การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก

Evaluation of antagonistic *Streptomyces* spp.efficacy for biological control of *Colletotrichum capsici*, causal agent of anthracnose disease of chilli

รัติกาล ยุทธศิลป์[1] และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล[1,2,3*]

Rattikan Yutthasin[1] and Petcharat Thummabenjapone[1,2,3]

บทคัดย่อ: เชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก ทำความเสียหายต่อการผลิตพริกทั้งการผลิตเพื่อบริโภคผลสด ผลแห้ง และการผลิตเมล็ดพันธุ์ จำเป็นต้องหาวิธีการควบคุมโรคที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ 7 ไอโซเลต ได้แก่ –PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 และ -PR87 เพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกโดยชีววิธี ดำเนินการแยกเชื้อสปอร์เดี่ยวจากตัวอย่างผลพริกเป็นโรคที่เก็บรวบรวมได้จากแหล่งปลูกในจังหวัดขอนแก่น สกลนครและมุกดาหาร แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อ *Streptomyces* ทุกไอโซเลตยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ทั้ง 18 ไอโซเลตได้อย่างชัดเจน แตกต่างไปตามไอโซเลตของเชื้อและชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงทดสอบ โดย *Streptomyces*-PR22 สร้างแนวยับยั้งการเจริญของเส้นใย *C. capsici* ได้กว้างมากที่สุด รองลงมา คือ *Streptomyces* –PR78, -PR13, -PR15, -PR87,-PR84 และ -PR33 ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อรา *C. cpsici* ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบร่วมกับ *Streptomyces* ปฏิปักษ์นานได้ 14 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีลักษณะผิดปกติไป โดย secondary metabolites จาก *Streptomyces* PR-13,-PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ทำให้เกิดการบวมพองของเส้นใย ส่วน *Streptomyces* PR-22 ทำให้เส้นใยบวมพอง และ แตกหักเสียหาย ในขณะที่ *Streptomyces* PR-78 ทำให้เส้นใยบวมพองและบิดงอ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีส การควบคุมโดยชีววิธีและโรคพริก

Abstract: The fungus, *Colletotrichum capsici* , is known to be a causal agent of anthracnose disease of chilli pepper. It caused severe loss in both of fruits and seed productions. The objective of this study is to evaluate the potential of 7 isolates of antagonistic *Streptomyces* spp. including *Streptomyces* –PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 and -PR87 for biological

[1] สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Plant Pathology Division, Dept. of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

[2] โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คลัสเตอร์วิจัยสินค้าอาหารและอาหารสุขภาพของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
Food and Function Food of Northeast Thailand Cluster, National Research University Project, Khon Kaen University

[3] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University

[*] Corresponding author: petsir@kku.ac.th

control of chilli pepper anthracnose disease. The *C. capsici* isolates were single spore isolated from infected chilli fruits collected from Khon Kaen, Mugdahan and Sakolnakhon provinces. The antibiosis activity was tested by dual culture bioassay.Result showed that all of antagonistic *Streptomyces* isolates strongly inhibited the growth of all 18 isolates of *C. capsici* mycelium. The antibiosis activity was differed among isolates of *Streptomyces* and type of tested culture medium. The strongest inhibition obtained from *Streptomyces*-PR22, followed by -PR78, -PR13, -PR15, -PR87, -PR84 and -PR33, respectively. The hyphal tip of *C. capsici* nearest the *Streptomyces* discs were examined under light microscope at 14 days of co-cultured. Morphological characteristics of *C. capsici* hyphae were changed after exposed to secondary metabolites secreted from *Streptomyces* -PR13,-PR15, -PR33, -PR84 and -PR87 as hyphal swelling. The *Streptomyces* PR-22 caused swelling and lysis of mycelium whereas *Streptomyces*-PR78 produced swelling and distorted hyphae.

Keywords: actinomycetes, biocontrol and chilli disease

บทนำ

โรคแอนแทรกโนสเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตพริกทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน มีรายงานความเสียหายในประเทศเกาหลี 15 เปอร์เซ็นต์ (Kim and Park, 1988), ประเทศมาเลียเซีย ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Sariah,1994) และประเทศไทยสูงถึง 80 % (Poonpolgul and Kumphai, 2007) โรคแอนแทรกโนสของพริกมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotichum* อย่างน้อย 4 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. capsici* (H.Syd.) E. Butl. & Bisby, *C.acutatum* Simmonds ex Simmonds และ *C. coccodes* (Wallr.) S. Hughes (สุดารัตน์และคณะ, 2552, Than et al., 2008) การปรับปรุงสายพันธุ์พริกต้านทานโรคแอนแทรกโนสยังดำเนินการได้เพียงบางชนิดของเชื้อเท่านั้น ทำให้การควบคุมโรคแอนแทรกโนสพริกยังคงใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนโนมิล, มาเน็บ, คลอโรธาโลนิล และแมนโคเซ็บเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งวิธีการนี้ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ เป็นมลพิษต่อสภาพแวดล้อม และทำให้เชื้อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้นมาได้ (Onyeka et al., 2006) แนวทางการจัดการโรคแอนแทรกโนสพริกได้อย่างยั่งยืน คือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งทำให้ไม่มีสารพิษตกค้าง จากงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ที่ดำเนินมาอย่างต่อเนื่องโดย รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล (มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ได้คัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์หลายไอโซเลต ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการยับยั้งเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ และมีแนวโน้มในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (เพชรรัตน์, 2545, อนันต์และคณะ, 2546, ภัทรกรและคณะ, 2547, บรรจบและคณะ, 2547, เมธาวีและคณะ, 2550) จึงน่าจะมีศักยภาพนำมาใช้จัดการโรคแอนแทรกโนสของพริกได้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ดังกล่าวกับเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริกในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เชื้อ *Streptomyces* ในการจัดการโรคแอนแทรกโนสในแปลงผลิตพริกต่อไป

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสและการจำแนกชนิดเบื้องต้น

เก็บรวบรวมผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรกโนส จากจังหวัดขอนแก่น สกลนครและมุกดาหาร บันทึกลักษณะอาการโรค การสร้าง setae และรูปร่างของสปอร์ จากนั้นนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยว จำแนกเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะสัณฐานของสปอร์ การสร้าง setae ลักษณะของโคโลนีและอัตราการเจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (สุดารัตน์และคณะ,2552) ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนผลพริกในระยะผลเขียวและผลแดงโดยใช้ส่วนปลายเส้นใยที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหาร PDA นาน 7 วัน ซึ่งตัดเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิลิตร วางลงบนผลพริกที่ทำแผลบริเวณหัวและท้ายของผล ด้วยเข็มเขี่ยปลอดเชื้อไว้ก่อนแล้ว 1 แผล/ตำแหน่ง บ่มไว้ในกล่องชื้นเป็นเวลา 7 วัน บันทึกอาการโรคที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับบริเวณที่วางด้วยชิ้นวุ้น PDA เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่รวบรวมได้ไว้บนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

การประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยวิธี dual culture

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ -PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 และ -PR87 ที่ได้จาก stock culture ของ รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) และคัดเลือกตัวแทนเชื้อรา *C. capsici* จำนวน 18 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ใน PDA slant มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* และย้ายมาวางบนอาหาร PDA และ อาหาร AGMA วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Streptomyces* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาวางห่างจากเชื้อ *C. capsici* ในระยะ 30 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส วัดแนวยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยวัดระยะทางระหว่างปลายเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* กับขอบโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* เปรียบเทียบกับระยะทางระหว่างปลายเส้นใยของเชื้อรากับขอบชิ้นวุ้น AGMA ซึ่งเป็นชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดทรีทเมนต์แบบแฟคตอเรียล (8 x 18 Factorial Experiments in CRD) จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic Analysis System (SAS)

ผลกระทบของ extracellular secondary metabolite เชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ต่อเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici*

นำส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* ที่เพาะเลี้ยงไว้คู่กับ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA และ AGMA (dual culture bioassay) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน มาตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย X40 เปรียบเทียบกับเส้นใยปกติของเชื้อรา *C. capsici* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ AGMA

ผลการศึกษา

การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริกและการจำแนกชนิดเบื้องต้น

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรกโนส แบ่งเป็น พริกเผ็ด 28 ตัวอย่าง และ พริกหนุ่ม 1 ตัวอย่าง ได้จำนวน 63 ไอโซเลต จำแนกเบื้องต้นเป็นเชื้อ *C. capsici* โดยเชื้อสร้าง setae เป็นหนามยาวสีดำ สปอร์มีรูปร่างเป็นพระจันทร์เสี้ยว ใส เซลเดียว และ เส้นใยที่เจริญแบนราบติดอาหาร PDA มีสีดำ ส่วนเส้นใยที่เจริญฟูเหนืออาหารมีลักษณะคล้ายสำลีสีขาว หลังจากเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 14 วัน เชื้อเริ่มสร้าง acervulus และสปอร์ (Figure 1.) ทุกไอโซเลตทำให้เกิดโรครุนแรงได้ทั้งผลพริกระยะสีเขียวและแดง

ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* แต่ละไอโซเลตในสภาพไม่มีเชื้อ *Streptomyces* กับเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลตต่างๆ พบว่า *Streptomyces* ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ได้อย่างชัดเจน โดยความกว้างของแนวยับยั้งนี้มีอิทธิพลร่วมกันทางสถิติ ($P<0.01$) ของไอโซเลตเชื้อ *Streptomyces* และไอโซเลตของเชื้อรา *C. capsici* ทั้งที่ทดสอบบนอาหาร PDA (Figure 2.) และ AGMA (Figure 3.) เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของ *Streptomyces* ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตต่อเชื้อ *C. capsici* ทั้ง 18 ไอโซเลต พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.01$) สามารถแบ่งกลุ่มไอโซเลตของ *Streptomyces* ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* ได้เป็น 4 กลุ่ม เรียงตามประสิทธิภาพบนอาหารที่ทดสอบทั้งสองชนิดจากสูงไปหาต่ำ คือ กลุ่มที่ 1 สร้างแนวยับยั้งได้กว้างมากกว่า 15 มิลลิเมตร ได้แก่ *Streptomyces* -PR22 (15.31 และ 16.89 มิลลิเมตร ในอาหาร PDA และ AGMA ตามลำดับ) กลุ่มที่ 2 สร้างแนวยับยั้งได้กว้าง 10-14 มิลลิเมตร ได้แก่ *Streptomyces* -PR13, -PR15 และ -PR78 กลุ่มที่ 3 สร้างแนวยับยั้งบนอาหาร PDA ได้มากกว่า 10 มิลลิเมตร ส่วนบนอาหาร AGMA ได้แคบกว่า 10 มิลลิเมตร ได้แก่ *Streptomyces* -PR87 และกลุ่มที่ 4 สร้างแนวยับยั้งได้น้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ได้แก่ *Streptomyces* -PR33 และ -PR84 ในขณะที่เส้นใย *C. capsici* บนอาหารทดสอบที่ไม่มีเชื้อ *Streptomyces* เจริญได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน บนอาหาร PDA และ 14 วัน บนอาหาร AGMA (Table 1,2)

ผลกระทบของ extracellular secondary metabolite ของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ต่อเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici*

ส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* ในแนวที่ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสาร secondary metabolite ที่เชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตปลดปล่อยออกมาภายหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 14 วัน บนอาหาร PDA และ AGMA พบว่ามีลักษณะผิดปกติจากเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และ AGMA โดยสาร secondary metabolites ของ *Streptomyces* -PR13, -PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ทำให้เส้นใยบวมพอง, *Streptomyces* -PR22 ทำให้เส้นใยบวมพอง และแตกหักเสียหาย ส่วน *Streptomyces* -PR78 ทำให้เส้นใยบวมพองและบิดงอ (Figure 4.) ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ที่ผิดปกติเหล่านี้พบได้เหมือนกันทั้งบนอาหาร PDA และ AGMA

สรุปและวิจารณ์

เชื้อ *Streptomyces* -PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 และ -PR87 สามารถปลดปล่อย secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ได้อย่างชัดเจน ทั้ง 18 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. capsici* แสดงได้ชัดเจนทั้งบนอาหาร PDA ซึ่งเป็นอาหารธรรมชาติที่มีส่วนผสมของน้ำต้มมันฝรั่งและน้ำตาลกลูโคส และบนอาหาร AGMA ซึ่งเป็นอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซิส (Dhingra and Sinclair, 1995) มีส่วนประกอบที่สำคัญและส่งเสริมการสร้าง secondary metabolites ของเชื้อ *Streptomyces* คือ arginine, glycerol, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, แมกนีเซียม และค่า pH ที่เหมาะสม (Ivest and Bushell,1997, Bhattacharyya *et.al*., 1998) การที่เชื้อ *Streptomyces* -PR22 สร้างแนวยับยั้งได้กว้างที่สุด รองลงมาคือ-PR78 ,-PR13 ,-PR15, -PR87,-PR84 และ -PR33 ตามลำดับ แสดงว่า เชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลตอาจมีความสามารถในการผลิตสาร extracellular secondary metabolites ยับยั้งเชื้อ *C. capsici* ได้แตกต่างกัน รวมทั้งความต้องการแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการผลิตสารเหล่านี้แตกต่างกัน เชื้อ

Streptomyces ปฏิปักษ์ ไอโซเลต -PR78, -PR84 และ –PR87 เจริญได้ดีมากและยับยั้งเชื้อ *C. capsici* ได้กว้างมากเมื่อทดสอบบนอาหาร PDA สาร extracellular secondary metabolites ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ลงสู่อาหารทดสอบอาจเป็นสารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะที่มีผลกระทบต่อพัฒนาการของผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา *C. capsici* จึงทำให้เห็นเป็นลักษณะเส้นใยบวมพอง ซึ่งอาจทำให้เกิดการตายของเส้นใยได้เหมือนสารกลุ่ม fungicides (Kang *et al*., 2001; Ivic, 2010) เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต -PR22 นอกจากมีการผลิตสารที่ทำให้เส้นใยบวมพองแล้วยังอาจปลดปล่อยเอนไซม์ต่างๆ ที่ทำให้เกิดการแตกหักเสียหายของผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่มที่มี chitin และ glucan เป็นองค์ประกอบหลัก เช่น เอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase (Adams, 2004) ได้มากกว่าเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ ไอโซเลตอื่นๆ สาร extracellular secondary metabolites ที่ผลิตโดย *Streptomyces* ปฏิปักษ์ทั้ง 7 ไอโซเลตซึ่งมีผลต่อเส้นใยเชื้อ *C. capsici* นี้อาจไปมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. capsici* ได้เช่นเดียวกับเชื้อ *Streptomyces* sp. SRM1 ที่ทำให้เส้นใยบวมพอง ผิดรูปร่าง และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของกล้วย (Taechowisan *et al*., 2009) เชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ทั้ง 7 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบมีศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคแทรกโนสของพริกทดแทนสารเคมีกำจัดเชื้อรา โดยอาจนำไปใช้คลุกกับเมล็ดพันธุ์เพื่อลดปริมาณเชื้อ *C. capsici* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และ พ่นบนต้นพริกในแปลงปลูกเพื่อลดการเกิดโรคที่จะเกิดขึ้นกับส่วนของผลพริก

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คลัสเตอร์วิจัยสินค้าอาหารและอาหารสุขภาพของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ร่วมกับศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

บรรจบ วันกิ่ง, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และอัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2547. ศักยภาพของ *Streptomyces* ในการควบคุมโรคผลเน่าแบคทีเรียของแตงโมในสภาพเรือนทดลอง. หน้า 480-490. ในการสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 วันที่ 26-27 มกราคม 2547 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อนันต์ วงเจริญ. 2547. คุณสมบัติของสาร secondary metabolites จากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช. หน้า 466-479. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 วันที่ 26-27 มกราคม 2547 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภัทรกร ภูริชินวุฒิ, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, พิศาล ศิริธร, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2547. *Streptomyces*: ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Didymella bryoniae* และการสังเคราะห์ hydrolytic enzymes. หน้า 454-465. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 วันที่ 26-27 มกราคม 2547 ณ ห้องประชุมกวีจุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เมธาวี ธิมาศ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2550. ความคงตัวและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในแนวกว้างโดยเชื้อ

Streptomyces spp. ปฏิปักษ์. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 วันที่ 20-22 พ.ย. 2550. ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก.

สุดารัตน์ สุตพันธ์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. การเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อรา คอลเลตโตตริคัมสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพริก. บทคัดย่อ หน้า 244-245. *ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี วันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2552.

อนันต์ วงเจริญ, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์ และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2546. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ *Streptomyces* จากปุ๋ยหมักที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. หน้า 559-573. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2546 วันที่ 27-28 มกราคม 2546 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Adams, D. J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology 150:2029–2035.

Bhattacharyya, B.K, S.C. Pal and S.K. Sen. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscpicus* D1.5: culture effect. Revista de Microbiologia 29 (3). 36-41.

Dhingra, O.D. and J.B. Sinclair 1995. Basic Plant Pathology Method. 2nd Edition. CRC Press, USA. 434 p.

Ivic, D. 2010. Curative and Eradicative Effects of Fungicides pp.3- 22. *In* O. Carisse (ed.). Fungicide. Intech Open.

Ivest, P.R. and M.E. Bushell.1997. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. Microbiology 143:3573-3579.

Kang, Z.L., U. Huang, A. Krieg. Mauler-Machnik and H. Buchenauer. 2001. Effects of tebuconazole on morphology,structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum in vitro*. Pest Management Science 57:491-500.

Kim, C.H. and S.K. Park. 1988. A predictive model of disease progression of red pepper anthracnose. Korean Journal Pathology 4:325-331.

Onyeka, T.J., D. Pe´tro, G. Ano, S. Etienne and S. Rubens. 2006. Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-plant assay. Plant Pathology 55:671–678.

Poonpolgul, S. and S. Kumphai. 2007. Chili pepper anthracnose in Thailand. pp. 23. *In*: First International Symposium on Chili Anthracnose, Convention Center, Seoul National University, Korea.

Sariah, M. 1994. Incidence of *Colletotrichum* on chilli in Malaysia and pathogenicity of *C. gloeosporioides*. Crop Pathogen Biology and Control. Biotrop spec. publ. 50:103-120.

Taechowisan, T., N. Chuaychot, S. Channaphat, A. Wanbanjob, and P. Tantiwachwutikul. 2009. Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*. Biotechnology 8:86-92.

Than, P.P., H. Prihastuti, S. Phoulivong, P.W.J. Taylor and K.D. Hyde. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University Science 9:764-778.

Colletotrichum species. Journal of Zhejiang University Science 9:764-778.

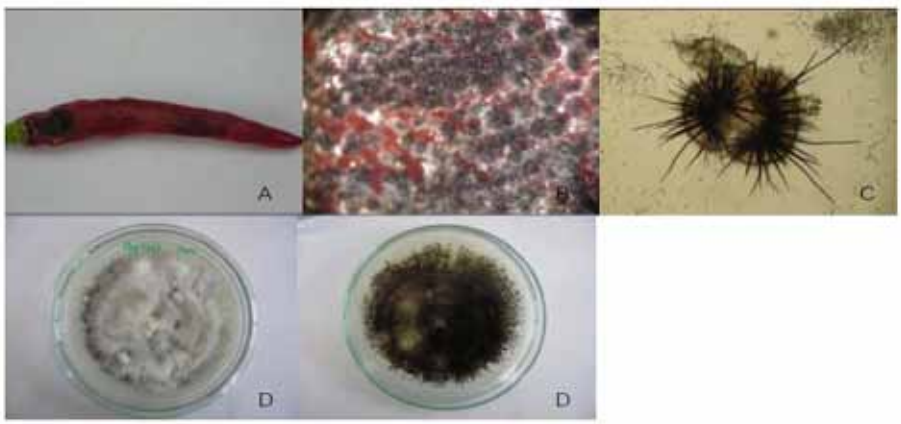

Figure 1. Symptom and characteristics of *Colletotrichum capsici* on chilli fruit and culture medium. A. symptom on chilli fruit B. lesion with numerous of acervuli examined under the stereo-microscope, C. acervuli with dark, long setae and hyaline fusoid conidia, D. growth on PDA culture.

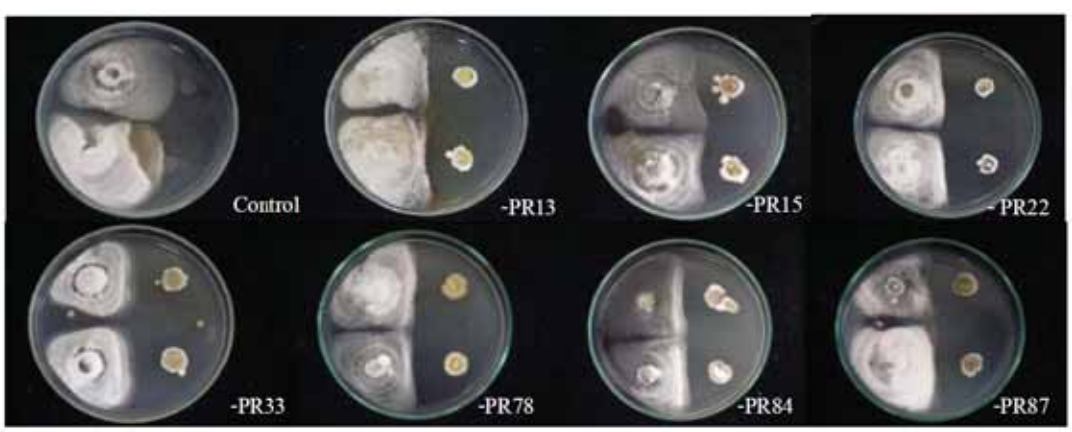

Figure 2. The antagonistic *Streptomyces*-PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 and -PR87 inhibited the growth of *Colletotrichum capsici* mycelium after dual cultured for 7 days on PDA

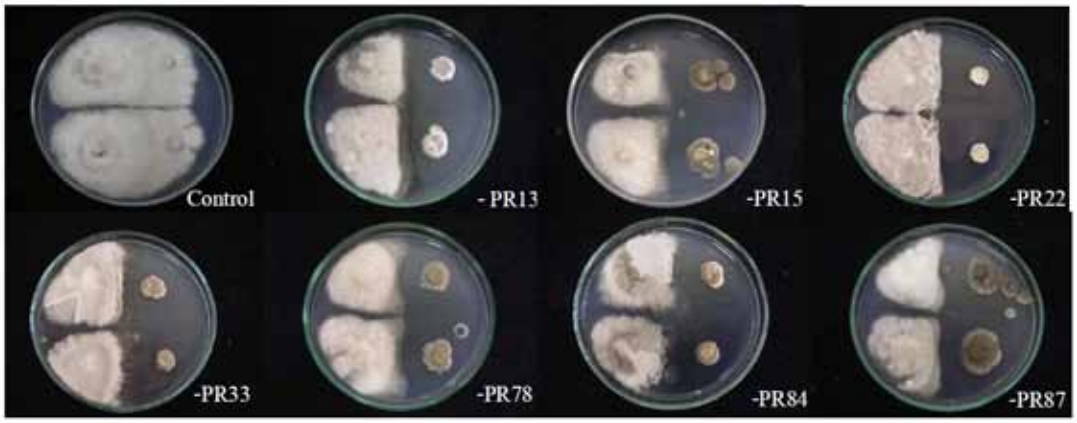

Figure 3. The antagonistic *Streptomyces*-PR13, -PR15, -PR22, -PR33, -PR78, -PR84 and -PR87 inhibited the growth of *Colletotrichum capsici* mycelium after dual cultured for 14 days on AGMA .

Table 1. The inhibition zones between antagonistic *Streptomyces* isolates and hyphal tip of *C. capsici* isolates after culture for 7 days on PDA.

Streptomyces isolates	Inhibition zones (mm)[1]								% CV
	AGMA* (Control)	PR13	PR15	PR22	PR33	PR78	PR84	PR87	
Cap 1	0 c	10.0 ab	13.8 ab	15.5 a	12.0 ab	14.5 a	12.8 ab	13.8 ab	11.65
Cap 2	0 b	12.3 a	8.5 a	13.8 a	10.8 a	12.8 a	9.5 a	12.5 a	24.23
Cap 3	-1.3 c	11.5 b	9.8 b	17.5 a	10.3 b	11.8 b	10.0 b	11.0 b	11.65
Cap 4	-1.5 d	16.5 a	12.5 b	15.5 a	10.5 b	12.3 b	7.0 c	9.5 bc	11.97
Cap 5	-1.5 c	10.8 a	9.0 ab	13.5 a	3.5 b	11.0 a	8.0 ab	9.3 ab	19.32
Cap 7	0 d	14.0 b	9.8 bc	22.3 a	7.8 c	8.8 c	11.3 bc	10.3 bc	19.71
Cap 9	0 b	11.4 a	13.3 a	11.8 a	12.0 a	13.0 a	12.0 a	11.3 a	15.64
Cap 11	0 e	12.3 ab	10.0 bc	16.0 a	4.5 d	9.0 bc	7.3 cd	10.8 bc	20.43
Cap 13	-4.0 c	10.0 ab	12.0 a	12.5 a	3.5 b	11.0 ab	10.5 ab	11.3 a	12.24
Cap 16	0 c	8.0 b	8.5 b	11.1 b	8.0 b	16.8 a	10.5 b	11.8 b	16.60
Cap 17/3	-10.0 c	8.5 b	9.8 b	15.3 a	10.8 b	11.0 b	9.5 b	10.3 b	19.30
Cap 17/4	-2.5 c	11.3 ab	9.5 b	13.5 a	8.0 b	11.3 ab	10.0 ab	9.3 b	17.25
Cap 18	0.8 e	8.8 d	15.3 ab	17.8 a	9.8 cd	13.0 bc	11.3 cd	15.5 ab	12.01
Cap 21	3.5 d	11.5 b	9.8 bc	15.3 a	10.0 bc	11.8 b	8.5 c	8.8 c	8.34
Cap 24	-0.3 d	9.3 bc	10.5 bc	14.0 a	11.0 b	11.3 ab	7.5 c	9.5 bc	13.67
Cap 26	-1.3 c	10.8 b	9.0 b	19.5 a	11.5 b	12.0 b	10.0 b	11.8 b	16.25
Cap 27	-1.8 e	8.8 bc	10.0 b	14.8 a	3.3 d	8.8 bc	7.3 c	9.3 bc	10.88
Cap 33	0.5 e	7.0 d	9.0 c	15.8 a	11.5 b	13.0 b	11.3 b	13.0 b	8.37
Mean	1.23	11.02	11.24	15.79	9.88	12.30	10.24	12.03	

[1]Means within the same row with a common letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.01$)

*minus symbol means no inhibition zone and *C. capsici* hyphae grew over the AGMA disc

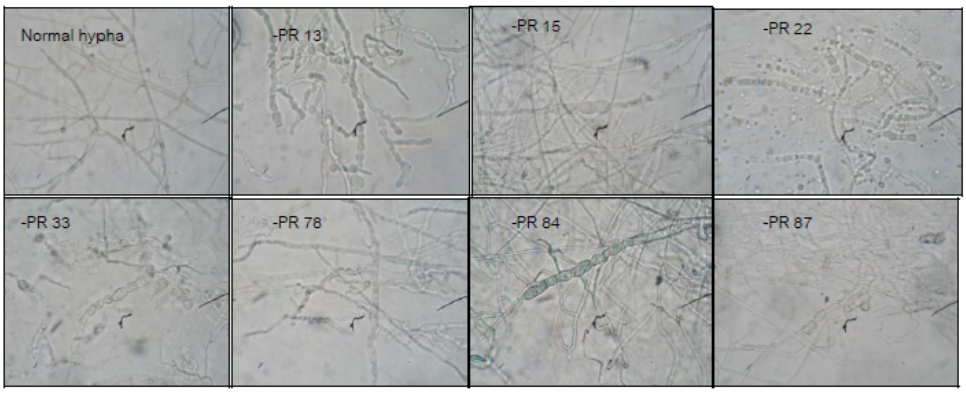

Figure 4. Effects of extracellular secondary metabolites of antagonistic *Streptomyces* –PR13,PR-15,-PR22,- PR33, PR-78,-PR84 and -PR87 on *C. capsici* mycelium after dual culture for 14 days and observed under light microscopes (40X).

Table 2. The inhibition zones between antagonistic *Streptomyces* isolates and hyphal tip of *C. capsici* isolates after culture for 14 days on AGMA

Streptomyces isolates	Inhibition zones (mm)[1]								% CV
	AGMA* (Control)	PR13	PR15	PR22	PR33	PR78	PR84	PR87	
Cap 1	-9.8 d	8.0 bc	12.0 b	17.5 a	6.0 c	10.0 bc	7.8 bc	7.5 bc	26.63
Cap 2	6.5 c	12.3 b	12.5 b	16.8 a	12.3 b	13.5 ab	12.5 b	12.0 b	13.92
Cap 3	-9.5 c	11.8 ab	7.5 b	19.5 a	8.0 b	10.0 b	6.3 b	9.8 b	21.23
Cap 4	-12.0 d	12.8 b	9.0 bc	18.5 a	12.8 b	8.5 bc	6.8 c	6.3 c	21.50
Cap 5	0 d	15.5 a	8.5 c	18.3 a	11.3 b	9.5 bc	10.5 bc	10.0 bc	5.46
Cap 7	2.3 c	12.3 b	10.5 b	21.3 a	10.5 b	10.8 b	11.3 b	9.8 b	12.48
Cap 9	5.0 d	16.5 a	14.0 b	15.5 ab	10.5 c	11.8 c	10.8 c	10.8 c	7.23
Cap 11	-2.5 d	10.8 b	8.8 bc	15.8 a	5.3 c	9.8 bc	9.0 bc	7.0 bc	24.55
Cap 13	0 b	11.4 a	13.3 a	11.8 a	12.0 a	13.0 a	12.0 a	11.3 a	15.64
Cap 16	-25.0 c	10.3 ab	10.3 ab	14.5 a	13.0 a	9.5 ab	9.5 ab	8.0 b	13.86
Cap 17/3	2.0 d	14.5 a	12.0 ab	14.0 a	8.5 bc	8.3 bc	6.8 c	11.5 ab	17.41
Cap 17/4	-2.5 c	11.3 ab	9.5 b	13.5 a	8.0 b	11.3 ab	10.0 ab	9.3 b	17.25
Cap 18	6.8 d	14.8 bc	16.8 ab	19.5 a	12.8 c	13.5 c	13.5 c	16.5 b	8.41
Cap 21	-19.5 d	8.5 b	8.8 b	15.3 a	5.3 c	8.8 b	6.3 bc	7.8 b	19.28
Cap 24	8.3 c	14.3 ab	11.3 bc	15.5 a	14.3 ab	12.3 ab	4.3 d	10.8 bc	12.61
Cap 26	-13.8 d	13.0 b	9.5 c	19.0 a	7.8 c	10.0 c	8.5 c	9.8 c	12.84
Cap 27	-12.3 d	7.5 bc	9.0 bc	17.5 a	7.0 bc	11.5 b	8.5 bc	6.5 c	27.39
Cap 33	6.0 d	9.0 cd	12.5 bc	18.0 a	9.8 cd	14.8 ab	10.0 cd	10.8 bc	15.70
Mean	- 1.27	11.63	10.39	16.76	8.91	10.84	8.93	9.47	

[1]Means within the same row with a common letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.01$)

*minus symbol means no inhibition zone and *C. capsici* hyphae grew over the AGMA discs