

การทดสอบเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก

กมลทิพย์ บุญเกิด*, พรพรรณ อุสุวรรณ์ , ศุภสุตา การุณี , เสาวณี คงศรี และพิทักษ์พงศ์ ป้อมปรางค์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

*Komantipcat0058@gmail.com

บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ในดินปลูกพริกที่มีการแพร่ระบาดของโรค พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 146 ไอโซเลต มาทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก โดยวิธี dual culture test บนอาหาร Potato Dextrose Agar พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 146 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เฉลี่ยเท่ากับ 34.33 - 59.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก 5 อันดับแรก ได้แก่ KSAB15, KSAB13, KSAB12, KSCB09 และ KSCB10 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 59.89, 59.65, 58.56, 57.67 และ 56.56 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: *Streptomyces* spp. *Colletotrichum gloeosporioides* Chilli

Testing the Inhibitory Effect of *Streptomyces* spp. on the Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* the Causal Agent of Anthracnose in Chili

Kamontip Bunkoed*, Pornpan Usuwan , Supasuta Karoojee , Saowanee Kongsri
and Phitakphong Pompranee

Department of Plant Production Technology, Faculty of Science and Technology,
Nakhon Pathom Rajabhat University

*Komantipcat0058@gmail.com

Abstract

Isolation of *Streptomyces* spp. was conducted from soil in chili cultivation areas with anthracnose disease outbreaks. A total of 146 isolates of *Streptomyces* spp. were obtained and tested for their ability to inhibit *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent of chili anthracnose, using the dual culture test on Potato Dextrose Agar (PDA). The results showed that the 146 isolates of *Streptomyces* spp. exhibited an average inhibition percentage against *Colletotrichum gloeosporioides* ranging from 34.33% to 59.89%. The five most effective isolates in inhibiting the fungal pathogen were KSAB15, KSAB13, KSAB12, KSCB09, and KSCB10, with inhibition percentages of 59.89%, 59.65%, 58.56%, 57.67%, and 56.56%, respectively.

Keywords: *Streptomyces* spp. *Colletotrichum gloeosporioides* Chili

1. บทนำ

พริก (Chilli) ในพืชเครื่องเทศ พริกจัดอยู่ในตระกูล Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Capsicum* spp. เป็นเครื่องปรุงรสที่สำคัญในการประกอบอาหารของประชาชนชาวไทยและประชากรโลก จากสถิติคนไทยบริโภคพริกประมาณ 1 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกและผลิตพริกสูงสุดในภูมิภาคอาเซียน สามารถปลูกพริกได้ทั่วประเทศ อีกทั้งประเทศไทยมีความหลากหลายทางสายพันธุ์พริกเช่น พริกชี้ฟ้า พริกชี้ฟ้าใหญ่ พริกหวานหรือพริกยักษ์ และพริกหยวก เป็นต้น ที่มีรสชาติความเผ็ดแตกต่างกันไปตามชนิดสายพันธุ์ [5] ปัจจุบันพริกกลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้แก่ชุมชนท้องถิ่น รวมทั้งอุตสาหกรรม และส่งออกในปี 2563-2565 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพริก 121,896 ไร่ ในประเทศไทยมีจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกพริกมากที่สุดได้แก่ เชียงใหม่ หนองคาย กาญจนบุรี ราชบุรี ศรีสะเกษ และนครศรีธรรมราช [6] ปัญหาในการปลูกพริกเกิดจากโรค และแมลงศัตรูพืชโดยโรคที่สร้างความเสียหายที่สำคัญ คือ โรคแอนแทรคโนสในพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่พบมากและทำความเสียหายร้ายแรงให้กับผลผลิตพริกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลพริกที่แก่จัดซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พริกทั้งในแปลงปลูก และหลังการเก็บเกี่ยวที่มักเกิดการเน่าในขณะเก็บรักษาหรือขณะขนส่งเมื่อจำหน่ายในประเทศ และต่างประเทศซึ่งได้รับความเสียหายเป็นอย่างมาก [1] การควบคุมโรค

เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีในการป้องกันโรคพืช ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง และเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดปัญหาหลายประการเช่น ต้นทุนการผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น การต้านทานของโรค และแมลงศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารเคมี ความเสี่ยงต่อสุขภาพของเกษตรกรจากการใช้สารเคมี รวมถึงสารตกค้างของสารพิษในผลผลิตที่อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และนอกจากนี้ยังมีปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะวิจัยและหาวิธีการสำหรับการป้องกัน และกำจัดโรคพืชโดยไม่พึ่งพาสารเคมี โดยการควบคุมโรคโดยชีววิธี เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุการเกิดโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งและสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา [3] นอกจากนี้ [2] พบว่า เชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 ความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อก่อโรคได้ดีด้วยกลไกการยับยั้งและการเข้าทำลาย โดยสามารถผลิตสารต้านเชื้อรา (antifungal metabolite) และเอนไซม์ B-1,3-glucanase และ chitinase ที่สามารถทำลายเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดปริมาณการใช้สารเคมีได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพริก

2. วิธีการศึกษา

2.1 ศึกษาลักษณะอาการและเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

ทำการสำรวจแปลงปลูกพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคเพื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุของโรคโดยวิธี tissue transplant technique นำตัวอย่างพริกที่เป็นโรคมานำไปแช่ในน้ำคลอรีน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาวางบนอาหาร Water Agar (WA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเชื้อที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพริกวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อเก็บไว้ทดสอบต่อไป

2.2 การคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินที่ปลูกพริก

2.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกพริกขึ้นหนุสวัน และพริกชี้ฟ้าที่มีการแพร่ระบาดของโรค จาก อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินตามแนวเส้นทแยงมุมในแปลงขนาด 30x30 เมตร ที่ความลึกจำนวน 2 ระดับ คือ 0-15 เซนติเมตร และ 15-30 เซนติเมตร จดละ 500 กรัม แล้วนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อไป

2.3 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างดิน (pre-treatment) นำตัวอย่างดินมาทำให้แห้ง 2 วิธี คือ ผึ่งลม 2-3 วัน หรืออบในตู้ Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างดินมาตัวอย่างละ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำ Water Bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที

2.3.2 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

นำสารแขวนลอยที่ผ่านการทำ pre-treatment มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี spread plate method บนอาหาร Starch Casein Agra (SCA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-30) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ เก็บโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อ *Streptomyces* spp. คือ เซลล์คล้ายเส้นใยเชื้อราแต่มีการเจริญเติบโตช้า เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เส้นใยมีขนาดเล็กกว่าเชื้อราเพื่อไว้ทดลองต่อไป

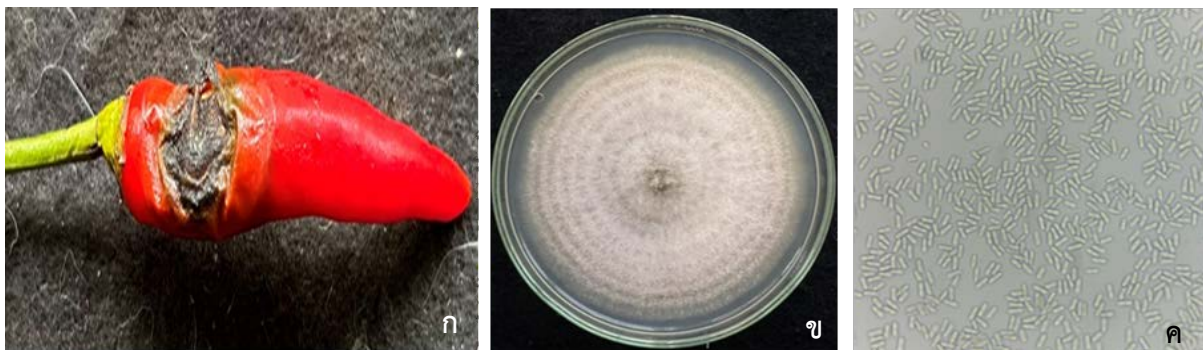
2.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบโดยวิธี dual culture test บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเลี้ยงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร Starch Casein Agra เป็นเวลา 10-14 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อโรค จากนั้นย้ายชิ้นวัน 2 ชิ้น วางบนอาหาร PDA แล้วปลูกเชื้อ *Streptomyces* spp. ใน ด้านตรงข้ามโดยเว้นระยะห่างเท่ากัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) สำหรับชุดควบคุมย้ายชิ้นวันของเชื้อราสาเหตุโรคเลี้ยงบนอาหาร PDA ปลอ่ยให้เชื้อเจริญเป็นอิสระเพื่อใช้เปรียบเทียบ (control) บันทึกผลการทดลองที่อายุ 5 วัน โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงรวม และในจานอาหารควบคุม ประเมินศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลต โดยคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Diameter Growth = PIDG)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การศึกษาลักษณะอาการและเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

จากการสำรวจแปลงพริกขึ้นหนูสวน และพริกชี้ฟ้าของเกษตรกร อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสพริก พบว่าลักษณะอาการของผลพริกเป็นจุดแผลน้ำสน้ำตาลอ่อนยุบตัวลง ขนาด 1-2 มิลลิเมตร และแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นวงกลมขนาด 1 เซนติเมตร บริเวณของแผลพบเชื้อราเป็นตุ่มสีดำขนาดเล็กเรียงซ้อนกัน ซึ่งทำให้ผิวของผลเสียหาย เมื่อนำชิ้นส่วนของพริกที่เกิดโรคมายกหาเชื้อสาเหตุของโรคพบเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA ปลูกเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบโคโลนีสีขาวอมเทา มีลักษณะเรียงซ้อนกัน พบสปอร์มีลักษณะรูปร่าง ทรงกระบอกตรง หัวมนท้ายมน เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ก ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสพริก

ข ลักษณะโคโลนีเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่อายุ 6 วัน

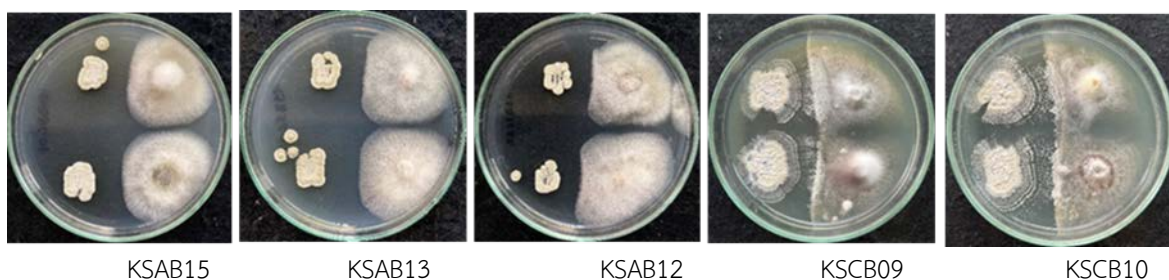
ค ลักษณะสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่กำลังขยาย 40X

3.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากทดสอบเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินปลูกพริกขี้นหนูสวน และพริกขี้นฟ้า ตำบลหัวโพธิ์ อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี จากพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรค พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 146 ไอโซเลต ทำการเรียงลำดับความสามารถต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก 5 อันดับแรก ได้แก่ KSAB15, KSAB13, KSAB12, KSCB09, KSCB09 และ KSCB10 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เฉลี่ยเท่ากับ 59.89, 59.65, 58.56, 57.67 และ 56.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีระดับการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ระดับ 2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล และคณะ(2564) ได้ทำการทดสอบศักยภาพการเป็นปฏิปักษ์ของ *Streptomyces* spp. และ *Bacillus subtilis* ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก โดย *Streptomyces* sp. จำนวน 3 ไอโซเลต (PE06, CT18 และ CT20) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Coll-1 สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก จากการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Coll-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 45.14, 39.58, 26.39 และ 53.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี sealed plate ที่เวลา 120 ชม. พบไอโซเลต CT20 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สูงถึง 64.17 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไอโซเลต CT18, PE04 และเชื้อ *Bacillus subtilis* เท่ากับ 31.67, 30 และ 28.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยไม่มีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ และเชื้อ *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลต ในคูจานอาหารทดสอบ จากนั้นตรวจสอบปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ พบไอโซเลต CT20 ยับยั้งการสร้างสปอร์ได้สูงสุด (94.93 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ไอโซเลต CT18 และ PE06 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบอินทรีย์ระเหยของเชื้อ *Streptomyces* sp. CT20 มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Coll-1 โดยอาศัยฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ การเจริญของเส้นใยและการลดปริมาณสปอร์ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรกจาก 146 ไอโซเลต

ไอโซเลต	PIDG %	ระดับการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่อต้าน
KSAB15	59.89	2
KSAB13	59.65	2
KSAB12	58.56	2
KSCB09	57.67	2
KSCB10	56.56	2



ภาพที่ 2 จากภาพแสดงประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. 5 อันดับแรก ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก จากการสังเกตจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของ

เชื้อ *Streptomyces* spp. ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. มีขนาดเล็กกว่าขนาดของเชื้อโรค แต่มีศักยภาพในการปลดปล่อยสารบางชนิดที่มีการยับยั้งเชื้อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* อย่างเช่น Polyoxin และ Candicidin เป็นต้น

4. สรุปผล

จากการศึกษาลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสพริก พบว่าลักษณะอาการ บนผลพริกเป็นจุดแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลอ่อนยุบลง ขนาด 1-2 มิลลิเมตร และแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นวงกลมขนาด 1 เซนติเมตร บริเวณของแผลพบเชื้อราเป็นตุ่มสีดำขนาดเล็กเรียงซ้อนกัน ซึ่งทำให้ผิวของผลเสียหายเป็นอย่างมาก พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้งหมด 146 ไอโซเลต มี 5 อันดับแรกได้แก่ KSAB15, KSAB13, KSAB12, KSCB09 และ KSCB10 ที่มีเปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ดีที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 59.89, 59.65, 58.56, 57.67 และ 56.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชจึงเป็นอีกแนวทางในการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

5. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Arun Charnchaichaewiwat and Chureemat Wongsirat. (2009). 'Control of anthracnose in chili peppers with yeast isolated from fruits and vegetables.' Keep up with the world of science, 9,1 (January-June). 120- 131.
- [2] Burahana Baiyi, Chaninan Prosriya and Onrak Sanpa Pao. (2562). Antifungal activity of the antagonistic bacteria *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 against fungi that cause leaf spot disease of salad vegetables. Kaen Kaset, 47, 1, 1609-1611.
- [3] Paweena Sangkaew. (2013). The successful formula of the antagonistic microorganism *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* For the inhibition of white root disease of rubber. Master's degree thesis in Plant Disease, Prince of Songkla University.
- [4] Pilanthana Thapanpongworakul, Wachirayan Duangtae, Manikar Truktrakornburi and Sombat Sareechuwong. (2564). "The potential to be an antagonist of *Streptomyces* spp. And *Bacillus subtilis* against the fungus that causes anthracnose of peppers." Kaen Kaset, 49, 3, 656-667.
- [5] Suthat Yoksan. (2566). The history of chili. Kham Sakae Saeng District Agriculture Office Searched on October 8, 2024, from <http://khamaksaesaeng.khorat.doe.go.th>
- [6] Vegetable and Mushroom Promotion Group. (2566). Chili. Chili production situation. Searched on October 8, 2024, from <http://www.agriman.doe.go.th/home/news/2566/22chili.pdf>