน้าของอาหารเพื่อรองรับ aerial mycelium พบว่าสามารถเก็บสปอร์บนกระดาษชนิด germination test paper ได้ดีที่สุดเฉลี่ยจากทั้ง 3 ไอโซเลท เท่ากับ  $4.13 \times 10^9$  สปอร์ต่อแผ่น จากนั้นนำแผ่นกระดาษที่รองรับสปอร์ไปทำให้แห้งเพื่อใช้เป็นชีวภัณฑ์และจากการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคยอดผักดาบในระยะกล้า ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Fusarium moniliforme* โดยใช้แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ใน อัตราการใช้ 1 แผ่นต่อน้ำ 1 ลิตร ก่อนนำไปเพาะปลูก ผลการทดสอบพบว่า ไอโซเลท CINv1 สามารถยับยั้งการเกิดโรคและทำให้ต้นกล้าข้าวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดในทุกชุดการทดสอบ (ชวลิตร ตนะทิพย์ and เกวลิณ คุณาศักดากุล 2561)

## 8. ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันแอคติโนมัยซีทแบคทีเรียได้รับความสนใจจากศาสตร์หลายแขนงเพื่อนำมาใช้แก้ปัญหาในด้านต่าง ๆ เช่นเดียวกับภาคการเกษตรที่มีการนำแอคติโนมัยซีทมาใช้เป็นตัวควบคุมการระบาดของโรคพืชเศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ ดังจะเห็นได้จากรายงานการวิจัยดังต่อไปนี้

มารุต ตั้งวัฒนาสุทธิพร (2558) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในจังหวัดจันทบุรีและจังหวัดตราด เพื่อยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในมังคุดและเงาะ จากการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินในสวนมังคุดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เมื่อทำการทดลองด้วยวิธี Dual culture technique โดยมีเชื้อแอคติโนมัยซีทมากถึง 18 ไอโซเลท ได้แก่ Act-75, Act-76, Act-81, Act-85, Act-90, Act-106, Act-116, Act-118, Act-119, Act-120, Act-129, Act-131, Act-133, Act-134, Act-135 Act-139, Act-143 และ Act-150 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ (มารุต ตั้งวัฒนาสุทธิพร 2558)

วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์ และ สมเกียรติ ทับทิม (2559) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรากพริกเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum capsici*,

*Curvularia lunata* และ *Fusarium solani* ด้วยวิธี Dual culture ผลการทดสอบเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ได้ดีบนอาหาร PDA คือ ไอโซเลท CS2 และ CS4 (78.92 เปอร์เซ็นต์ และ 78.61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ส่วนอาหาร MBS คือ ไอโซเลท CS2 และ CS5 (64.54 เปอร์เซ็นต์ และ 63.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *C. imnata* ได้ดีบนอาหาร PDA และ MBS คือ ไอโซเลท CS2 (78.84 เปอร์เซ็นต์ และ 72.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไอโซเลท CS2, CS3 และ CS5 ยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีบนอาหาร PDA (70.79, 69.09 และ 69.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่บนอาหาร MBS ไอโซเลท CS2 และ CS3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด (64.35 เปอร์เซ็นต์ และ 62.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารต่างชนิดกันพบว่าแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์บนอาหาร PDA ได้ดีกว่าอาหาร MBS ดังนั้นแอกติโนมัยซีท ไอโซเลท CS2, CS3, CS4 และ CS5 มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชทางการเกษตร (วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์ and สมเกียรติ ทับทิม 2559)

อรณิชา ดันติพลานนท์, เอกพันธ์ หมะหมื่น, ปัทมาศ อารีเอื้อ, กัลยา เหม่มล่า และ ชนินันท์ พรสุริยา (2559) ได้ทำการแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทปฏิบัติการเพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทบริเวณรอบอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่จำนวน 32 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้แบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทจำนวน 89 ไอโซเลท และคัดเลือกการเป็นปฏิบัติการต่อรา *C. oryzae* ด้วยวิธี dual culture พบว่า 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ได้สูงถึง 76.07 - 87.19 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่ได้จากการคัดเลือกอาจนำไปทดลองควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงปลูกได้ (อรณิชา ดันติพลานนท์, เอกพันธ์ หมะหมื่น et al. 2559)

นันทวุฒิ นิยมวงษ์ (2561) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น โรคเน่าคอดิน กล้าเน่า และโรคใบดิด โดยใช้แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินในจังหวัดลพบุรีและระยอง โดยแยกได้ทั้งหมด 293 ไอโซเลท โดยใช้อาหาร Starch casein agar นำทุกไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อ *Rhizoctonia solani* พบว่าแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบคิดเป็น 2.4 เปอร์เซ็นต์จากทั้งหมด โดยไอโซเลท EH50-1 มีความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด 40.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงไอโซเลทดังกล่าวในอาหาร ISP-2 สูตรที่ 1 สภาวะบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

พบว่าสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราทดสอบได้สูงสุดในวันที่ 3 จากการศึกษาชนิดของกรด Diaminopimelic acid (DAP) ในเซลล์ที่ถูกย่อยของ EH50-1 พบว่าเป็นชนิด LL-A<sub>2</sub>pm และการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S RNA gene ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลตดังกล่าว พบว่าอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* โดยใกล้เคียงกับ *Streptomyces carpinensis* มากที่สุด 99.92 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดจำแนกเป็น *Streptomyces carpinensis* EH50-1 งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า *S. carpinensis* EH50-1 มีศักยภาพในการควบคุมราก่อโรคพืช *R. solani* (นันทวุฒิ นิยมวงษ์ 2561)

ประวิทย์ ยอดปะนัน และ ปิรันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล (2562) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่เพาะปลูกเสาวรสม่อน อัญชัน และผักกระเฉด ที่ไม่เป็นโรคจากพื้นที่เพาะปลูกใน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ สำหรับใช้ควบคุมเชื้อก่อโรค ใบไหม้และผลเน่าของเสาวรสมสามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ได้ 96 ไอโซเลต และแยกเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคของเสาวรสมจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโงะ อ.เชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ได้ 6 ไอโซเลต (SN01-SN06) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์กับเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี Dual culture พบว่ามี 4 ไอโซเลต ได้แก่ PE04 PE06 CT18 และ CT20 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* sp. SN04 ได้สูงสุด 82.22, 84.44, 90.00 และ 91.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากคุณสมบัติทางชีวเคมีพบแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ไอโซเลต CT20 สามารถสร้างเซลลูเลส ไคตินเอส และอะไมเลส รวมถึงสารไซโตโรฟอรีนได้ จึงนำไอโซเลต CT20 มาทดสอบการควบคุมโรคด้วยวิธี Detached leaf และ Detached fruit พบว่าสามารถลดความรุนแรงการเกิดโรคบนใบและผลของเสาวรสมได้ เมื่อนำเชื้อรา *Phytophthora* sp. SN04 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS4 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และนำเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ไอโซเลต CT20 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *Streptomyces exfoliates* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ประวิทย์ ยอดปะนัน and ปิรันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล 2562)

Kun Xiao, Linda L. Kinkel และ Deborah A. Samac. (2002) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อควบคุมการเจริญของเชื้อรา การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุของโรครากเน่าในถั่วอัลฟาฟาและถั่วเหลือง โดยทำการแยกแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินทั้งหมด 3 รัฐ ได้แก่ มินนิโซตา เนบราสกา และวอชิงตัน สหรัฐอเมริกา จำนวนไอโซเลตที่แยกได้คือ 53 ไอโซเลต

และทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora* จำนวน 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Phytophthora medicaginis* และ *Phytophthora sojae* พบว่ามี *Streptomyces* จำนวน 8 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Xiao, Kinkel et al. 2002)

Chaiarn M, Theantana T และ Pathom-Aree W. (2020) ได้ทำการศึกษาแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากบริเวณรากของต้นข้าวจำนวน 112 ไอโซเลท จากการทดสอบพบว่าเชื้อ *Streptomyces* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PC12, D4.1, D4.3 และ W1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia* sp. สาเหตุของโรคไหม้ข้าว โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.3%, 82.2%, 80.0% และ 80.5% ตามลำดับ เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทในการทดลองระดับโรงเรือนพบว่าต้นข้าวที่ได้รับ *Streptomyces* สายพันธุ์ PC12 มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุดทั้งความสูง ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของราก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำแอคติโนมัยซีทไอโซเลทดังกล่าวไปศึกษาอนุกรมวิธานลักษณะของสายพันธุ์นี้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces palmae* PC12 แสดงให้เห็นว่า *S. palmae* PC12 อาจใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่มีความสำคัญทางการค้าและการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราโรคไหม้ข้าว (Chaiarn, Theantana et al. 2020)

AbdElgawad H, Abuelsoud W, Madany MMY, Selim S, Zinta G, Mousa ASM, Hozzein WN. (2020) ได้ทำการศึกษาถึงผลของการใช้แบคทีเรียแอคติโนมัยซีทในการฟื้นฟูดินและปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ด้วยการเพิ่มปริมาณของการตรึงไนโตรเจน ซึ่งการศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 17 ไอโซเลท ที่แยกได้จากบริเวณรากของถั่วที่ขึ้นอยู่ในจีนัส *Streptomyces* เมื่อนำแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ใส่ให้กับพืชตระกูลถั่วจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วลูกไก่ พี (Pae) และ เลนทิล (Lentil) ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าถั่วเหล่านี้มีอัตราการสังเคราะห์แสงและมีผลผลิตเพิ่มขึ้น จากการเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนในดิน และเอนไซม์อื่น ๆ ที่แสดงถึงคุณภาพของผลผลิต อาทิ วิตามิน และฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนซ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของเชื้อแอคติโนมัยซีท (AbdElgawad, Abuelsoud et al. 2020)

Song L, Jiang N, Wei S, Lan Z และ Pan L. (2020) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum dematium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในสวนสมุนไพร *Sarcandra glabra* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่สำคัญในวงศ์กระดังงา มีการเพาะปลูกในมณฑลกว่างซีของสาธารณรัฐประชาชนจีน อย่างไรก็ตามในการเพาะปลูกสมุนไพรจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในแปลงเพาะปลูก จึงได้ให้ความสนใจในการนำแอคติโนมัยซีทมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินและลำต้นของพืชได้จำนวน 15 ไอโซเลท

โดยมี 3 ไอโซเลท ได้แก่ JT-2F, DT-3F และ JJ-3F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. dematium* โดย JT-2F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดคิดเป็น 86.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ JT-2F ไปทำการจำแนกชนิดด้วยการศึกษาลำดับเบส 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces tsukiyonensis* (Song, Jiang et al. 2020)

He H, Hao X, Zhou W, Shi N, Feng J และ Han L. (2020) ได้ทำการศึกษาสารเมตาบอไลต์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ A217 ซึ่งผลการจำแนกคือเชื้อ *Streptomyces lienomycini* เชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด อาทิ *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* และ *Xanthomonas campestris* และจากผลการศึกษาสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC และยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วย Nuclear magnetic resonance พบว่าสารที่สร้างขึ้นส่งผลต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคคือ H-pyrrole-2-carboxylic acid และ 1H-pyrrole-2-carboxamide (He, Hao et al. 2020)

การวิจัยในด้านแอคติโนมัยซีทในประเทศไทยและต่างประเทศแม้จะมีมาก แต่ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นประเทศแห่งการเกษตรกรรมทำให้มีการระบาดของเชื้อก่อโรคพืชที่หลากหลาย ส่งผลให้ฐานข้อมูลการวิจัยที่มีอยู่ไม่ครอบคลุมต่อพืชเศรษฐกิจบางชนิด เช่น ทูเรียน ที่ต้องการการดูแลในด้านโรคพืชอย่างยิ่งยวด ตลอดจนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรค ควรได้รับการค้นพบอยู่เสมอเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชในระดับแปลงได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ ซึ่งยังไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่มีการนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์มากนัก และชีวภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเป็นที่รู้จักเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้น (Yadav, Verma et al. 2017) ดังนั้นงานนิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. จากดินในพื้นที่การเกษตร และพัฒนาชีวภัณฑ์จากแอคติโนมัยซีท

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Autoclave (HICLAVE HVE – 50, HIRAYAMA Manufacturing Corporation, Japan)
- Incubator (Contherm polar 1000c, Contherm Scientific, New Zealand)
- Vortex Mixers (S0200, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hot air oven (BINDER-ED 56, BINDER GmbH, Germany)
- Microwave (R247, Sharp, Thailand)
- Auto Pipett (G18315G, Eppendorf, Germany)
- Refrigerator (RT 300W, Hitachi, Japan)
- Biosafety Cabinet Class II (NANA-164300, PKR SCIENCE & SERVICES,

Thailand)

- Densitometer (DEN-1, Labnet international, Latvia)
- Cotton swab size M (SOFTIP, Longmed, Thailand)
- Round petri plates plastic sterile size 90mm x 15mm (SB93-101, CORNING,

France)

- Tube culture size 16 x 150 mm (9820, PYREX, Mexico)
- microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- Pipette tips size 1,000, 100, 10 ไมโครลิตร
- Alcohol Burner
- Gloves
- Cork borer

##### 1.2 สารเคมี

- Sodium chloride (Himedia, India)
- Ethanol
- Lactophenol cotton blue (Himedia, India)
- Glycerol (Himedia, India)



455482475

### 1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient agar (Himedia, India)
- Nutrient agar (Himedia, India)
- Potato dextrose agar (Himedia, India)
- starch casein agar (Himedia, India)
- BNPR

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากต้นทุเรียน

#### 2.1.1 การเก็บตัวอย่างรอยโรคของทุเรียน

สำรวจต้นทุเรียนในแหล่งเพาะปลูกทุเรียนของไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี และระยอง จากนั้นสุ่มเก็บส่วนต่าง ๆ ของต้นทุเรียน ที่แสดงอาการของโรครากเน่าและโคนเน่า รวมถึงอาการที่มีลักษณะรอยแผลเป็นสีชมพูซ้ำ ดำหรือน้ำตาล บรรจุลงถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ รวมตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ดังแสดงดังภาพที่ 16 (มารุต ตั้งวัฒนาชูลิพร 2558)



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการปฏิบัติงานและการยืนยันตำแหน่งของรอยโรค

#### 2.1.2 การคัดแยกเชื้อก่อโรคออกจากรอยโรค

การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจะใช้วิธี Tissue transplanting method โดยการนำชิ้นส่วนของต้นทุเรียนมาล้างด้วยน้ำจากก๊อกน้ำ และเปิดให้น้ำไหลผ่านชิ้นตัวอย่างเป็นเวลา 15 นาที

เพื่อกำจัดเศษดินและสิ่งปลอมปนที่ไม่ใช่เป้าหมาย จากนั้นตัดชิ้นตัวอย่างของต้นทุเรียน บริเวณแผล กับเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกโดยการแช่ชิ้นส่วน พืชในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ Clorox (1 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite) เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนกว่าจะหมดกลิ่นของ 10 เปอร์เซ็นต์ Clorox ชำชิ้นส่วนพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ นำชิ้นตัวอย่างวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกเชื้อรา BNPRA (benlate 50เปอร์เซ็นต์, nystatin, pentachloronitrobenzene, rifampicin และ ampicillin) จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมดบ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้อง (28 +2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลาประมาณ 3 - 4 วัน ตัดปลายเส้นใยที่เจริญเร็วกว่าเส้นใยอื่น ๆ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญเต็มจานอาหารจึงแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อไป (D'Angelico, de Souza et al. 2016)

### 2.1.3 การจำแนกชนิดของเชื้อราก่อโรคด้วยการศึกษาวิธีจุลทรรศน์ มหัตถฐาน และการคัดเลือกเชื้อราก่อโรคตัวแทนเพื่อการศึกษา

ศึกษาลักษณะจุลทรรศน์ของเชื้อราที่แยกได้จากรอยโรค โดยการทำให้ Slide culture และนำมาตรวจสอบลักษณะเส้นใย และโครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x ศึกษามหัตถฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของเชื้อราที่จำแนกได้ และบันทึกลักษณะโคโลนี ทั้ง ด้านบนโคโลนีและด้านล่างของโคโลนี (Wijedasa and Liyanapathirana 2012)

ทำการคัดเลือกตัวแทนเชื้อราก่อโรคที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ คือ เชื้อรา ที่นำมาศึกษาจะต้องเป็นเชื้อราในจีนัส *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. เท่านั้น นอกจากนี้ไอโซเลทที่คัดเลือกจะต้องมีลักษณะของมหัตถฐาน เช่น ลักษณะการเจริญของ เส้นใยฟู ราบ หรือเป็นกัมมะหยี่ สีของโคโลนี เป็นต้น การสร้าง Macro-conidia หรือ Micro-conidia หรือมีการสร้าง Fruiting body ตลอดจน Zoospore และอาจพบการสร้าง Clamydospore ที่ต่างจาก ไอโซเลทอื่น ๆ มีระยะการเจริญที่เหมาะสม เช่น ขนาดโคโลนีสามารถเจริญกระทั่งมีขนาด 9 เซนติเมตร ในระยะเวลาการเจริญระหว่าง 5-7 วัน เชื้อราเหล่านี้จะถูกนำมาคัดเลือกอีกครั้งเพื่อ ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราโรคพืชแต่ละไอโซเลท เนื่องจากเชื้อราที่ นำมาทดสอบจะต้องเป็นเชื้อราที่สามารถก่อโรคได้ โดยการปลูกเชื้อลงในใบทุเรียนพันธุ์ หมอนทองในระยะเพศลาด ด้วยวิธี detached leaf คัดแปลงจากวิธีการของ (มณีรัตน์ คุณาพิทักษ์ ธรรม 2562) ในขั้นแรกทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้น ใยเชื้อราด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นวัชที่มีเชื้อมาวางบนรอยแผล บนใบที่เกิดจาก cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียงอาหาร PDA จากนั้นทำการบ่มในกล่องควบคุมความชื้นเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส สังเกตรอยโรคที่เกิดบนใบ ทำการบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรค  
 ดังนั้นไอโซเลทที่มีคุณสมบัติดังกล่าวอย่างน้อยจีเนสละ 1 ไอโซเลทจะถูกใช้เพื่อการศึกษาในครั้งนี้

#### 2.1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS

ทำการเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลทบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นทำการ  
 เก็บในรูปแบบของ Stock glycerol และส่งตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ ITS region  
 กับบริษัท Macrogen สาธารณรัฐเกาหลี (Schoch, Seifert et al. 2012)

### 2.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่การเกษตร

#### 2.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินโดยแยกดินในพื้นที่การเกษตรอินทรีย์จากสามแหล่ง โดยแบ่งเป็น  
 จังหวัดจันทบุรี 50 ตัวอย่าง จังหวัดตราด 50 ตัวอย่าง และจังหวัดชลบุรี 50 ตัวอย่าง  
 รวม 150 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 กรัม โดยจุดลึกประมาณ 0 - 10 เซนติเมตร (Sapkota, Thapa et al.  
 2020)

#### 2.2.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินจากแต่ละแหล่งมาเจือจางอัตราส่วนของดิน (กรัม) : starch casein broth  
 (SCB) เป็น 5:45 จากนั้นเขย่าให้ดินกระจายทั่วทั้งพลาสติก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส  
 นาน 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางตัวอย่างดินโดยการดูดสารละลายแขวนลอยที่ความเข้มข้น  $10^{-1}$   
 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลาย SCB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้  
 ตัวอย่างที่มีการเจือจางที่  $10^{-2}$  จากนั้นนำไปเจือจางต่อจนได้ค่าการเจือจาง  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  ดูดสารละลาย  
 ของแต่ละค่าการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ISP-2 agar + cycloheximide +  
 nalidixic acid ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน (Lee,  
 Zainal et al. 2014)

#### 2.2.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทด้วยการศึกษาวิธีจุลสังฐานและมหสังฐาน

คัดเลือกโคโลนีจากลักษณะมหสังฐานที่ยึดติดแน่นบนเนื้ออุ่น ขรุขระ หรือมีลักษณะ  
 คล้ายผงแป้ง มีสีของโคโลนี เทา ขาว เขียว แดง ม่วง เหลือง ดำ หรือสีส้ม จากนั้นทำการศึกษา  
 ลักษณะของจุลสังฐาน โดยการย้อมแบบ Gram's stain จะพบเส้นใยที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม เส้นใยสั้น  
 ดิดสีม่วง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x จากนั้นจึงเลี้ยงโคโลนีดังกล่าวให้มีความ  
 บริสุทธิ์ด้วยอาหาร International *Streptomyces* Project-2 (ISP-2) จัดเก็บใน Glycerol stock ที่  
 อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทำการกำหนดรหัสตัวอย่าง ก่อนการนำไปทดสอบในลำดับต่อไป  
 (Lee, Zainal et al. 2014)

### 2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค

นำแอคติโนมัยซีทมาคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคโดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยนำแอคติโนมัยซีทมาจัดบนอาหาร PDA ให้ก่อนไปทางหนึ่งห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้แอคติโนมัยซีทปรับตัวเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำราก่อโรคที่ตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในทิศตรงข้ามกับแอคติโนมัยซีทห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ชุดควบคุมทำการทดลองโดยวางราก่อโรคเพียงเชื้อเดียวห่างจากขอบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เมื่อราก่อโรคในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร (7 - 14 วัน) วัดขนาดรัศมีของเชื้อสาเหตุ โรค (Kunova, Bonaldi et al. 2016) จากนั้นนำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรค ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1

R1 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุของโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุของโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

### 2.4 การศึกษาผลของแสงยูวี กรด-ด่าง และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการเจริญ

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น แสงยูวี ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

เปรียบเทียบการรอดชีวิตภายใต้แสง UV ที่เวลาแตกต่างกันที่ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้ความเป็นกรด-ด่าง จะนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5, 6, 7, 8 และ 9

สำหรับการทดสอบอุณหภูมิจะนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ (Vijayakumar 2009)

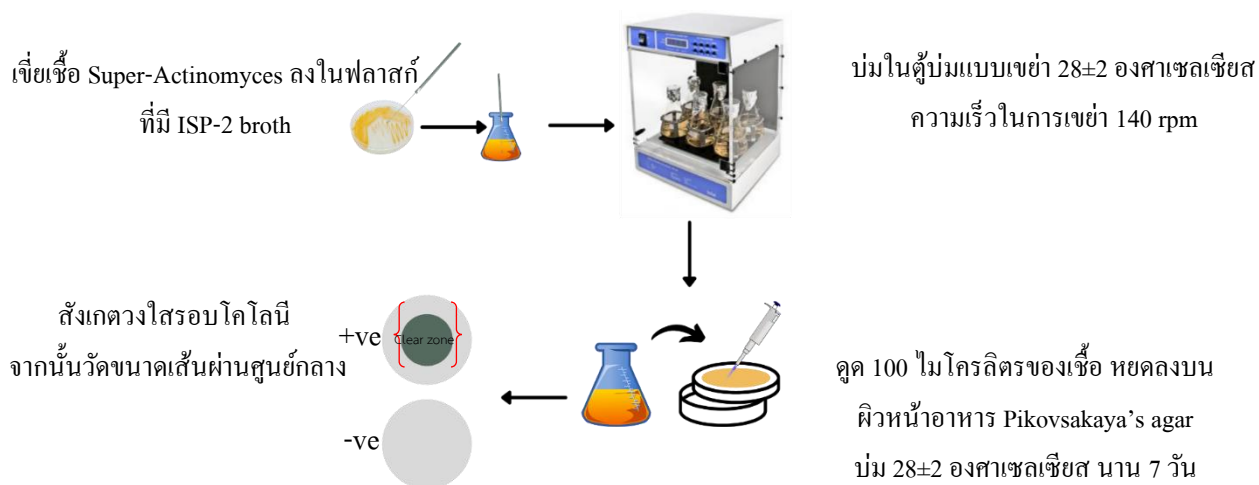
### 2.5 การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทบนอาหาร NA เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเก็บในรูปของ Stock glycerol และส่งตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับเบส 16S rRNA กับบริษัท MacroGen สาธารณรัฐเกาหลี

## 2.6 การศึกษาคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์บางชนิด

### 2.6.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตส

เลี้ยงเชื้อ Super-Actinomyces ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ชนิดเหลวจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อคือ อุณหภูมิ  $28\pm 2$  องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 140 rpm ระยะเวลา 5 วัน (Shantikumar, Indra et al. 2006) เมื่อได้เชื้อ Super-Actinomyces ที่สมบูรณ์แล้ว คูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Pikovsakaya's agar (PVA) (Yeast extract 0.5 g, Dextrose 10 g, Calcium phosphate 5 g, Ammonium sulphate 0.5 g, Potassium Chloride 0.2 g, Magnesium sulphate 0.1 g, Manganese sulphate 0.0001 g, Ferrous sulphate 0.001 g, Agar 15 g, Distill water 1000 mL, Final pH 7.2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $28\pm 2$  องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน หาก Super-Actinomyces สามารถละลายสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ จะพบ clear zone รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ บนที่กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร (Rathore, Yasmin et al. 2012) ภาพรวมการทดสอบการสร้างฟอสฟาเตสแสดงดังภาพที่ 17

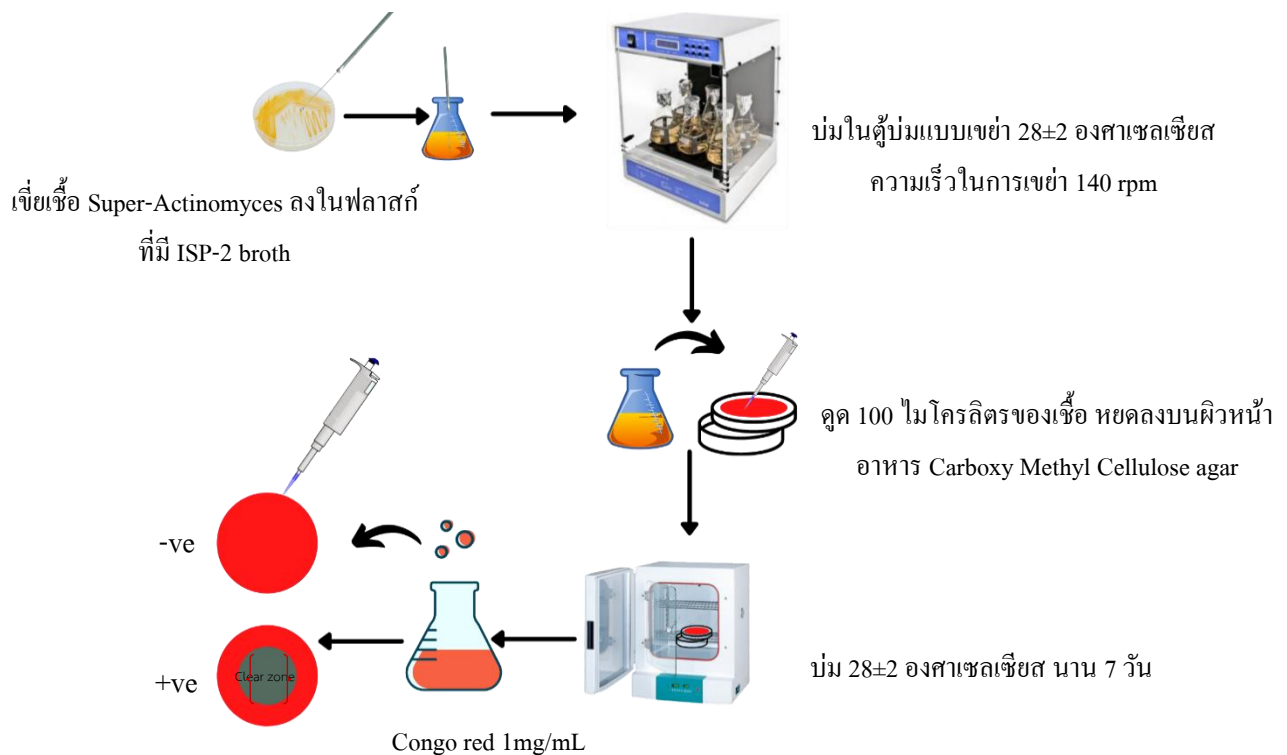


ภาพที่ 17 แผนภาพการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ Super-Actinomyces

### 2.6.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อ Super-Actinomyces ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ชนิดเหลวจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อคือ อุณหภูมิ  $28\pm 2$  องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 140 rpm ระยะเวลา 5 วัน (L. Shantikumar Singh Singh, Indra Baruah and T.C. Bora, 2006) เมื่อได้เชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลทแล้ว คูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose agar (CMC) (Carboxy methyl cellulose 0.5 g,  $\text{NaNO}_3$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 g,

KCL 0.1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, Yeast extract 0.05 g, Glucose 0.1 g, Agar 17 g, Distill water 1,000 mL, Final pH 7.2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน การอ่านผลจะใช้ Congo red visualization method โดยเตรียมสารละลาย Congo red เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิตร จากนั้นหยดสารละลาย Congo red ลงบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 M นาน 15 นาที บริเวณที่เซลล์ถูกเปลี่ยนให้เป็น β 1-4 glucans จะไม่ติดสี Congo red และปรากฏ clear zone บนที่กึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร (Rathore, Yasmin et al. 2012) ภาพรวมการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แผนภาพการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของ Super-Actinomyces

### 2.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

นำเชื้อ Super-Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคมมาเลี้ยงในอาหาร Urea base agar ที่เติม Urea เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีส้มไปเป็นสีชมพู (Morou-Bermudez and Burne 2000)

#### 2.6.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

เชื้อ Super-Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคมะเร็งในอาหาร Starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสจะทำให้สังเกตได้จากวงใสรอบโคโลนี เมื่อหยดสารละลายไอโอดีน (Kafilzadeh and Dehdari 2015)

#### 2.6.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อ Super-Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค มาสัมผัสกับสารละลาย  $H_2O_2$  หากเชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส จะพบว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นทันที (Vurukonda, Giovanardi et al. 2018)

### 2.7 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์จากแอคติโนมัยซีทในรูปแบบผง

ทำการพัฒนาชีวภัณฑ์สำเร็จรูปจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อการควบคุมเชื้อก่อโรคในรูปแบบผง เพื่อให้ง่ายต่อการใช้งานในสวนทุเรียนและมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน โดยกระบวนการผลิตจะดำเนินการตามสูตร จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยในแต่ละเดือนจะนำชีวภัณฑ์ที่ได้มาศึกษาจำนวนของเซลล์ในหน่วย CFU/g ซึ่งกระบวนการผลิตจะประกอบด้วยส่วนแรกการเพิ่มปริมาณเชื้อ Super-Actinomyces และส่วนที่สองเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์

การเพิ่มปริมาณเชื้อ Super-Actinomyces จะเริ่มจากนำเชื้อ Super-Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการนำ NSS ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ก่อนหน้า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วย้ายเซลล์ทั้งหมดลงเลี้ยงในพลาสติกที่บรรจุอาหารเหลว NB ที่มีการเติม glucose เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง McFarland Densitometer ให้ได้ No.10 ซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นเซลล์อยู่ประมาณ  $3.0 \times 10^9$  CFU/mL (วารกรณ์ ภูักคีพันธ์ and สุกฤดี ประเทืองวงศ์ 2553)

การเพิ่มปริมาณสปอร์ของ Super-Actinomyces จะใช้ลูกปัดที่มีขนาด 10 ไมโครลิตร จุ่มลงสารละลายเซลล์ของ Super-Actinomyces ที่เตรียมไว้จากกระบวนการก่อนหน้า จากนั้นฉีดลงบนอาหาร NA ในลักษณะต่างๆ โดยให้เกิดช่องว่างน้อยที่สุด อย่างน้อย 4 รอย นำบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อพบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์จำนวนมากจึงใช้ช้อนปากแบนขูดเฉพาะส่วนของสปอร์และเส้นใยอากาศของเชื้อใส่ลงภาชนะแก้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 45

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำผงแห้งของเชื้อ 0.5 กรัม (แต่ละไอโซเลทจะชั่งมา 0.1 กรัม) มาผสมกับส่วนประกอบต่าง ๆ โดยมีสัดส่วน ดังนี้ talcum, calcium carbonate, CMC และ glucose ในอัตราส่วน 60:30:8:1.5 โดยส่วนผสมต่าง ๆ ได้ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ มาเรียบร้อยแล้ว

นำ 1 กรัมของผงชีวภัณฑ์สำเร็จของแต่ละสูตร ไปทำการนับจำนวนด้วยวิธี spread plate การทดสอบการรอดชีวิตที่ระยะเวลาเริ่มต้น และเมื่อเก็บรักษานาน 1, 2 เดือน และ 3 เดือน โดยใช้เทคนิค dilution spread plate บนอาหารแข็ง ISP-2 ที่มีการเติม cycloheximide (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ nalidixic acid (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Lee, Zainal et al. 2014) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในหน่วยของ CFU/g



455482475

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากต้นทุเรียน

การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากต้นทุเรียนได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างรอยโรคในช่วงเดือนกันยายน 2563 โดยได้ดำเนินการเก็บจากพื้นที่เพาะปลูกทุเรียนจำนวน 2 แห่ง แบ่งเป็นจังหวัดระยองจำนวน 3 สวน และจังหวัดจันทบุรีจำนวน 2 สวน สามารถจำแนกผลการศึกษาดังตารางที่ 2

##### 1.1 การเก็บตัวอย่างรอยโรคของทุเรียน

จากการสำรวจโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในพื้นที่เพาะปลูกทุเรียน ตามแผนที่คาดการณ์ไว้คือ การสอบถามเกษตรกรผู้เป็นเจ้าของสวนเพื่อระบุต้นทุเรียนที่มีอาการของโรครากเน่าโคนเน่า จากนั้นได้รับความอนุเคราะห์จากผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรคพืช อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ในการยืนยันลักษณะอาการของต้นทุเรียนที่ติดเชือรากเน่าโคนเน่า จากนั้นจึงใช้เหล็กขูดเพื่อเปิดปากแผล และกำจัดเปลือกนอกออกไป และไปใบมีดที่มีความคมปราศจากเชื้อกรีดเฉพาะรอยแผลด้านใน จากนั้นนำชิ้นส่วนรอยโรคใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ การทำในลักษณะดังกล่าวจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม และได้รับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคที่แท้จริง และดำเนินการแยกเชื้อโรคในลำดับต่อไป ภาพที่ 19-20



ภาพที่ 19 การเก็บตัวอย่างรอยโรคทุเรียนบริเวณที่ปรากฏอาการเน่า

- (ก) การขูดลอกเปลือกและผิวส่วนบนของรอยแผล
- (ข) การกรีดชิ้นตัวอย่างรอยโรคด้วยใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อ



ภาพที่ 20 รอยโรคที่เกิดบริเวณส่วนต่าง ๆ ของทุเรียน

(ก) บริเวณราก

(ข) ลำต้น

(ค) กิ่ง

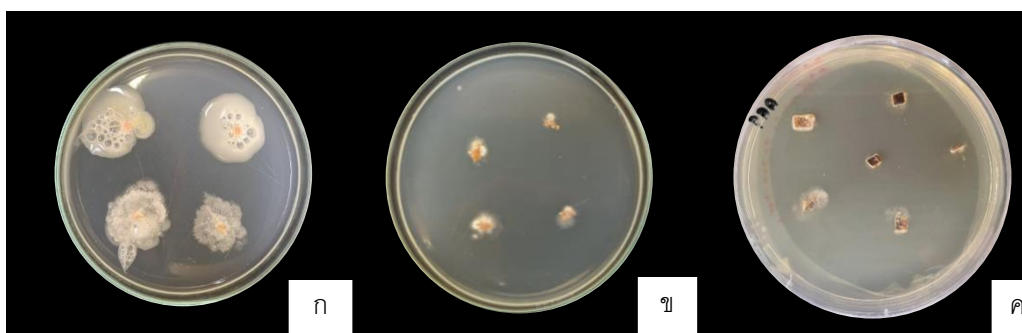
(ง) อาการของใบเมื่อต้นทุเรียนถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย

ตารางที่ 2 รายละเอียดของแหล่งที่มาของตัวอย่าง โรครากเน่าโคนเน่าจากต้นทุเรียน

สวนที่	จังหวัด	อำเภอ	ชื่อสวน	ตำแหน่งละติจูด-ลองจิจูด	ขนาดพื้นที่ (ไร่)	จำนวนต้นทุเรียน	อายุต้นทุเรียน	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ
1	ระยอง	วังจันทร์	ฉวีวรรณ	12.934782512230036, 101.56022199586799	20	270	20-24 ปี	15
2	ระยอง	แกลง	บ้านสวนทุเรียนข้าวหอมใบเตย	12.818545951270421, 101.59454309486861	25	420	40ปี และ 10-15 ปี (เราเก็บอายุระหว่างนี้)	7
3	ระยอง	แกลง	คุณชาญณรงค์ดีหมั่น	12.801309472858195, 101.77037306116877	20	400	10-30 ปี	5
4	จันทบุรี	เขาคิชฌกูฏ	สวนทุเรียนสุขเกษม	12.808670544745839, 101.86946214704165	90	1500	10-20 ปี	5
5	จันทบุรี	เขาคิชฌกูฏ	คุณวุฒิสักดิ์สงเคราะห์	12.613010205137938, 102.17701287026898	17	250	10-20 ปี	18

## 1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคด้วยวิธี Tissue transplanting

การแยกเชื้อแบ่งเป็นสองส่วนคือการแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. และเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และแยกเชื้อรา *Phytophthora* spp. ด้วยอาหาร PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะมีชื่อเรียกอย่างสามัญว่า BNPRA (benlate, nystatin, pentachloronitrobenzene, rifampicin และ ampicillin) การคัดแยกเชื้อราก่อโรคจะใช้วิธี Tissue transplanting method นำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่างรอยโรควางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองประเภท เมื่อระยะเวลาการบ่มผ่านไป 3 วัน พบว่ามีเส้นใยสีขาวเริ่มปรากฏขึ้นบริเวณรอบ ๆ ชิ้นตัวอย่าง ใช้เข็มเจียปราศจากเชื้อเจียเส้นใยลงในอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อก่อโรคและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เช่นนี้ต่อไปทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยจำนวนไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท แบ่งเป็น สวนฉวีวรรณ (อำเภอวังจันทร์ จังหวัดระยอง) แยกเชื้อราจากตัวอย่างรอยโรค ได้จำนวน 15 ไอโซเลท รหัสเชื้อ G1S1, G1S2, G1S3, G1S4, G1S5, G1S6, G1S7, G1S8, G1S9, G1S10, G1S11, G1S12, G1S13, G1S14 และ G1S15 บ้านสวนทุเรียนข้าวหอมใบเตย (อำเภอแกลง จังหวัดระยอง) รหัสเชื้อ G2S1, G2S2, G2S3, G2S4, G2S5, G2S6 และ G2S7 สวนคุณชาญณรงค์ ดีหมั่น (อำเภอแกลง จังหวัดระยอง) รหัสเชื้อ G3S1, G3S2, G3S3, G3S4 และ G3S5 สวนทุเรียนสุขเกษม (อำเภอเขาภิขณภูมิ จังหวัดจันทบุรี) รหัสเชื้อ G4S1, G4S2, G4S3, G4S4 และ G4S5 และสวนสุดท้ายคือ สวนคุณวุฒิศักดิ์ สงเคราะห์ (อำเภอเขาภิขณภูมิ จังหวัดจันทบุรี) รหัสเชื้อ G5S1, G5S2, G5S3, G5S4, G5S5, G5S6, G5S7, G5S8, G5S9, G5S10, G5S11, G5S12, G5S13, G5S14, G5S15, G5S16, G5S17, G5S18 ตารางที่ 3



ภาพที่ 21 การแยกเชื้อ *Phytophthora* spp. *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia* spp. ด้วยวิธี Tissue transplanting

(ก) การแยกเชื้อรา *Phytophthora* spp. ด้วยอาหาร PPA + BNPR

(ข) การแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยอาหาร PDA

(ค) การแยกเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ด้วยอาหาร PDA

ตารางที่ 3 จำนวนไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างรอยโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

สวนที่	จังหวัด	อำเภอ	ชื่อสวน	จำนวนตัวอย่างที่รวบรวมได้	กำหนดรหัสของเชื้อแต่ละไอโซเลท
1	ระยอง	วังจันทร์	ฉวีวรรณ	15	G1S1, G1S2, G1S3, G1S4, G1S5, G1S6, G1S7, G1S8, G1S9, G1S10, G1S11, G1S12, G1S13, G1S14, G1S15
2	ระยอง	แกลง	บ้านสวนทุเรียนข้าวหอมใบเตย	7	G2S1, G2S2, G2S3, G2S4, G2S5, G2S6, G2S7
3	ระยอง	แกลง	คุณชาญรงค์ ดีหมั่น	5	G3S1, G3S2, G3S3, G3S4, G3S5
4	จันทบุรี	เขาคิชฌกูฏ	สวนทุเรียนสุขเกษม	5	G4S1, G4S2, G4S3, G4S4, G4S5
5	จันทบุรี	เขาคิชฌกูฏ	คุณวุฒิศักดิ์ สงเคราะห์	18	G5S1, G5S2, G5S3, G5S4, G5S5, G5S6, G5S7, G5S8, G5S9, G5S10, G5S11, G5S12, G5S13, G5S14, G5S15, G5S16, G5S17, G5S18

### 1.3 การจำแนกสกุลเชื้อราก่อโรคด้วยการศึกษาวิธีจุลทรรศน์ มหัตถฐาน และการคัดเลือกเพื่อใช้เป็นตัวแทนศึกษา

ภายหลังการแยกเชื้อราก่อโรคให้บริสุทธิ์จะนำแต่ละไอโซเลทไปจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้การ culture on PDA เพื่อศึกษาลักษณะของมหัตถฐาน อาทิ ลักษณะที่แตกต่างกันของสีของโคโลนีรูปแบบการเจริญของเส้นใย ราบ พู หรือเป็นก้ำมะหยี่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน จากนั้นใช้เทคนิค Slide culture ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องโดยเชื้อราพบเชื้อรา *Phytophthora* sp. 4 ไอโซเลท เชื้อรา *Fusarium* sp 51 ไอโซเลท และเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. 3 ไอโซเลท ตารางที่ 4

สำหรับเชื้อรา *Phytophthora* sp. จะดูลักษณะของเส้นใย มีหรือไม่มีผนังกัน การสร้าง Clamydospores การสร้าง Sporangium ที่บรรจุ Zoospores จากผลการศึกษสามารถระบุสกุลของเชื้อราที่แยกได้ได้ดังนี้ *Phytophthora* sp. จำนวนที่พบจากทั้งหมด 58 ไอโซเลท คือ 4 ไอโซเลท ได้แก่ G1S12-Phy, G2S4-Phy, G2S6-Phy และ G2S7-Phy ทั้ง 4 มีลักษณะของโคโลนีสีขาว เส้นใยมีสีขาวฟู รูปร่างโคโลนีเป็นแบบ แบบ petaloid มีการสร้างคลาไมโดสปอร์ และซุโอสปอร์ เมื่อมีอายุการเจริญเป็นระยะเวลา 7 วัน ขนาดของโคโลนีเท่ากับ 9 เซนติเมตร สำหรับการก่อโรคพบว่าเชื้อรา *Phytophthora* sp. ไอโซเลทที่ G1S12-Phy สามารถทำให้ใบทุเรียน ใบทุเรียนเกิดความเสียหายบริเวณที่เติมเชื้อสียาเปลี่ยนน้ำตาล และความเสียหายของใบขยายใหญ่ขึ้นตามระยะเวลาการบ่มดั่งแสดงในภาพที่ 22

สำหรับเชื้อรา *Fusarium* sp. จะศึกษาการสร้าง Macro-conidia หรือ Micro-conidia มีหรือไม่มีผนังกัน โคโลนีที่พบทั้งหมด 51 ไอโซเลท ในระยะแรกเริ่มของทุกไอโซเลทมีสีขาว ในส่วนของเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถจำแนกตามลักษณะโคโลนีจากความแตกต่างของสีเส้นใยและการสร้าง fruiting body ได้ทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ G1S7-Fu เส้นใยมีสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง G1S14-Fu เส้นใยมีสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง G1S12-Fu เส้นใยโคโลนีมีสีเหลือง จากนั้นเมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู G2S3-Fu โคโลนีแรกเริ่มสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นจะเป็นสีเหลือง และกลายเป็นสีน้ำตาลในที่สุด G3S1-Fu โคโลนีมีสีขาว G4S1-Fu โคโลนีมีสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้าง fruiting body สีเหลือง และ G5S18-Fu โคโลนีมีสีขาว เมื่อนำเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างมาตรวจสอบรูปร่างของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า G1S12-Fu, G2S3-Fu, G4S1-Fu, G5S18-Fu และ G1S7-Fu มีการสร้าง macro-conidia คล้ายพระจันทร์เสี้ยว และ/หรือ micro-conidia ในขณะที่ G1S14-Fu และ G3S1-Fu มีการสร้าง fruiting body ที่มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป

เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า สำหรับ G1S12-Fu พบว่าสามารถทำลายใบ  
 เพสลาดของทุเรียน ส่งผลให้ใบทุเรียนเกิดความเสียหาย บริเวณที่เดิมเชื้อสีใบเปลี่ยนน้ำตาล และ  
 ความเสียหายของใบขยายใหญ่ขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ดังแสดงในภาพที่ 23

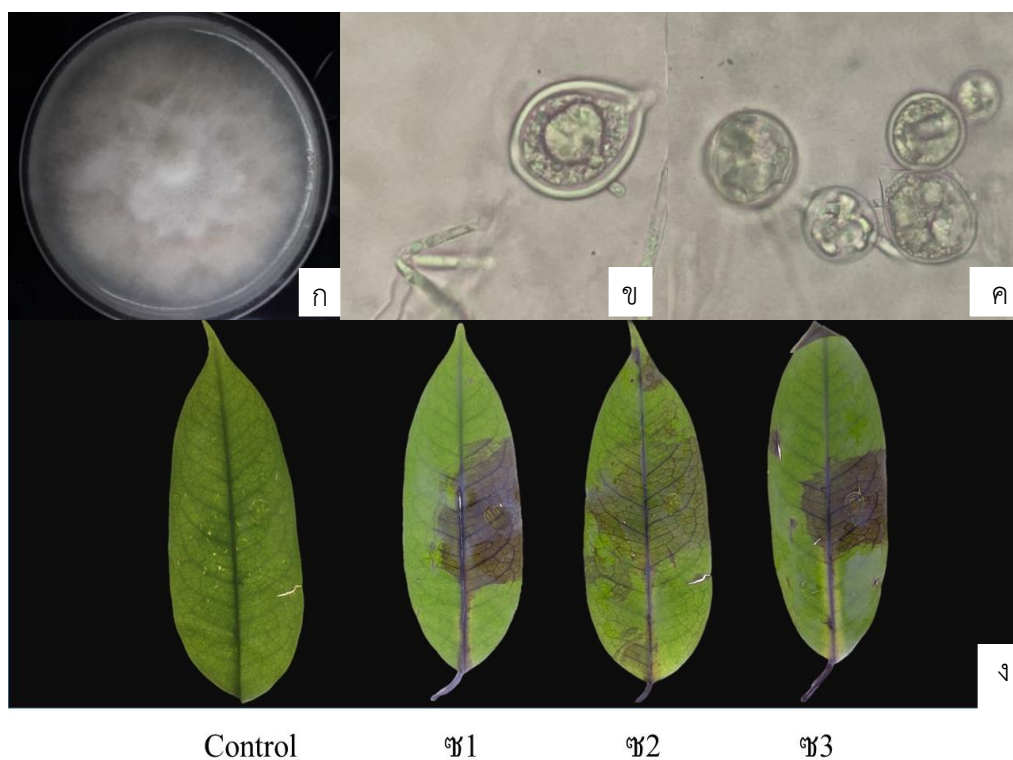
สำหรับเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. คุณลักษณะสีของเส้นใย ระยะเวลาในการแผ่ขยายของ  
 เส้นใยบนเพลท และการสร้าง Fruiting body ที่ภายในบรรจุ conidia ไว้เป็นจำนวนมาก เส้นใย  
 แรกเริ่มมีสีขาวในช่วงวันที่ 2-3 จากนั้นจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเทาในวันที่ 4-5 ในวันที่ 7 จะมีสีดำ  
 สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีภายในระยะเวลา 4 วันเท่านั้น  
 เมื่อแก่เส้นใยจะรวมกลุ่มกันและเกิดเป็นฟรุตติงบอดี ภายในบรรจุสปอร์จำนวนมาก

สำหรับ *Lasiodiplodia* sp. ไอโซเลท Lt-G1S15 สามารถทำลายใบเพสลาดของทุเรียนจนเกิดความ  
 เสียหายทั่วทั้งใบภายในระยะเวลา 7 วัน ดังแสดงในภาพที่ 24

ดังนั้นจึงเลือกตัวแทนของเชื้อก่อโรคพืช *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp.,  
*Lasiodiplodia* sp. ของการทดสอบคือ ไอโซเลท G1S12-Phy, G1S12-Fu และ Lt-G1S15 เพื่อศึกษาส  
 ปิชีส์ของเชื้อด้วยการศึกษาลำดับเบสต่อไป



455482475



ภาพที่ 22 ลักษณะมหัพัตฐาน จุลพัพัตฐาน และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophthora*

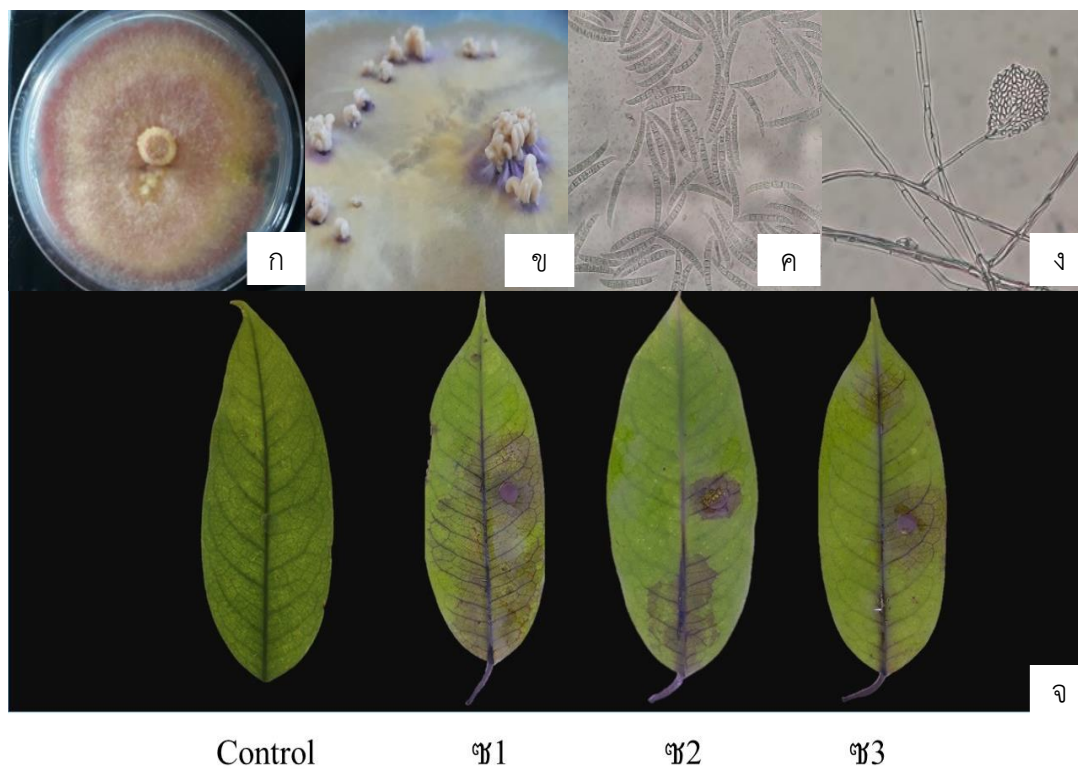
sp. G1S12-Phy

(ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา

(ข) sporangium

(ค) chlamydospore

(ง) การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Phytophthora* spp. G1S12-Phy ต่อใบเพสลาดของทุเรียนที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน



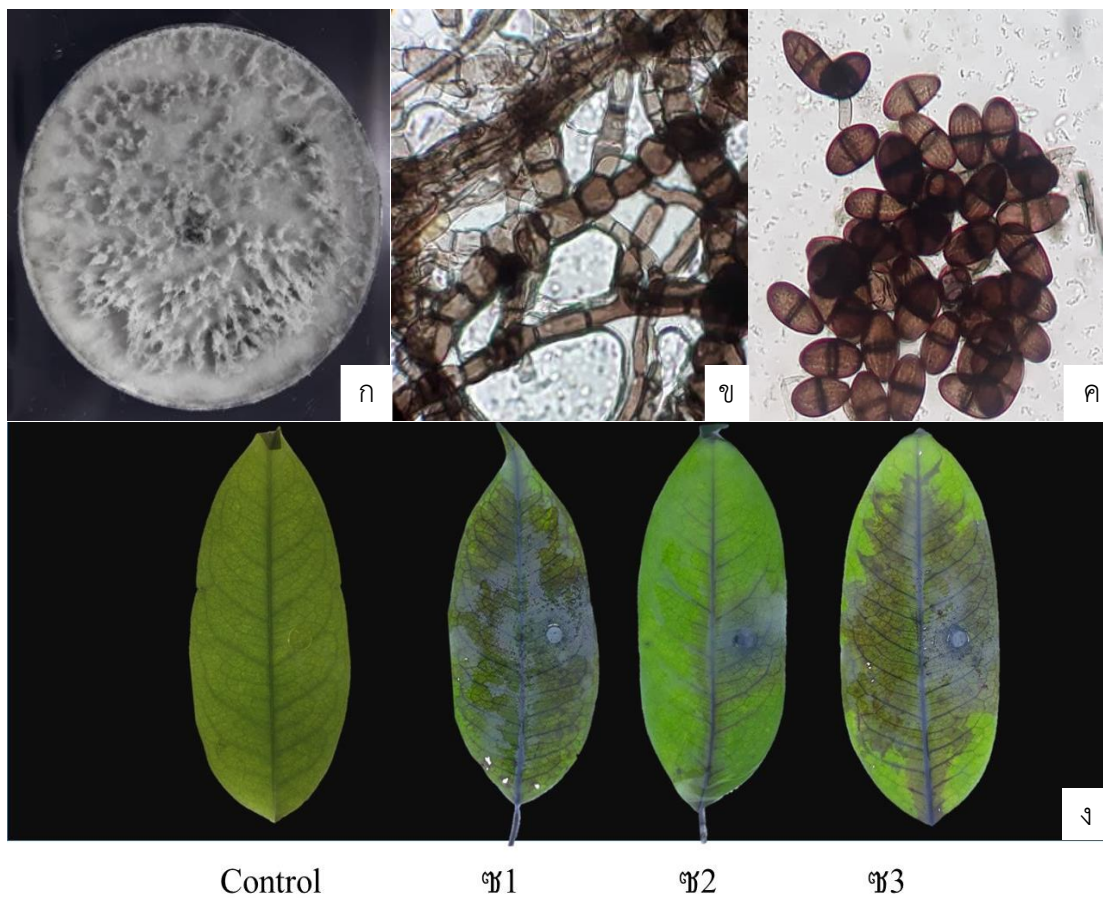
ภาพที่ 23 ลักษณะมหัศจรรย์ จุลสัณฐาน และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. G1S12-Fu

(ก) โคลนีย์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. G1S12-Fu

(ข) Fructing body (ค) Macro-conidia

(ง) micro-conodia

(จ) การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium* spp. G1S12-Fu ต่อใบเพสลาดของทุเรียนที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 24 ลักษณะมหัพัตฐานและจุลพััตฐานของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. Lt-G1S15

(ก) ลักษณะโคโลนี

(ข) ลักษณะของเส้นใย

(ค) ลักษณะ โคนิเดียม

(ง) การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. Lt-G1S15 ต่อใบเพสลาดของทุเรียนที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน

**ตารางที่ 4** ผลการแยกเชื้อราก่อโรคจากตัวอย่างรอยโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน

สวนทุเรียน	จำนวนไอโซเลท		
	<i>Phytophthora spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Lasiodiplodia spp.</i>
ฉวีวรรณ (อ. วังจันทร์ จ. ระยอง)	1 (G1S12-Phy)	15 (G1S1-Fu, G1S2-Fu, G1S3-Fu, G1S4-Fu, G1S5- Fu, G1S6-Fu, G1S7-Fu, G1S8-Fu, G1S9-Fu, G1S10-Fu, G1S11-Fu, G1S12-Fu, G1S13-Fu, G1S4-Fu และ G1S15-Fu)	1 (Lt-G1S15)
สวนทุเรียนข้าวหอมใบเตย (อ. แกลง จ. ระยอง)	3 (G2S4-Phy, G2S6-Phy และ G2S7-Phy)	7 (G2S1-Fu, G2S2-Fu, G2S3-Fu, G2S4-Fu, G2S5- Fu, G2S6-Fu, และ G2S7- Fu)	1 (Lt-G2S2)
คุณชาญรงค์ คีหมั่น (อ. แกลง จ. ระยอง)	0	5 (G3S1-Fu, G3S2-Fu, G3S3-Fu, G3S4-Fu และ G3S5-Fu)	0
สุขเกษม (อ. เขาคิชฌกูฏ จ. จันทบุรี)	0	5 (G4S1-Fu, G4S2-Fu, G4S3-Fu, G4S4-Fu, และ G4S5-Fu)	0
คุณวุฒิสักดิ์ สงเคราะห์ (อ. เขาคิชฌกูฏ จ. จันทบุรี)	0	19 (G5S1-Fu, G5S2-Fu, G5S3- Fu, G5S4-Fu, G5S5-Fu, G5S6-Fu, G5S7-Fu, G5S8- Fu, G5S9-Fu, G5S10-Fu, G5S11-Fu, G5S12-Fu, G5S13-Fu, G5S14-Fu, G5S15-Fu, G5S16-Fu, G5S17-Fu และ G5S18-Fu, G5S19-Fu)	1 (Lt-G5S4)
รวม (ไอโซเลท)	4	51	3



45482475

BUU\_1Thesis\_61910022\_thesis / recv: 27042566\_11:35:34 / seq: 96

#### 1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS

การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลโดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง International transcribed spacer (ITS)-nrDNA region, โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG-ATATGC-3') ของตัวอย่างเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Phytophthora* sp. G1S12-Phy, *Fusarium* sp. G1S12-Fu และ *Lasiodiplodia theobromae* ผ่านบริการวิเคราะห์โดยบริษัทแมคโครเจน สาธารณรัฐเกาหลี ซึ่งพบว่าเป็น *Phytophthora* taxon, *Fusarium decemcellulare*, *Lasiodiplodia theobromae* ตามลำดับ ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบการจำแนกเชื้อราทั้งสามชนิดด้วยวิธีต่าง ๆ

Isolate	การจำแนกโดยใช้รูปร่างและโครงสร้าง (มหสังฐานและจุลสังฐาน)	การจำแนกโดยใช้สารพันธุกรรม (DNA sequencing)	Identities (%)
G1S12-Phy	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Phytophthora</i> taxon	100
G1S12-Fu	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99
Lt-G1S15	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99

## 2. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่การเกษตร

### 2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ภายหลังการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน โดยคัดเลือกดินจากพื้นที่การเกษตรอินทรีย์จากพื้นที่สามแหล่ง โดยแบ่งเป็นจังหวัดจันทบุรี 50 ตัวอย่าง จังหวัดตราด 50 ตัวอย่าง และจังหวัดชลบุรี 50 ตัวอย่าง โดยจุดลึกประมาณ 0 - 10 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 5 กรัม รวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง

### 2.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินจากแต่ละแหล่งมาเจือจางอัตราส่วนของดิน (กรัม) : NSS 0.85% เป็น 5:45 จากนั้นเขย่าให้ดินกระจายทั่วทั้งฟลาสก์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางตัวอย่างดินโดยการดูดสารละลายแขวนลอยที่ความเข้มข้น  $10^{-1}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลาย NSS 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้ตัวอย่างที่มีการเจือจางที่  $10^{-2}$  จากนั้นนำไปเจือจางต่อจนได้ค่าการเจือจาง  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  ดูดสารละลายของแต่ละค่าการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ISP-2 agar + cycloheximide + nalidixic acid

ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏดังแสดงในภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ลักษณะของเชื้อที่ปรากฏบนอาหาร ISP-2 agar + cycloheximide + nalidixic acid เมื่อบ่มนาน 7 วัน

### 2.3 การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทด้วยการศึกษาวิธีจุลสังฐานและมหสังฐาน

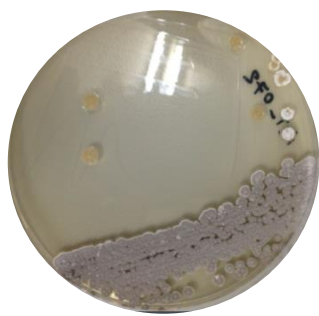
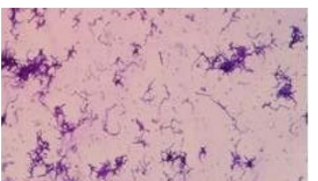

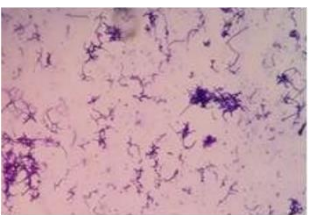
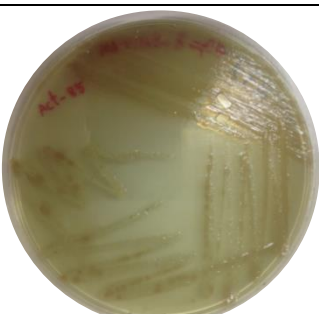
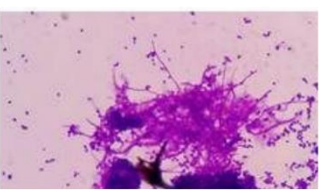
เมื่อพบว่ามิโคโลนีที่มีลักษณะ ชัดชัดเจนบนเนื้อวุ้น ขรุขระ หรือมีลักษณะคล้ายผงแป้ง มีสีของโคโลนี เทา ขาว เขียว แดง ม่วง เหลือง ดำ หรือสีส้ม จะทำการเก็บโคโลนีดังกล่าวมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยอาหาร International *Streptomyces* Project-2 (ISP-2) จากการสุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่การเกษตรอินทรีย์ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ 549 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะกลุ่มที่เจริญเร็วภายในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกลุ่มเจริญเร็วมาคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีความแตกต่างทางมหสังฐาน ได้ไอโซเลทที่แตกต่างกันจำนวน 160 ไอโซเลท ซึ่งถูกกำหนดรหัสเป็น Act-1 ถึง Act-160 โดยมีลักษณะของโคโลนีและสีที่แตกต่างกัน ได้แก่ เทา ขาว เขียว แดง ม่วง เหลือง และส้ม ตลอดจนโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของจุลสังฐาน โดยการย้อมแบบ Gram's stain จะพบเส้นใยที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม เส้นใยสั้น ติดสีม่วง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x จากนั้นเชื้อทั้ง 160 ไอโซเลทจะถูกเก็บรักษาในรูปแบบ Stock glycerol ต่อไป ตารางที่ 6



455482475


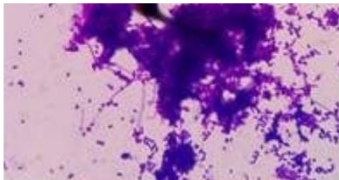

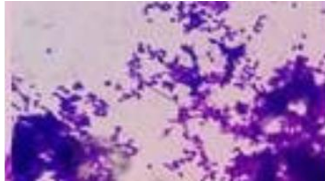

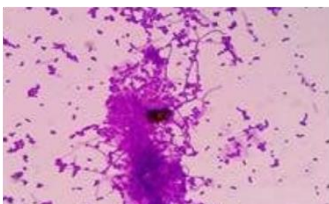
BUU\_1Thesis\_61910022\_thesis / recv: 27042566\_11:35:34 / seq: 96

ตารางที่ 6 ลักษณะ โคลนินของเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินในพื้นที่เกษตรซึ่งเจริญบนอาหาร ISP-2 มีอายุ 7 วัน

Character no.	Isolates	Amorphous	Colony on ISP-2	Mycelium
1	Act-1, Act-8, Act-15, Act-22, Act-29, Act-36, Act-43, Act-50, Act-53, Act-64, Act-66, Act-67, Act-72, Act- 135, Act-157	โคลนินใน ระยะแรกมีสี ครีม โคลนินแข็ง ยึดติดแน่นกับ เนื้อวุ้น เมื่อมี อายุมากขึ้นจะ สร้างเส้นใยสี เทา		
2	Act-2, Act-9, Act-16, Act-23, Act-30, Act-37, Act-44, Act-51, Act-52, Act-54, Act-55, Act-56, Act-58, Act-68, Act-69, Act-70, Act-71, Act-73, Act-75, Act-76, Act-77, Act-90, Act-101, Act- 109, Act-122	โคลนินใน ระยะแรกมีสี ครีม โคลนินแข็ง ยึดติดแน่นกับ เนื้อวุ้น เมื่อมี อายุมากขึ้นจะ สร้างเส้นใยขาว		
3	Act-7, Act-14, Act-21, Act-28, Act-35, Act-42, Act-49, Act-85,	โคลนินมีสีขาว มันวาว ไม่ยึดติด กับเนื้อวุ้น		



455482475

4	Act-3, Act-10, Act-17, Act-24, Act-31, Act-38, Act-45, Act- 103, Act-120, Act-148 Act-158	โคโลนีใน ระยะแรกมีสี ชมพู เมื่อมีอายุ มากขึ้นจะมีสี ม่วง และสร้าง เส้นใยสีขาว ขอบโคโลนี เรียบ ตรงกลาง โคโลนีแตก ออกเป็นพู่		
5	Act-5, Act-12, Act-19, Act-26, Act-33, Act-40, Act-47, Act-59 Act-61, Act-62, Act-65, Act-78, Act-79, Act-80 Act-82, Act- 110, Act-111, Act-114, Act- 117, Act-118, Act-123, Act- 145	โคโลนีมีสี เหลือง ขอบ โคโลนีเรียบ นูน ไม่ยึดติดกับเนื้อ วุ้น		
6	Act-6, Act-13, Act-20, Act-27, Act-34, Act-41, Act-48, Act-57, Act-60, Act-63, Act-74, Act-83 Act-84, Act-86, Act-87, Act-88, Act-91, Act-92, Act-93, Act-94,	โคโลนีมีสีครีม ยึดติดแน่นกับ วุ้น ขอบหยัก และไม่มีสาร สร้างเส้นใย		



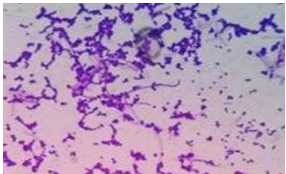
455482475

	Act-95, Act-96, Act-97, Act-98, Act-99, Act- 100, Act-102, Act-104, Act- 106, Act-107, Act-108, Act- 112, Act-113, Act-115, Act- 116, Act-119 Act-121, Act- 124, Act-125, Act-126, Act- 127, Act-128, Act-129, Act- 130, Act-131, Act-133, Act- 134, Act-136, Act-137, Act- 138, Act-139, Act-140, Act- 141, Act-142, Act-143, Act- 144, Act-146, Act-147, Act- 149, Act-150, Act-151, Act- 152, Act-153, Act-154, Act- 155, Act-160			
--	--	--	--	--



455482475

BUU :Thesis 61910022 thesis / recv : 27042566 11:35:34 / seq: 96

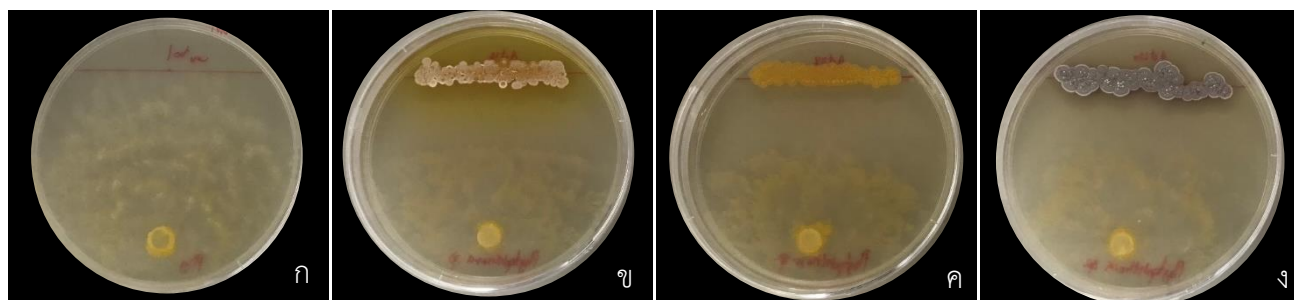
7	Act-4, Act-11, Act-18, Act-25, Act-32, Act-39, Act-46, Act-81, Act-105, Act-156, Act-159,	โคโลนีมีสีส้ม ขนาดเล็ก โคโลนียึดแน่น กับเนื้อวุ้น ไม่มีการสร้างเส้นใย		
---	---	---	--	---

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกเป็นการตรวจสอบแอคติโนมัยซีททั้ง 160 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยทำการขีดเชื้อแอคติโนมัยซีทลงบนผิวหน้าอาหาร ด้านหนึ่งห่างจากขอบเพลท 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการปรับตัวและผลิตสารสำคัญ จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยรา *Phytophthora taxon*, *Fusarium decemcellulare* และ *Lasiodiplodia theobromae* ซึ่งถูกตัดด้วย cork borer วางในอีกด้านของเพลท ห่างจากขอบเพลทเป็นระยะ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อชุดควบคุมเจริญเต็มเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีของเชื้อราก่อโรค จากผลการศึกษาพบว่ามีจำนวน 23 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราของเชื้อดังกล่าวได้ คือ Act-62, Act-75, Act-79, Act-81, Act-85, Act-86, Act-114, Act-116, Act-117, Act-118, Act-120, Act-124, Act-125, Act-127, Act-130, Act-131, Act-132, Act-133, Act-135, Act-136, Act-141, Act-142 และ Act-147 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 38.8 ถึง 61.1 เปอร์เซ็นต์ และมีแอคติโนมัยซีทจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Act-116, Act-118, Act-120, Act-133 และ Act-135 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลทถูกกำหนดให้เป็น Super-Act ดังภาพที่ 26 ถึง 29 และตารางที่ 7

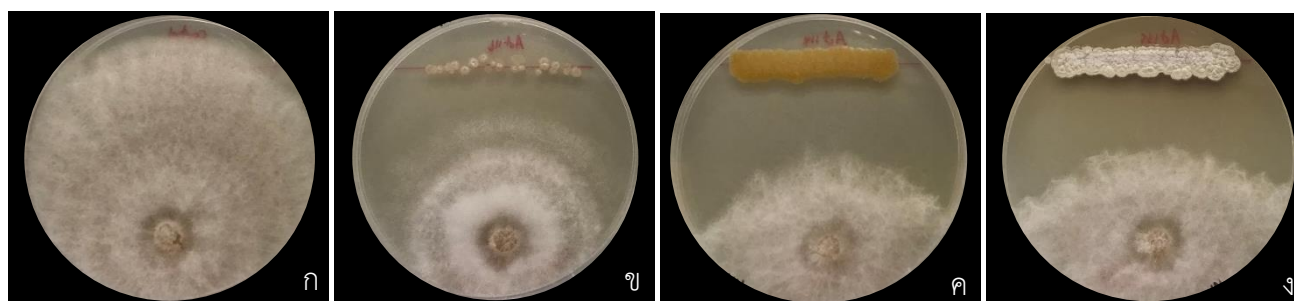
ในขั้นตอนที่ 2 ทำการขีดเชื้อ Super-Act ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 ในเพลทเดียวกันเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้แอคติโนมัยซีทเจริญร่วมกันสามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora taxon* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 77.77 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อรา

*Fusarium decemcellulare* ได้ 88.88 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ 85.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ภาพที่ 30 ถึง 32 , ตารางที่ 8



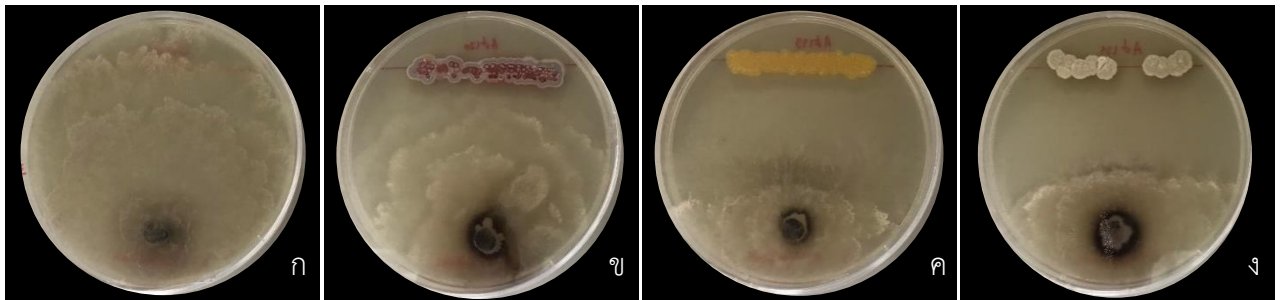
ภาพที่ 26 การทดสอบประสิทธิภาพแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* spp. G1S12-Phy

- (ก) ชุดควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* taxon G1S12-Phy  
 (ข) แอกติโนมัยซีท Act-116 ต่อเชื้อรา *Phytophthora* taxon G1S12-Phy  
 (ค) แอกติโนมัยซีท Act-118 ต่อเชื้อรา *Phytophthora* taxon G1S12-Phy  
 (ง) แอกติโนมัยซีท Act-120 ต่อเชื้อรา *Phytophthora* taxon



ภาพที่ 27 การทดสอบประสิทธิภาพแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G2S3-Fu

- (ก) ชุดควบคุมเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G2S3-Fu  
 (ข) แอกติโนมัยซีท Act-116 ต่อเชื้อรา *Fusarium decemcellulare*  
 (ค) แอกติโนมัยซีท Act-118 ต่อเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G2S3-Fu  
 (ง) แอกติโนมัยซีท Act-135 ต่อเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G2S3-Fu



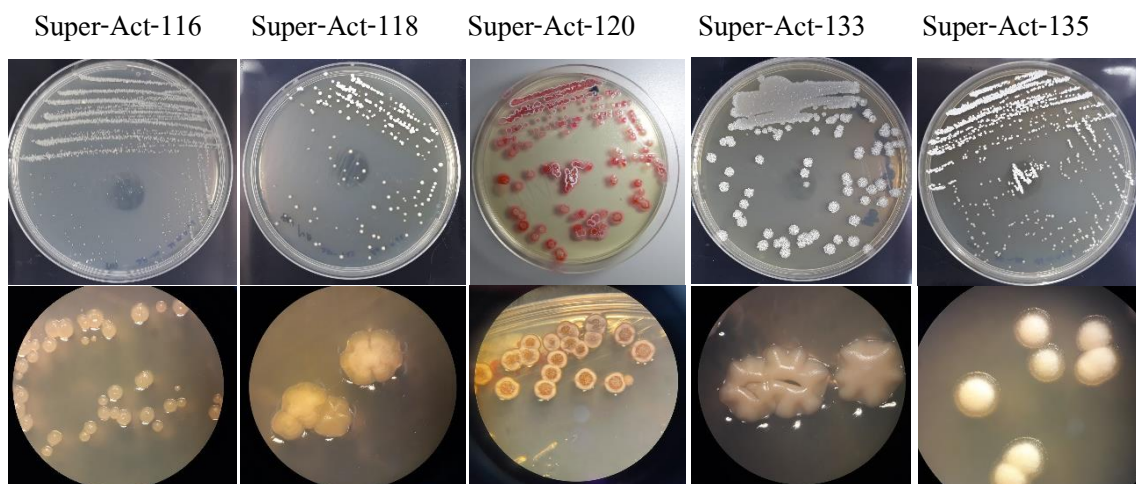
ภาพที่ 28 การทดสอบประสิทธิภาพแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15

(ก) ชุดควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15

(ข) แอคติโนมัยซีท Act-120 ต่อเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15

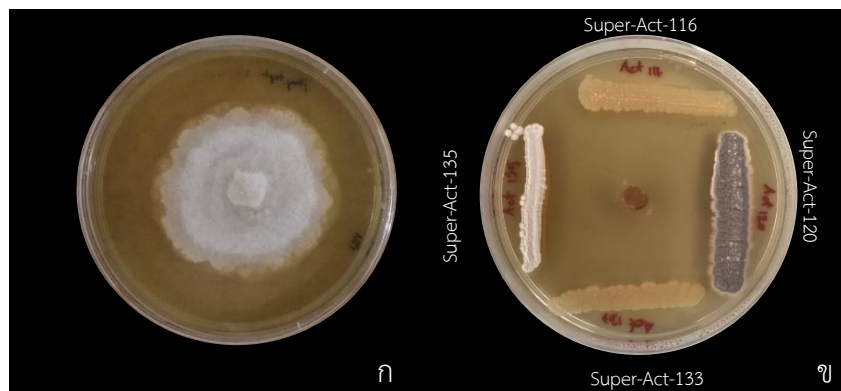
(ค) แอคติโนมัยซีท Act-133 ต่อเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15

(ง) แอคติโนมัยซีท Act-135 ต่อเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15



ภาพที่ 29 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Super-Actinomyces

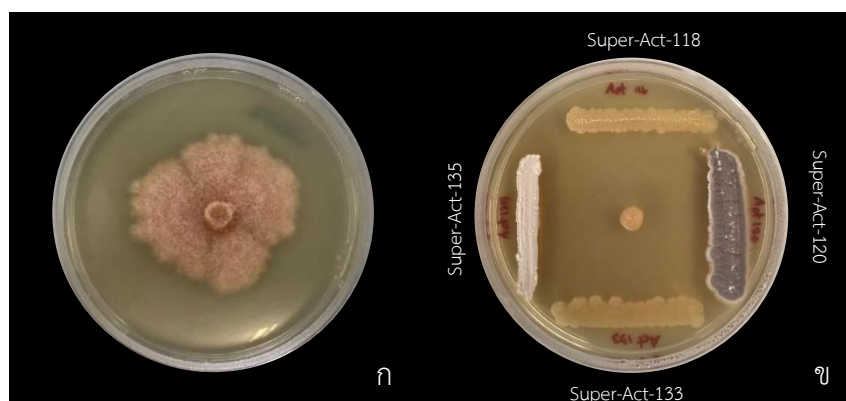
Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135



ภาพที่ 30 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora taxon*

(ก) ชุดควบคุมเชื้อรา *Phytophthora taxon*

(ข) ชุดทดสอบ เชื้อ Super-Act ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora taxon*



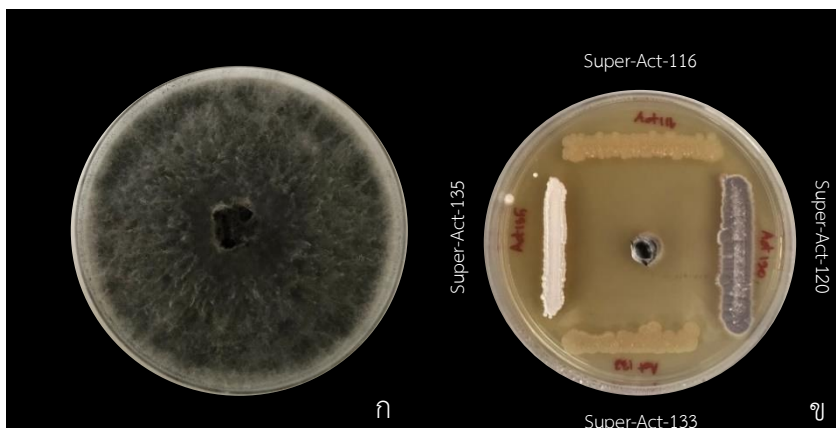
ภาพที่ 31 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium decemcellulare* G1S12-Fu

(ก) ชุดควบคุม เชื้อรา *Fusarium decemcellulare*

(ข) ชุดทดสอบ เชื้อ Super-Act ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium decemcellulare*



455482475



ภาพที่ 32 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของเชื้อ Super-Actinomyces ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* Lt-G1S15

(ก) ชุดควบคุม เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

(ข) ชุดทดสอบ เชื้อ Super-Act ในการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ตารางที่ 7 สรุปจำนวนแอกติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

Source	Number of 1 <sup>st</sup> isolation (Isolate)	Screening of fast growth (Isolate)	Inhibited plant pathogens (Isolate) <sup>a</sup>			Able to inhibit three plant pathogens (Isolate)
			<i>Phytophthora</i> taxon	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	
Chantaburi	200	60	4	5	6	2
Chonburi	200	60	3	3	3	3
Trat	149	40	3	1	3	0
Total	549	160	10	9	12	5

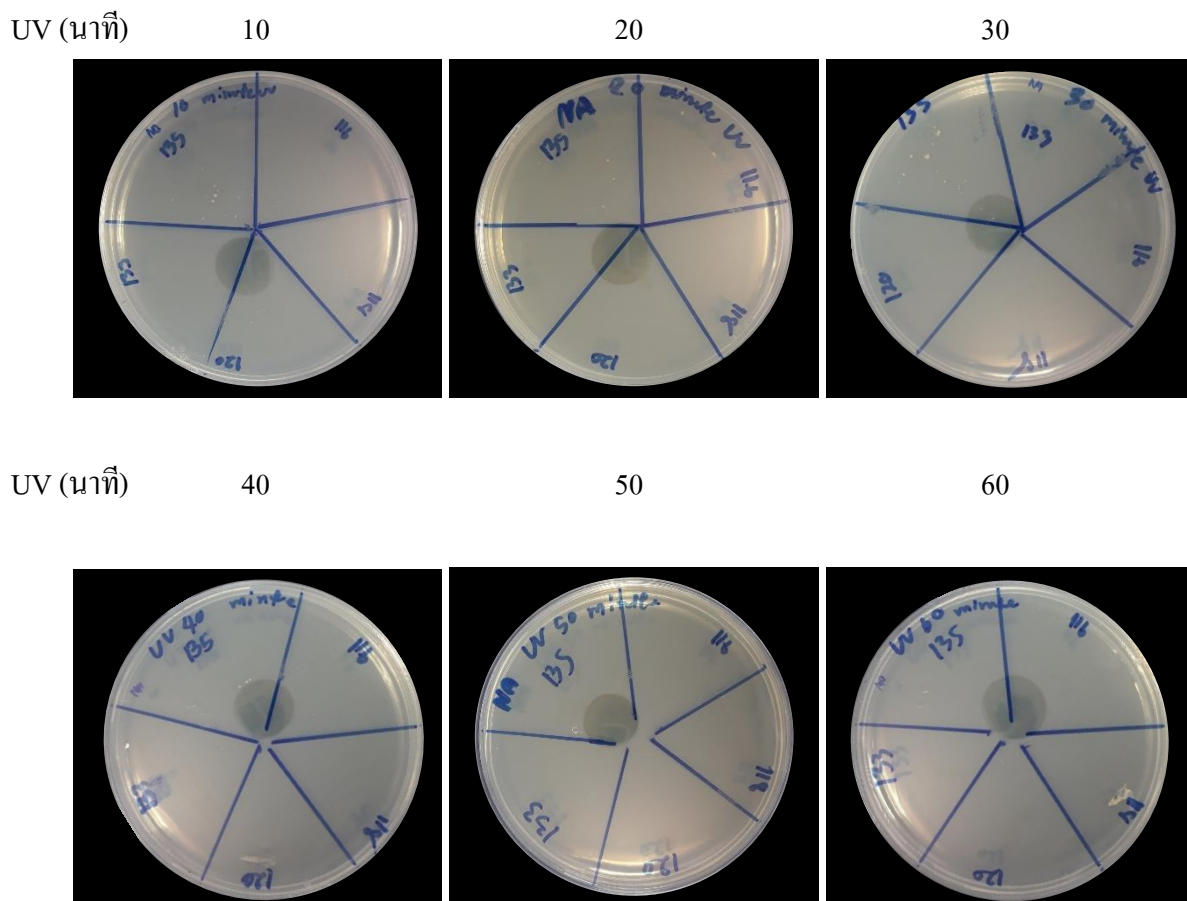
<sup>a</sup> แอกติโนมัยซีทบางไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้มากกว่า 1 ชนิด

#### 4. การศึกษาผลของแสงยูวี กรด-ด่าง และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการเจริญ

##### 4.1 ผลของแสงยูวีต่อความสามารถในการรอดชีวิต

จากการทดสอบผลของแสงยูวีที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ Super-Actinomyces จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 โดยทำการปิดเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท จากนั้นนำไปวางในตู้ยูวีและเปิดยูวีเป็นระยะเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสงและเชื้อที่ทดสอบมีระยะทาง 2 ฟุต พบว่ามีการ

รอดชีวิตของ Super-Act-135 เมื่อสัมผัสกับแสงยูวีนาน 10, 20, และ 30 นาที ในขณะที่ไม่พบการเจริญของไอโซเลทอื่น ๆ ในทุกระยะเวลาที่ทำการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 33, ตารางที่ 8



ภาพที่ 33 ผลของแสงยูวีต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ตารางที่ 8 ผลของแสงยูวีต่อเชื้อแอคติโนมัยซีท

Trait	Act-116	Act-118	Act-120	Act-133	Act-135
<i>Time of uv light treated</i>					
10	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	1
40	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

0 = no growth, 1 = slight growth, 2 = moderate growth, 3 = good growth

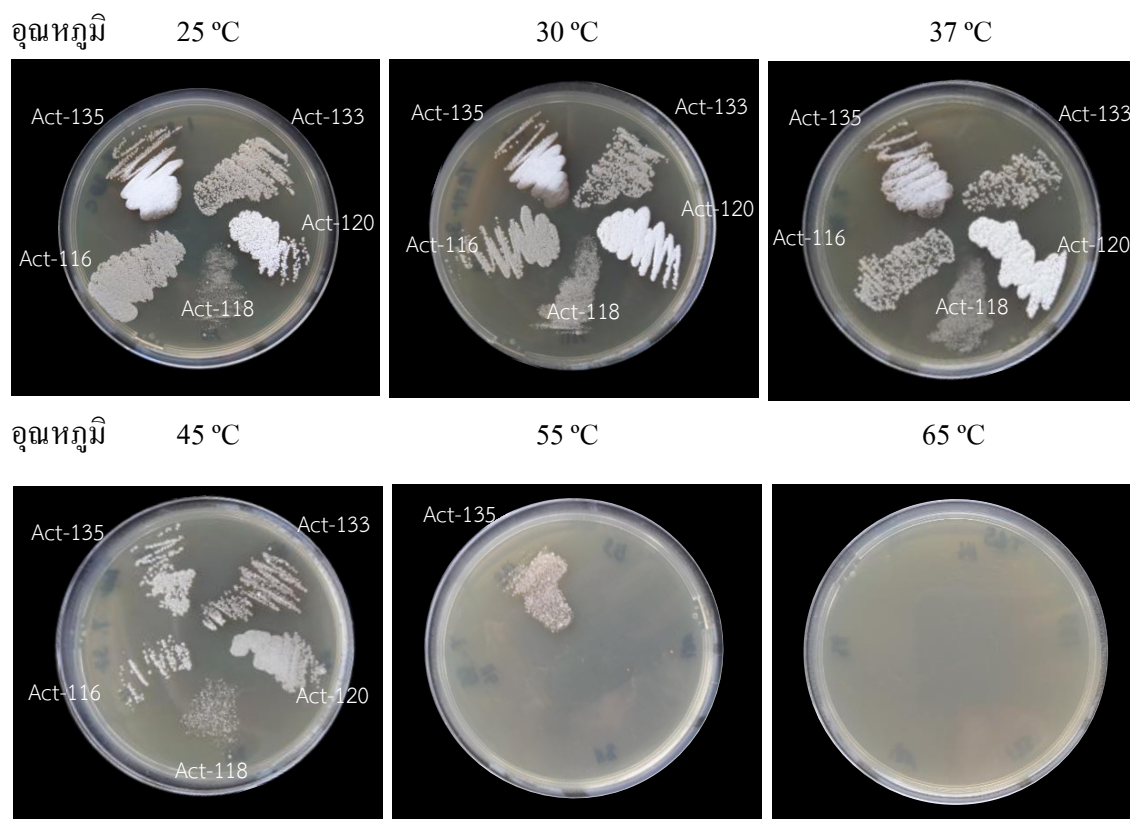
#### 4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการรอดชีวิต

ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ Super-Actinomyces จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีกรปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่าง กัน ได้แก่ 3, 5, 6, 7, 8 และ 9 และทำการทดสอบจะถูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิเดียวกันคือ 37 องศา เซลเซียส ซึ่งพบว่าเชื้อ Super-Act-116 ไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 แต่ สามารถเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 5 ถึง 9 สำหรับ Super-Act-118 ไม่สามารถ เจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 เจริญได้น้อยที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 เจริญได้ปาน กลางในค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5, 6 และ 8 และเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ในขณะที่ Super-Act-120 ไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 เจริญได้ดีในช่วง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 5-7 และเจริญได้น้อยในค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 และ 9 ใน ส่วนของ Super-Act-133 ไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 เจริญได้ปานกลางใน ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5 และ 9 และเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และ 8 และสำหรับเชื้อ Super-Act-135 ไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 เจริญได้ปาน กลางในค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 และเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 ภาพที่ 34, ตารางที่ 9



#### 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการรอดชีวิต

ผลการศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ Super-Actinomyces จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้แก่ 25, 30, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดี ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณเชื้อที่เจริญลดลง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีเพียง Super-Act-135 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ และไม่พบการเจริญของเชื้อ Super-Actinomyces ทุกไอโซเลทเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ภาพที่ 35, ตารางที่ 10



ภาพที่ 35 ผลของอุณหภูมิ 25, 30, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ต่อเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อเชื้อแอกติโนมัยซีท

Trait	Act-116	Act-118	Act-120	Act-133	Act-135
<i>Temperature</i>					
25 °C	3	3	3	3	3
30 °C	3	3	3	3	3
37 °C	3	3	3	3	3
45 °C	2	2	2	2	2
55 °C	0	0	0	0	2
65 °C	0	0	0	0	0

0 = no growth, 1 = slight growth, 2 = moderate growth, 3 = good growth

##### 5. การจำแนกชนิดของแอกติโนมัยซีทด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลโดยเทคนิค PCR โดยศึกษาโปรตีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3' , 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' , 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' และ 1 492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' ของ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 ผ่านบริการวิเคราะห์โดยบริษัทแมคโครเจน สาธารณรัฐเกาหลี ซึ่งพบว่าเป็น เชื้อ *Streptomyces parvus* (percent of identities เท่ากับ 99), *Streptomyces silaceus parvus* (percent of identities เท่ากับ 99), *Streptomyces purpurascens parvus* (percent of identities เท่ากับ 99), *Streptomyces silaceus parvus* (percent of identities เท่ากับ 99) และ *Streptomyces cavourensis parvus* (percent of identities เท่ากับ 99) ตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยวิธี Phenotypic identification, MALDI-TOF MS Identification และ 16S rRNA gene sequence

Isolates	Phenotypic identification (Macro-Microscopic morphology)	16S rRNA gene sequence
super-Act -116	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces parvus</i>
super-Act -118	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces silaceus</i>
super-Act -120	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces purpurascens</i>
super-Act -133	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces silaceus</i>
super-Act -135	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>

## 6. การศึกษาคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอินทรีย์บางชนิด

### 6.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตส

เมื่อนำเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร Pikovsakaya's agar (PVA) (Yeast extract 0.5 g, Dextrose 10 g, Calcium phosphate 5 g, Ammonium sulphate 0.5 g, Potassium Chloride 0.2 g, Magnesium sulphate 0.1 g, Manganese sulphate 0.0001 g, Ferrous sulphate 0.001 g, Agar 15 g, Distill water 1000 mL, Final pH 7.2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งผลการทดสอบพบว่า Super-Act-118, Super-Act-120 และ Super-Act-133 มีการแสดงออกของความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 15, 12 และ 14 มิลลิเมตร และไม่พบการเกิด clear zone ของไอโซเลท Super-Act-116 และ Super-Act-135 ดังแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 36 ผลการศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อ Super-Actinomyces

## 6.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อนำเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท เลี้ยงให้เจริญบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose agar (CMC) (Carboxy methyl cellulose 0.5 g, NaNO<sub>3</sub> 0.1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g, KCL 0.1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, Yeast extract 0.05 g, Glucose 0.1 g, Agar 17 g, Distill water 1,000 mL, Final pH 7.2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน การอ่านผลจะใช้ Congo red visualization method เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 ไม่มีการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน

ภาพที่ 37



ภาพที่ 37 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท

## 6.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

เมื่อนำเชื้อ Super-Actinomyces ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคมมาเลี้ยงในอาหาร Urea base agar ที่เติม Urea เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู อย่างไรก็ตาม Super-Act-116 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร จึงสามารถสรุปได้ว่า Super-Act-116 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ภาพที่ 38



Super-Act-116

Super-Act-118

Super-Act-120

Super-Act-133

Super-Act-135

ภาพที่ 38 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท

#### 6.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

การศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ Super-Actinomyces โดยนำ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่า Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยบริเวณรอบ ๆ ของโคโลนีมีการย่อยสลายแป้ง ทำให้เมื่อช้อมด้วยสารละลายไอโอดีนบริเวณที่มีการแพร่ของเอนไซม์อะไมเลสแผ่ไปถึงจึงไม่ติดสีข้อมของสารละลายไอโอดีน ดังแสดงในภาพที่ 39



Super-Act-116

Super-Act-118

Super-Act-120

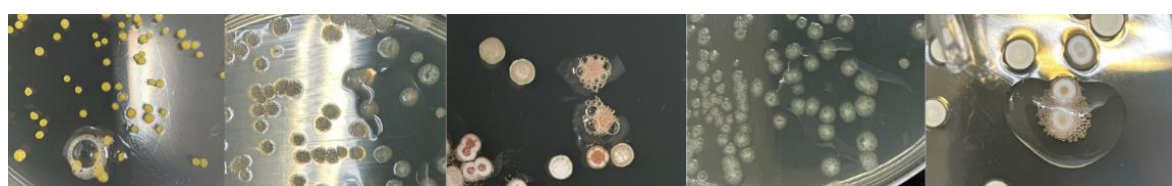
Super-Act-133

Super-Act-135

ภาพที่ 39 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท

## 6.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

การศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส Actinomyces โดยนำ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นทำการหยดสารละลายลงบน โคโลนีของเชื้อ พบว่า Super-Act-116, Super-Act-120, และ Super-Act-135 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ซึ่งเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย  $H_2O_2$  พบว่ามีฟองแก๊สปรากฏ อย่างไรก็ตาม Super-Act-133 และ Super-Act-118 ไม่ปรากฏฟองแก๊ส ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ภาพที่ 40, ตารางที่ 12



Super-Act-116

Super-Act-118

Super-Act-120

Super-Act-133

Super-Act-135

ภาพที่ 40 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท

ตารางที่ 12 ความสามารถของเชื้อ Super-Actinomyces ในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์				
	ฟอสฟาเตส	เซลลูเลส	ยูรีเอส	อะไมเลส	แคตาเลส
Super-Act-116	-	-	+	+	+
Super-Act-118	+	-	+	+	-
Super-Act-120	+	-	+	+	+
Super-Act-133	+	-	+	+	-
Super-Act-135	-	-	+	+	+

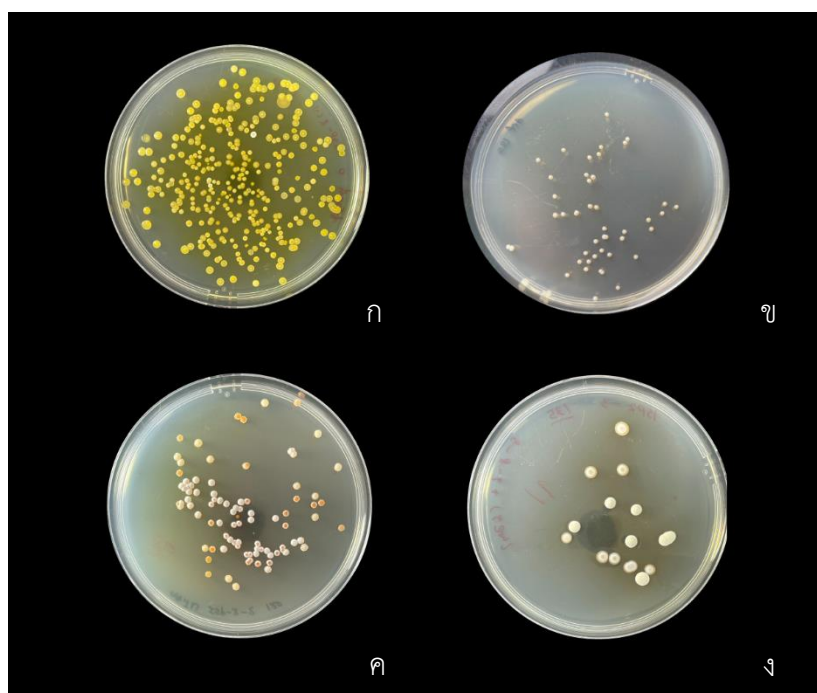
หมายเหตุ : - = negative , + = positive

## 7. การพัฒนาชีวภัณฑ์จากแอคติโนมัยซีท

ในการผลิตชีวภัณฑ์ไม่เพียงแต่คำนึงถึงประสิทธิภาพของเชื้อปฏิชีวนะในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคนชนิดอื่น ๆ แต่เพียงเท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานแม้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่แปรผัน ซึ่งข้อเด่นของการรอดชีวิตของเชื้อที่ยาวนานนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากการสร้างสปอร์ของเชื้อเอง โดยหากเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตสูงจึงจะรักษาความ

เสถียรของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่มโรควัวได้ จากการศึกษากระบวนการผลิตชีวภัณฑ์ โดยมุ่งเน้นการใช้สปอร์เชื้อได้ผลลัพท์ดังนี้

เมื่อนำเชื้อ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 มาเลี้ยงให้เจริญในอาหาร NB เพื่อเพิ่มปริมาณ เชื้อพบว่า Super-Act-116, Super-Act-118, Super-Act-120, Super-Act-133 และ Super-Act-135 มีค่าความขุ่นอยู่ที่ McFarland No. 10 ซึ่งจากการแปรผลจากเอกสาร McFarland standard index จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $3 \times 10^9$  cfu/mL จากนั้นขึ้นย่นปริมาณเซลล์ตั้งต้นอีกครั้งด้วยวิธี 10-folds serial dilutions ที่ค่าการเจือจาง -10 จากนั้นจุดสารละลายแขวนลอยเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการ Spread plate บนอาหาร NA พบว่า Super-Act-116 มีปริมาณเซลล์  $2.88 \times 10^{12}$  cfu/mL, Super-Act-118 มีปริมาณเซลล์  $4.2 \times 10^{11}$  cfu/mL, Super-Act-120 มีปริมาณเซลล์  $8.7 \times 10^{11}$  cfu/mL, Super-Act-133 (เป็นเชื้อที่มีสปอร์เดียวกันกับ Super-Act-118) และ Super-Act-135 มีปริมาณเซลล์  $1.6 \times 10^{11}$  cfu/mL ดังแสดงในภาพที่ 41



ภาพที่ 41 ผลการนับจำนวนโคโลนีเพื่อขึ้นย่นปริมาณของเชื้อ Super-Actinomyces

(ก) Super-Act-116

(ข) Super-Act-118

(ค) Super-Act-120

(ง) Super-Act-135

เมื่อได้สารแขวนลอยเซลล์เชื้อของ Super-Actinomycetes จึงนำไปเลี้ยงบนอาหาร NA เมื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์พบว่าเชื้อทั้งหมดสามารถสร้างสปอร์ได้ภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าสปอร์ของเชื้อที่ชุดได้นั้นมีน้ำหนักดังนี้ Super-Act-116 มีน้ำหนัก 0.3 กรัม Super-Act-118 มีน้ำหนัก 0.4 กรัม Super-Act-120 มีน้ำหนัก 0.6 กรัม และ Super-Act-135 มีน้ำหนัก 0.8 กรัม เมื่อเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 4 เพลทเมื่อใช้หัวเชื้อ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และขีดเชื้อจำนวน 4 รอย ดังแสดงในภาพที่ 42



ภาพที่ 42 การเก็บเกี่ยวสปอร์และเส้นใยอากาศเพื่อใช้ผลิตชีวภัณฑ์ผงพร้อมใช้

นำผงเชื้อของ Super-actinomycetes ไอโซเลทละ 0.1 กรัม จำนวน 5 ไอโซเลท (Super-Act-118 ซึ่งจำนวน 0.2 กรัม) ที่ได้มาผสมกับองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ได้ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว อาทิ Talcum, calcium carbonate, CMC และ glucose ในอัตราส่วน 60:30:8:1.5 จากนั้นบรรจุในซองอะลูมิเนียมซีล เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ขณะนั้นมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดวันอยู่ที่ 29 องศาเซลเซียส) เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อเริ่มต้นในเดือนที่ 0 ด้วย 10-fold serial dilutions ที่ -10 และวิธี spread plate พบว่าไม่สามารถระบุจำนวนเชื้อได้ และเดือนที่ 1, 2 และ 3 ไม่สามารถระบุจำนวนเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้การสังเกตด้วยตาพบว่าเชื้อมีการลดจำนวนลง ดังแสดงในภาพที่ 43, ตารางที่ 13



ภาพที่ 43 บรรจุภัณฑ์และการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์รวม

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของสูตรชีวภัณฑ์รูปแบบผงที่ผลิตจากเชื้อ Super-Actinomyces

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อ ตั้งต้น CFU/mL	ส่วนประกอบสำหรับ ผลิต ชีวภัณฑ์ต่อปริมาตร 1 กรัม	CFU/g				ค่าใช้จ่าย ต่อ 1 กรัม (บาท)
			0 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	
Super-Act-116	$2.88 \times 10^{12}$	-ผงสปอร์ 0.5 %	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	37.288
Super-Act-118	$4.2 \times 10^{11}$	-Talcum 60 %					
Super-Act-120	$8.7 \times 10^{11}$	-calcium carbonate					
Super-Act-133	$4.2 \times 10^{11}$	30%,					
Super-Act-135	$1.6 \times 10^{11}$	-CMC 8% -glucose 1.5 %					

TNTC = Too Numerous Too Count

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการลงพื้นที่สำรวจเพื่อเก็บตัวอย่างรอยโรคจากต้นทุเรียนที่ได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคในจังหวัดระยอง จันทบุรี พบว่าทุกสวนมักประสบกับปัญหาการระบาดของเชื้อ *Phytophthora* spp. *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia* spp. แต่การเกิดโรคมักมีความรุนแรงมากที่สุดบริเวณราก เนื่องจากเชื้อเหล่านี้อาศัยอยู่ในดิน ซึ่งเมื่อลูกกลามจนถึงบริเวณโคนต้นจึงทราบว่าต้นทุเรียนดังกล่าวมีการติดเชื้อ หรือบางกรณีพบว่ามีอาการของโรคปรากฏบนใบแล้วก็ตาม แต่ชาวสวนทุเรียนส่วนใหญ่ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ทันทั่วทั้ง ทำให้มีการใช้ยากำจัดโรคพืชไม่ถูกกลุ่มเป้าหมาย ทำให้เชื้อราก่อโรคเกิดภูมิคุ้มกันต้านต่อยาดังกล่าวจนกระทั่งมีการเพิ่มความเข้มข้นของยามากยิ่งขึ้น ตลอดจนเพิ่มจำนวนชนิดและประยุกต์ใช้เองตามความเข้าใจของผู้ใช้งาน ซึ่งจากรอยโรคที่เก็บได้นั้นพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อมากกว่า 1 ชนิด และท้ายที่สุดความอุดมสมบูรณ์ของดินจึงถูกทำลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสูญเสียจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ช่วยป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรค แต่สายพันธุ์ที่พบอยู่เสมออันนั้นคือเชื้อรา *Phytophthora* sp. และ *Fusarium* sp. (Law, Ser et al. 2017) ดังนั้นการปรับสมดุลพื้นฟูดินจึงเป็นการรักษาที่ต้นเหตุอย่างแท้จริง

ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการแยกเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทจากดินในพื้นที่การเกษตรที่ปลูกทุเรียน โดยมีรายงานจำนวนมากได้แสดงถึงประสิทธิภาพของเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทว่ามีส่วนช่วยในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก อีกทั้งแอกติโนมัยซีทบางกลุ่มยังเจริญได้เร็ว มีการสร้างสปอร์ที่คงทน ซึ่งข้อเด่นเหล่านี้จะช่วยให้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ที่ไม่อันตรายต่อผู้ใช้ ปลดปล่อยต่อผู้บริโภค เพื่อเพิ่มทางเลือกในการแก้ปัญหาให้แก่เกษตรกรได้ โดยเฉพาะ Super-Actinomyces ทั้ง 5 ไอโซเลทนี้มีความคุ้นเคยและปรับตัวในสภาพแวดล้อมมาอย่างยาวนาน ทำให้สามารถกระตุ้นได้ทันทีที่ใช้ในระดับแปลง อีกทั้งเชื้อแต่ละไอโซเลทมีข้อเด่นเพิ่มเติมที่ต่างกัน อาทิ บางไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟตซึ่งเป็นแร่ธาตุสำคัญของพืชได้ และแต่ละไอโซเลทมีการปลดปล่อยเอนไซม์ยูรีเอสในระดับความไวที่ต่างกัน ซึ่งการทำงานของเชื้อในลักษณะนี้จะทำให้มีการย่อยสลายยูเรียแก่พืชได้ยาวนานและต่อเนื่องยิ่งขึ้น และประการสำคัญนั้นคือเชื้อ Super-Actinomyces มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคาสูง นั่นคือ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. และมั่นใจได้ว่าเชื้อปฏิปักษ์เหล่านี้ไม่ส่งผลเสียต่อพืช เนื่องจากขาดคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช



นั่นหมายถึงว่าการมีอยู่ของเชื้อ Super-actinomyces ในดินจะไม่ทำให้รากที่เสียหายจากการติดเชื้ออยู่ก่อนทวีความรุนแรงขึ้นได้ ต่อมาภายหลังการจำแนกชนิดด้วยการศึกษาลำดับเบสพบว่าเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* spp. (Vurukonda, Giovanardi et al. 2018)

จากการศึกษาวิจัยหลายฉบับมีการรายงานว่าชีวภัณฑ์รูปแบบผงนั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าชีวภัณฑ์ที่ผลิตในรูปแบบน้ำและน้ำมันดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการก้าวข้ามขีดจำกัดของการผลิตชีวภัณฑ์ให้ได้มากยิ่งขึ้น นั่นคือการเก็บรักษาที่ยาวนานและมีอัตราการรอดชีวิตสูง ด้วยการใช้ส่วนของสปอร์ของเชื้อปฏิภักษ์เป็นหลัก เนื่องจากคุณสมบัติของสปอร์ทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าเซลล์ อีกทั้งวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ในลักษณะนี้ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง ซึ่งการใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงนั้นจะเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาอีกด้วย นอกจากนี้จุดเด่นของวิธีนี้ยังทำให้รวดเร็วและใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นน้อยแต่ได้ผลิตผลผลิตมาก ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ เมื่อทำการศึกษาผลของอัตราการรอดชีวิตโดยพบว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือนจำนวนเชื้อที่ปรากฏยังคงมีความหนาแน่นสูง (Gledhill and Casida 1969)

การระบาดของเชื้อราก่อโรค อาทิ *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ไม่ได้ส่งผลกระทบเพียงอย่างเดียวเท่านั้นแต่ยังส่งผลไปถึงพืชอื่น ๆ ทั่วโลก ซึ่งเป็นทั้งพืชเศรษฐกิจ ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชไร่ พืชสวน ตลอดจนพืชอาหารหลักที่สำคัญของแต่ละภูมิภาค อย่างเช่น อากาศโรคมะพร้าวในมันฝรั่ง รวมถึงพืชยืนต้น อย่าง มะละกอ มะเขือเทศ ยาสูบ ตลอดจนยางพารา และปาล์ม (Govers, Drenth et al. 1997) (Giachero, Declerck et al. 2022)

ทำให้ในต่างประเทศเริ่มมีการนำผลิตควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้ออย่างแพร่หลาย อาทิ สาธารณรัฐประชาชนจีนมีการผลิตชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes และจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีการสนับสนุนจากรัฐ ทำให้ตลาดด้านชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชค่อนข้างแผ่ขยายอย่างกว้างขวาง (Hong, Gao et al. 2009)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อแอกคิโนมายซีทั้นั้นมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้ หากมีการปรับปรุงและพัฒนาสูตรให้เชื้อมีความเสถียรขณะใช้ในระดับแปลง ซึ่งการเพิ่มผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดเพื่อการแก้ปัญหาสาเหตุของความเสียหายในสวนทุเรียน อาจส่งผลดีในระยะยาวในหลายด้าน อาทิ การลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยบำรุงและสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบที่พืชสามารถใช้ได้ และประการสำคัญคือการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคอย่างจำเพาะ โดยไม่ส่งผลเสียต่อต้นทุเรียน และไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้ใช้งาน รวมถึงไม่ตกค้างสะสมในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ผลโดยอ้อมที่ได้หากมีส่วนร่วมเรียนที่ได้ผลผลิตที่ดีจากการใช้ชีวภัณฑ์จะเป็นการกระตุ้นการใช้งานชีวภัณฑ์ในส่วนอื่น ๆ ในประเทศตามมาในอนาคต



45482475

BUU\_1Thesis\_61910022\_thesis / recv: 27042566\_11:35:34 / seq: 96

## บรรณานุกรม

- AbdElgawad, H., Abuelsoud, W., Madany, M. M. Y., Selim, S., Zinta, G., Mousa, A. S. M., & Hozzein, W. N. (2020). Actinomycetes Enrich Soil Rhizosphere and Improve Seed Quality as well as Productivity of Legumes by Boosting Nitrogen Availability and Metabolism. *Biomolecules*, 10(12). doi:10.3390/biom10121675
- Aloi, F., Zamora-Ballesteros, C., Martín-García, J., Diez, J. J., & Cacciola, S. O. (2021). Co-Infections by *Fusarium circinatum* and *Phytophthora* spp. on *Pinus radiata*: Complex Phenotypic and Molecular Interactions. *Plants*, 10(10), 1976. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/10/1976>
- Alves, A., Crous, P., Correia, A., & Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28 (2008), 28.
- Bundale, S., Begde, D., Pillai, D., Gangwani, K., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2018). Novel aromatic polyketides from soil *Streptomyces* spp.: purification, characterization and bioactivity studies. *World J Microbiol Biotechnol*, 34(5), 67. doi:10.1007/s11274-018-2448-1
- Callaghan, S. E., Puno, V. I., Williams, A. P., Weir, B. S., Balmas, V., Sengsoulichan, K., . . . Burgess, L. W. (2016). First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in the Lao PDR. *Australasian Plant Disease Notes*, 11, 1-5.
- Chaiharn, M., Theantana, T., & Pathom-Aree, W. (2020). Evaluation of biocontrol activities of *Streptomyces* spp. against rice blast disease fungi. *Pathogens*, 9(2), 126.
- Dângelo, R. A., de Souza, D. J., Mendes, T. D., Couceiro Jda, C., & Lucia, T. M. (2016). Actinomycetes inhibit filamentous fungi from the cuticle of *Acromyrmex* leafcutter ants. *J Basic Microbiol*, 56(3), 229-237. doi:10.1002/jobm.201500593
- Daniel, T. M. (2005). Selman Abraham Waksman and the discovery of streptomycin. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9(2), 120-122.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., . . . Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(4), 414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Drenth, A., & Guest, D. (2004). Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia.

*ACIAR monograph, 114.*

- Gao, W., Wu, Z., Sun, J., Ni, X., & Xia, H. (2017). Modulation of kanamycin B and kanamycin A biosynthesis in *Streptomyces kanamyceticus* via metabolic engineering. *PLoS One*, *12*(7), e0181971.
- Giachero, M. L., Declerck, S., & Marquez, N. (2022). Phytophthora Root Rot: Importance of the Disease, Current and Novel Methods of Control. *Agronomy*, *12*(3), 610. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4395/12/3/610>
- Gledhill, W. E., & Casida, L. E. (1969). Predominant Catalase-negative Soil Bacteria. II. Occurrence and Characterization of *Actinomyces humiferus*, sp. N. *Applied Microbiology*, *18*(1), 114-121. doi:doi:10.1128/am.18.1.114-121.1969
- Govers, F., Drenth, A., & Pieterse, C. M. J. (1997). The Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* and Other Pathogenic Oomycota. In G. C. Carroll & P. Tudzynski (Eds.), *Plant Relationships Part B: Part B* (pp. 17-36). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- He, H., Hao, X., Zhou, W., Shi, N., Feng, J., & Han, L. (2020). Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol Actinomycete strain A217. *Journal of applied microbiology*, *128*(4), 1143-1152. Retrieved from [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/31830360/Identification\\_of\\_antimicrobial\\_metabolites\\_produced\\_by\\_a\\_potential\\_biocontrol\\_Actinomycete\\_strain\\_A217\\_](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/31830360/Identification_of_antimicrobial_metabolites_produced_by_a_potential_biocontrol_Actinomycete_strain_A217_)  
<https://doi.org/10.1111/jam.14548>
- Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H. G., Zhuang, L., Lin, H.-P., . . . Ruan, J.-S. (2009). Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. *Marine Drugs*, *7*(1), 24-44. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1660-3397/7/1/24>
- Jung, T., Scanu, B., Bakonyi, J., Seress, D., Kovács, G. M., Durán, A., . . . Horta Jung, M. (2017). *Nothophytophthora* gen. nov., a new sister genus of *Phytophthora* from natural and semi-natural ecosystems. *Persoonia*, *39*, 143-174. doi:10.3767/persoonia.2017.39.07
- Kafilzadeh, F., & Dehdari, F. (2015). Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *41*(2), 197-201.
- Ketsa, S., Wisutiamonkul, A., Palapol, Y., & Paull, R. (2020). The Durian: Botany, Horticulture,

and Utilization. In (pp. 125-211).

- Kongtragoul, P., Ishikawa, K., & Ishii, H. (2021). Metalaxyl resistance of *Phytophthora palmivora* causing durian diseases in Thailand. *Horticulturae*, 7(10), 375.
- Kumar, N., Mishra, S., Singh, A., & Pachouri, U. C. (2010). Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2, 12-16. doi:10.9735/0975-5276.2.2.12-16
- Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M., Pizzatti, C., Chen, X., & Cortesi, P. (2016). Selection of Streptomyces against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology*, 16(1), 272. doi:10.1186/s12866-016-0886-1
- Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Khan, T. M., Chuah, L.-H., Pusparajah, P., Chan, K.-G., . . . Lee, L.-H. (2017). The Potential of Streptomyces as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in microbiology*, 8, 3-3. doi:10.3389/fmicb.2017.00003
- Lee, L.-H., Zainal, N., Azman, A.-S., Eng, S.-K., Goh, B.-H., Yin, W.-F., . . . Chan, K.-G. (2014a). Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, 2014, 698178. doi:10.1155/2014/698178
- Lee, L.-H., Zainal, N., Azman, A.-S., Eng, S.-K., Goh, B.-H., Yin, W.-F., . . . Chan, K.-G. (2014b). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 698178-698178. doi:10.1155/2014/698178
- Liang, L., Li, H., Zhou, L., & Chen, F. (2020). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes stem canker of Chinese hackberry in China. *Journal of Forestry Research*, 31(6), 2571-2580.
- Mohan, G., & Charya, S. M. A. (2012). Enzymatic activity of fresh water in Actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 193-197.
- Moncheva P., T. S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova, N., & Bogatzevska, N. , & (2012). Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collecions*, 3, 3-14.
- Morou-Bermudez, E., & Burne, R. A. (2000). Analysis of urease expression in Actinomycetes

- naeslundii WVU45. *Infect Immun*, 68(12), 6670-6676. doi:10.1128/iai.68.12.6670-6676.2000
- Ranjani, A., Dharumadurai, D., & P M, G. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In (pp. 3-37).
- Rathore, D. P., Yasmin, A., & Anshula, J. (2012). An insight into agricultural properties of actinomycetes. *Int J Res BioSci*, 1.
- Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2014). Vancomycin Revisited – 60 Years Later. *Frontiers in Public Health*, 2. doi:10.3389/fpubh.2014.00217
- Sanderson, H., Brown, R. S., Hania, P., McAllister, T. A., Majury, A., & Liss, S. N. (2019). Chapter 7 - Antimicrobial Resistant Genes and Organisms as Environmental Contaminants of Emerging Concern: Addressing Global Public Health Risks. In B. Roig, K. Weiss, & V. Thireau (Eds.), *Management of Emerging Public Health Issues and Risks* (pp. 147-187): Academic Press.
- Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S. (2020). Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. *International journal of microbiology*, 2020, 2716584. doi:10.1155/2020/2716584
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., . . . Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. doi:doi:10.1073/pnas.1117018109
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of Metabolites of Bacillus spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. doi:10.3389/fsufs.2021.605195
- Shantikumar, L., Indra, B., & Bora, T. C. (2006). Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*, 5. doi:10.3923/biotech.2006.217.221
- Siriphanich, J. (2011). 5 - Durian (*Durio zibethinus* Merr.). In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 80-116e): Woodhead Publishing.
- Song, L., Jiang, N., Wei, S., Lan, Z., & Pan, L. (2020). Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against *Colletotrichum*

- dematium of *Sarcandra glabra*. *Mycobiology*, 48(1), 37-43.  
doi:10.1080/12298093.2020.1716604
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., & Varshney, R. K. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 85-95.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.030>
- Suksiri, S., Laipasu, P., Soyong, K., & Poem, S. (2018). Isolation and identification of phytophthora sp. and pythium sp. from durian orchard in Chumphon Province, Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, 14, 389-402.
- Vijayakumar, R. (2009). Isolation and characterization of antagonistic actinomycetes from Coimbatore soils, Tamil Nadu, India. *J. Sci. Trans. Environ. Technov.*, 2, 191-201.  
doi:10.20894/STET.116.002.004.003
- Vurukonda, S., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int J Mol Sci*, 19(4).  
doi:10.3390/ijms19040952
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952.
- Wijedasa, M., & Liyanapathirana, V. (2012). Evaluation of an alternative slide culture technique for the morphological identification of fungal species. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*, 2. doi:10.4038/sljid.v2i2.4070
- Xiao, K., Kinkel, L. L., & Samac, D. A. (2002). Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23(3), 285-295.  
doi:<https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1015>
- Yadav, A. N., Verma, D. P., Singh, B., Chauhan, V., Suman, A., & Saxena, A. (2017). Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. *Advance in Biotechnology and Microbiology*, 5, 1-16.  
doi:10.19080/AIBM.2017.05.555671
- Yanti, Y., Zainon, M. N., & Marshida, A. H. U. (2012, 3-4 Dec. 2012). *Antagonistic effects of actinomycetes towards plant pathogen Phellinus noxius*. Paper presented at the 2012 IEEE

Colloquium on Humanities, Science and Engineering (CHUSER).

Youryon, P., & Supapvanich, S. (2022). Quality Comparison of Naturally and Artificially Ripened 'Monthong' Durian (*Durio zibethinus*) Fruits Harvested at Various Maturity Stages. 22. doi:10.55003/cast.2022.06.22.002

กรมวิชาการเกษตร. ลักษณะพฤกษศาสตร์ของทุเรียน. Retrieved from <https://www.doa.go.th/share/attachment.php?aid=2972>

ชวลิต ตนะทิพย์ และเกวลิน คุณาศักดากุล. (2561). ชีวภัณฑ์แอคติโนมัยซีสดีเอ็นดีไฟต์แบบกระจาย เพื่อควบคุมโรคดอกฝักดาบ ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในระยะกล้า. วารสารเกษตร.

นันทวุฒิ นิยมวงษ์. (2561). การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท EH50-1. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์., 5(2).

ประวิทย์ ยอดปะนัน และปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล. (2562). การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอ็นดีไฟต์ ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* สาเหตุโรคราใบไหม้และผลเน่าของเสาวรส. แก่นเกษตร, 47(ฉบับพิเศษ 1).

ปัทมา เสนทอง, กชพรรณ หนูชนะ, จันทิมา เอกรัชฤทธิ์, ธนวัฒน์ สายเมธา, จิรจิตต์ ดวงมุสิก, ภาณี ปียะพันธ์ และกฤตภพ ไทรทองคำ. (2563). การตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในดิน น้ำที่ใช้ในการบริโภคและผักสวนครัวในครัวเรือนที่อยู่ในสวนเงาะและสวนทุเรียน. วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา), 20 (3).

พรพิมล อธิปัญญาคม. (2551). ราสาเหตุโรคราพืชใน Class Ascomycetes และ anamorph ในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มณีนรัตน์ กุหาพิทักษ์ธรรม. (2562). การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเกิดโรคของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนในประเทศไทย.

Retrieved

from

<https://webopac.lib.buu.ac.th/catalog/Results.aspx?&nPage=1&Ntk=AUTHORFACET%7CAUTHORFACET&Ntt=%u0e21%u0e2b%u0e32%u0e27%u0e34%u0e17%u0e22%u0e32%u0e25%u0e31%u0e22%u0e1a%u0e39%u0e23%u0e1e%u0e32+%u0e27%u0e34%u0e17%u0e22%u0e32%u0e40%u0e02%u0e15%u0e08%u0e31%u0e19%u0e17%u0e1a%u0e38%u0e23%u0e35.+%u0e04%u0e13%u0e30%u0e27%u0e34%u0e17%u0e22%u0e32%u0e28%u0e32%u0e2a%u0e15%u0e23%u0e4c%u0e41%u0e25%u0e30%u0e28%u0e34%u0e25%u0e1b%u0e28%u0e32%u0e2a%u0e15%u0e23%u0e4c.%7C%u0e21%u0e13%u0e35%u0e23%u0e31%u0e15%u0e19%u0e4c+%u0e04%u0e39%u0e2b%u0e32%u0e1e%u0e34%u0e17>

[%u0e31%u0e01%u0e29%u0e4c%u0e18%u0e23%u0e23%u0e21.](#)

มารุต ตั้งวัฒนาสุทธิพร. (2558). การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอสคิโนมัยซีทส์จากดินในจังหวัดจันทบุรีและตราดเพื่อการยับยั้งเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์.

วารารณ กุ๊กกัฒิพนธ์ และสุคฤติ ประเทืองวงศ์. (2553). การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิบัศย์สายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิไลกษณ์ โคมพันธ์ุ , & สมเกียรติ ทับทิม. (2559). ผลของแอสคิโนมัยซีทส์ที่คัดแยกจากดินรอบรากพริกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum capsici*, *Curvularia lunata* และ *Fusarium solani*. แก่นเกษตร, 44 (1).

ศิริพร วรกุลดำรงไชย. (2558). การเพิ่มประสิทธิภาพด้านการผลิตทุเรียนคุณภาพและการกระจายผลผลิต.

สมคิด ดิสถาพร. (2540). การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2564). ทุเรียน:สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม.

สุวัฒน์ จันทรปรณณิก, ศิริพร วรกุลดำรงชัย, สุณี ศรีสิงห์ และศรุต สุทธิอารมณ์. (2545). รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการการใช้ปัจจัยการผลิตจากธรรมชาติทดแทนสารเคมี ในการผลิตทุเรียนคุณภาพที่ปลอดภัยและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย. Retrieved from [https://kukr2.lib.ku.ac.th/kukr\\_es/index.php?BKN/search\\_detail/result/161916](https://kukr2.lib.ku.ac.th/kukr_es/index.php?BKN/search_detail/result/161916)

แสวง ภูศิริ. (2530). เรื่องทุเรียน.

อรณิชา ดันดิพลานนท์, เอกพันธ์ หมะหมิน, ปัทมาศ อารีเอื้อ, กัลยา เหม่มล่า, & ชนินันท์ พรสุริยา. (2559). การแยกและคัดเลือกแอสคิโนมัยซีทส์ปฏิบัศย์เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3 ฉบับพิเศษ 1, 43-48.

อุดม ภูพิพัฒน์. (2532). โรครากและโคนเน่าของทุเรียน.

## ภาคผนวก



45482475

BUU.ITthesis 61910022 thesis / rcv: 27042566 11:35:34 / seq: 96

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

Infusion from potatoes	200	กรัม
Dextrose (Glucose)	20	กรัม
Agar	15-17	กรัม
DI water	1,000	มิลลิลิตร
pH after sterilization ( at 25°C)	5.6 ± 0.2	

ชั่งอาหาร PDA 39.0 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 1.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7-7.2		

ชั่งอาหาร NA 28 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 1.3 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified BNRA

Mycostatin	0.5	มิลลิลิตร
Ampicillin	500	มิลลิกรัม
Benomyl (Benlate 50%WP)	20	มิลลิกรัม
PCNB (75%WP)	25	มิลลิกรัม
Rifampicin	5	มิลลิกรัม
Sterile water	100	มิลลิลิตร



455482475

ละลายสารละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร ผสมสาร 40 มิลลิลิตร เติมน้ำในอาหาร PDA ขณะอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส 360 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนเทในจานเลี้ยงเชื้อ

#### 1.4 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar

Papaic digest of soyabean meal	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Monopotassium phosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม
Final pH ( at 25°C)	7.2±0.2	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar 31.55 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ จึงเติมน้ำกลั่นส่วนที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 1.5 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2

Dextrose	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Final pH ( at 25°C)	7.2±0.2	กรัม

ชั่งส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ จึงเติมน้ำกลั่นส่วนที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

#### 2.1 ออกภาคสนามทำการเก็บตัวอย่างรอยโรครากเน่าโคนเน่าจากต้นทุเรียน



## ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราก่อโรค

### Standard ID



### ITS region service report

Order Number : HC00325828  
Sample name : LI-Durian\_contig\_1

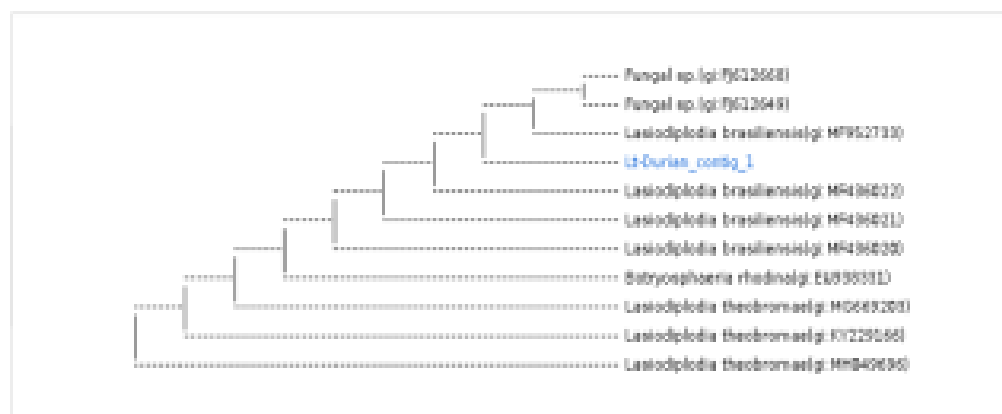
#### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	PctId
MG669203.1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	557	5	549	97	1002	0.0	544/545	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Botryosphaeriaceae	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>



#### Characterization

under investigation

under investigation



455482475

BUU-IThesis 61910022-thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96

# Standard ID



## ITS region service report

Order Number : **HC00225828**  
 Sample name : **Pp-Durian\_contig\_1**

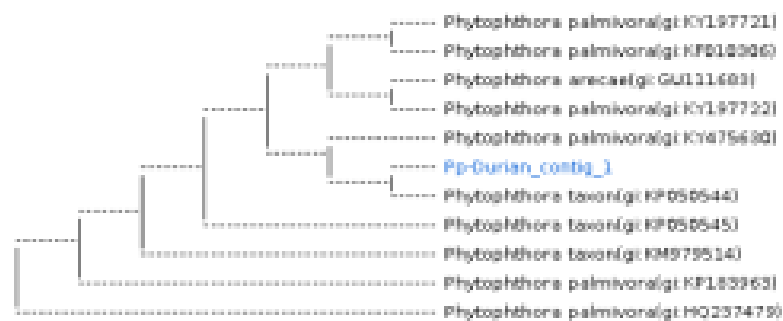
### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	PctId
KP050544.1	<b>Phytophthora taxon</b>	883	1	883	97	1584	0.0	883/883	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Peronosporaceae	Phytophthora	Phytophthora taxon



### Characterization

**under investigation**

**under investigation**

# Standard ID



## ITS region service report

Order Number : **HC00225828**  
 Sample name : **Dr-G1S12\_contig\_1**

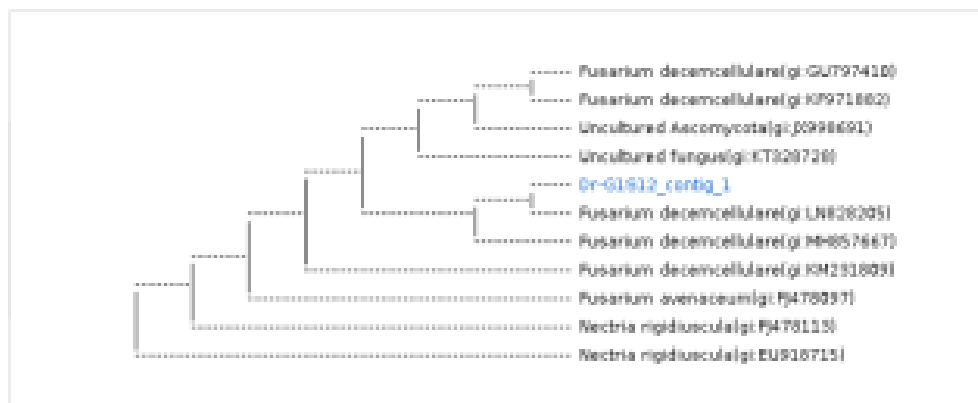
### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5'	(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	PctId%
KM231809.1	<b>Fusarium decemcellulare</b>	757	11	569	73	1026	0.0	558/559	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Nectriaceae	Fusarium	Fusarium decemcellulare



#### Characterization

Fusarium is a large genus of filamentous fungi, part of a group often referred to as *Ascomycetes*, widely distributed in soil and associated with plants. Most species are harmless saprobes, and are relatively abundant members of the soil microbial community. Some species produce mycotoxins in cereal crops that can affect human and animal health if they enter the food chain.

**under investigation**



455482475

BUU iThesis 61910022 thesis / recv: 27042566 11:35:34 / seq: 96

### แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

