KSUC-P-004

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทกลุ่มปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในหน้าวัว

มัลลิกา ธีระกุล[1,*] ปิยนันท์ ชมนาวัง[1] แก้วตา สูตรสุวรรณ[1] และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร[1]

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

[*]Corresponding author: mullikateerakun@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากวัสดุปลูกต้นหน้าวัวในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว จากการศึกษาการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากวัสดุปลูกต้นหน้าวัวจากแหล่งขยายพันธุ์และจำหน่าย 5 แหล่ง คือ ขอนแก่น บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี นครราชสีมา และมหาสารคาม สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังนี้ สีของกลุ่มสปอร์มีสีเทา คือ ไอโซเลต AB-1, AB-3 และ AB-6 และสีของกลุ่มสปอร์ที่มีสีขาว คือ AB-2 และ AB-5 และลักษณะของสีเส้นใยใต้ผิวอาหารมีความหลากหลาย เช่น สีเทา เหลือง น้ำตาล ดำ และ ขาว โดยส่วนใหญ่ไอโซเลตแอคติโนมัยสีทมีลักษณะของการสร้างสปอร์เป็นแบบ conidia คือจะสร้าง conidia ต่อกันเป็นเส้นสาย ยกเว้น AB-5 มีลักษณะของการสร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เรียงต่อกัน 2 เซลล์สปอร์ การผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหารเป็นสีน้ำตาล แต่ไอโซเลต AB-2 และ AB-5 ไม่พบการผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร ทุกไอโซเลตแอคติโนมัยสีทมีลักษณะไมซีเลียมไม่แตกหัก การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum* spp.) พบว่าไอโซเลต AB-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสสูงสุดคือ 61.25% รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต AB-2 (46.67%) ส่วนไอโซเลต AB-3 และ AB-6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกันคือ 42.50% และ 42.08% ตามลำดับ และไอโซเลต AB-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสต่ำที่สุดคือ 8.75% จากนั้นทำการผลิตและสกัดสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว พบว่าร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวเมื่อใช้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับ 11.08 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 9.11) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แม้ว่าการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ แอคติโนมัยสีทไอโซเลต AB-1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงถึง 61.25% ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการผลิตสารปฏิชีวนะหรือฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ น่าจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ดังกล่าวอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าบนเนื้อเยื่อพืช

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท โรคแอนแทรคโนส หน้าวัว

Abstract

The objective of this research was to isolate and screen for potential actinomycete antagonists against antracnose pathogen from anthurium growing media. Base on the collected growing media from Khon Kaen, Buriram, Prachinburi, Nakhonratchasima and Mahasarakham, 5 actinomycete isolates were identified, AB-1, AB-2, AB-3, AB-5 and AB-6. The morphological characteristics of the isolates were different on starch casein agar. The spore mass color of isolates AB-1, AB-3 and AB-6 were gray and the spore mass color of isolates AB-2 and AB-5 were white. The appearance of a color substrate mycelium was variety such as gray, yellow, brown, black and white. Spore characteristic of all actinomycete isolates was a conidia spore and produced in long chain except isolate AB-5 that produced two spores in chain. The production of melanin pigment or pigment spread into media was studied. Most actinomycetes isolated to produce melanin pigment were brown but isolates AB-2 and AB-5 were not found to produce melanin pigment. All isolates were mycelium unbreakable. The inhibition efficiency of isolates against anthurium antracnose pathogen, *Colletotrichum* spp., has been evaluated. Among all isolates subjected to dual culture test, the highest inhibition effect was from isolate AB-1 (61.25%). Isolates AB-2, AB-3 and AB-6 have inhibition effect 46.67%, 42.50% and 42.08%, respectively. Isolates AB-5 showed lowest inhibition effect (8.75%). Isolated AB-1 was cultured in ISP2 as antibiotic production medium under 150 rpm shaking condition at 30oC, and then active compounds were extracted from fermentation broth using ethyl acetate. AB-1 extracted was tested against anthracnose disease on anthurium leaf by spraying method. The percentage of infected leaf area of AB-1 extracted and control treatment were 11.09 and 9.11, respectively. It revealed that the AB-1 extracted was effective inhibitory nearly the same as spraying with the control treatment, however, isolated AB-1 was highly effective inhibitory the growth of anthracnose pathogenic fungi (61.25%) in lab scale. The results suggested that antibiotics from isolated AB-1 showed better inhibitory effect on anthracnose pathogenic fungi when tested on agar than on plant tissue.

Keywords : Actinomycetes, Anthracnose, Anthurium

บทนำ

หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) เป็นไม้ดอกที่อยู่ในวงศ์ Araceae มีชื่อสามัญว่า flamingo flower หรือ tail flower (Norman and Yuen, 1999) หน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกที่มีหลากสี และมีสีสันสดใส ไม่

เหี่ยวง่าย สามารถประดับได้นาน 15-20 วัน นิยมใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการตัดดอก การจัดสวน และการใช้เป็นไม้กระถาง (เศรษฐพงศ์ และคณะ, 2550) ในการปลูกหน้าวัวมักประสบกับปัญหาการเข้าทำลายทั้งจากโรค แมลงและศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งโรคที่เป็นปัญหาสำคัญและสร้างความเสียหายให้แก่หน้าวัวเป็นอย่างมากคือ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (สุเนตรา, 2537; Desshmukh and Mehetre, 2011) การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคศัตรูพืชถือว่าเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม แต่การใช้สารเคมีประเภทดูดซึมมีผลทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในหน้าวัว ซึ่งมีผลกระทบต่อการส่งออก เนื่องจากถูกกีดกันทางการค้าด้วยเหตุผลด้านความปลอดภัยของผลผลิตต่อผู้บริโภค ทำให้ไม่สามารถส่งออกหน้าไปสู่ตลาดต่างประเทศได้ นอกจากนี้การใช้สารเคมีมากเกินความจำเป็นยังส่งผลให้เชื้อราสาเหตุของโรคมีแนวโน้มที่จะต้านทานต่อสารเคมี และส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) เพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กับโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด (Upadhyay and Rai, 1988) เพื่อลดการใช้สารเคมี ซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ อาจจะเป็นเชื้อราที่ไม่ก่อโรค แบคทีเรีย หรือแอคติโนมัยสีท (actinomycetes) ที่สามารถเจริญแล้วยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืชได้

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเส้นใย มีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Williams *et al.,* 1989) มีงานวิจัยหลายฉบับที่ใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทควบคุมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับพืช โดย Mahadevan and Crawford (1997) รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราและสารต่อต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วย ดังนั้นจึงมีการใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับราก และเมล็ดของพืช จากการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดของพืชในกลุ่มนี้ (Samac *et al.,* 2003) นอกจากนี้ Gesheva (2002) ได้ทำการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อควบคุมเชื้อโรคพืชในสวนส้มและมะนาว พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Streptomyces และ Micromonospora สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรียและเชื้อราซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ beta-lactams polyethers nonpolyenic macrolides azalomycin B และสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ อีก ซึ่งสารปฏิชีวนะต่างๆ ที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสร้างขึ้นนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆในดินของสวนส้มและมะนาว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์แอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว จากวัสดุปลูกหน้าวัว เพื่อนำจุลินทรีย์แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มาคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว ซึ่งการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทมาใช้เพื่อช่วยในการยับยั้งโรคในหน้าวัวจะช่วยลดการใช้สารเคมี เพิ่มผลผลิต และส่งเสริมการปลูกหน้าวัวในเชิงเกษตรอินทรีย์ด้วย

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างวัสดุปลูกจากแหล่งที่มีการปลูกหน้าวัวเพื่อคัดแยกเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างวัสดุปลูกหน้าวัวจากแหล่งที่มีการปลูกหน้าวัวจำนวน 5 แหล่ง คือ จากแหล่งปลูกหน้าวัว จังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม ปราจีนบุรี บุรีรัมย์ และนครราชสีมา นำตัวอย่างวัสดุปลูกมาทำการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยการอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Hayakawa *et al.,* 1991) จากนั้นทำการบดและร่อนให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างวัสดุปลูกที่ผ่านการร่อน ไว้ที่ 4°C เพื่อคงกิจกรรมของจุลินทรีย์ไว้ จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างวัสดุปลูกด้วยวิธีการทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (spread plate) โดยปิเปตความเจือจางที่ 10^{-2} และ10^{-3} ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ actinomycete isolation agar (Nanjwade *et al.,* 2010) ที่เติมสาร cycloheximide 50 mg/L (ชนินทร์ และคณะ, 2546) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นับจำนวนโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่ปรากฏบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำการเก็บโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบกระด้าง แข็ง คล้ายขนสัตว์หรือผ้ากำมะหยี่ อาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆ จากการสร้างสปอร์ เช่น สีขาว สีครีม สีเทา เป็นต้น บันทึกลักษณะของโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่ทำการเก็บ นำโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกมาทำให้บริสุทธิ์โดยขีดลาก (cross streak) ลงบนอาหารแข็ง starch casein agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อเจริญ และทำการเก็บโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกเป็น stock culture ด้วยการขีดลากลงบนอาหาร starch casein agar นำ stock culture เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจัดจำแนกต่อไป

3. เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum* spp.) ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum* spp.) ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ปิยะฉัตร วิริยะอำไพวงศ์ โดยทำการคัดแยกเชื้อ *Colletotrichum* spp. จากใบหน้าวัวที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส (Wiriyaampaiwong *et al*., 2013)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4.1 ศึกษาสีของกลุ่มสปอร์ และสีเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) โดยวิธี cross hatch streak method (Shirling and Gottlieb, 1966) โดยนำแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มาทำ cross hatch streak ลงบนอาหาร oatmeal agar เตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 ml ปิเปตสารละลายสปอร์ 0.05 ml ที่เตรียมไว้หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง oatmeal agar แล้วใช้ลูป (loop) ฆ่าเชื้อแตะหยดสารละลายสปอร์ลากเป็นแนวยาวขนานกัน 5 แถว หลังจากนั้นใช้ลูปฆ่าเชื้อขีดลากเชื้อเป็นเส้นคดเคี้ยวไปมาเชื่อมต่อระหว่าง 5 แถว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วบันทึกผลสีของกลุ่มสปอร์ที่เจริญเหนืออาหาร สังเกตและบันทึกสีของเส้นใยใต้ผิวอาหาร โดยใช้ลูปพลิกโคโลนีที่แผ่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2 ศึกษาลักษณะเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) และเส้นใยใต้ผิวอาหาร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี cover slip culture (Kandasamy *et al.,* 2012) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ลงบนผิวหน้าอาหาร starch casein agar จากนั้นใช้กระจกปิดสไลด์ฆ่าเชื้อเสียบลงบริเวณที่ขีดลากเชื้อทำมุมกับอาหาร 45 องศา ให้ลึกลงไปในเนื้อวุ้นประมาณครึ่งแผ่นสไลด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ปล่อยให้เชื้อเจริญทั้งบนอาหารและบนกระจกปิดสไลด์ ศึกษาและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะของรูปร่างเส้นใยเหนือผิวอาหาร รูปร่างของสปอร์ที่สร้างโดยเส้นใยเหนือผิวอาหารเป็นแบบสปอร์ที่ไม่มีสิ่งหุ้ม (conidia) หรือเป็นสปอร์ที่เกิดจากปลายเส้นใยพองออกเป็นกระเปาะ (sporangiospore) และลักษณะของเส้นใยใต้ผิวอาหาร มีการแตกหักหรือไม่แตกหักโดยการเตรียมสไลด์สด (wet mount) ด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue

4.3 ศึกษาการสร้างรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร (melanin pigment) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้บนอาหาร peptone yeast extract iron agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบสีที่ปรากฏขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 4 และ 7 วัน ตามลำดับโดยเปรียบเทียบกับอาหาร peptone yeast extract iron agar ที่ไม่ได้ลงเชื้อซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีการเจริญบนอาหารและมีการปรากฏของสีในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร (+) และเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีการเจริญบนอาหารแต่ไม่มีการปรากฏของสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร (-) (Shirling and Gottlieb, 1966)

5. การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในหน้าวัว

ทดสอบความสามารถเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว ด้วยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955; Waksman and Woodruft, 1940) โดยใช้อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm เจาะเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อรามาวางบนอาหาร yeast extract malt extract agar (ISP 2) โดยวางให้ห่างจากขอบของจานเลี้ยงเชื้อ 2 cm จากนั้นทำการขีดเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลท โดยลากเป็นเส้นตรงยาวประมาณ 3 cm ในแนวตั้งฉากกับเส้นผ่าศูนย์กลาง ให้ห่างจากชิ้นของเชื้อราสาเหตุที่ทดสอบประมาณ 4 cm ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวัดบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ หรือโซนใส (inhibition zones) และคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยอ้างอิงวิธีการคำนวณตามวิธีของ เกษม (2532)

6. การผลิตและการสกัดสารปฏิชีวนะ

ถ่ายกล้าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สูงสุดอายุ 48 ชั่วโมง (5% โดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลว ISP2 ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ปริมาตร 100 ml บ่มเชื้อที่ 30°C 150 rpm เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที และทำการกรองโดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนที่เป็นไมซีเลียม (mycelium) ออกจากส่วนน้ำ

จากนั้นนำส่วนที่กรองได้ไปสกัดด้วย Ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 และทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) (Fguira *et al.,* 2005)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว (เสมอใจ และพรศิลป์, 2547)

7.1 การเตรียมพืช เตรียมต้นหน้าวัวซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมในการวางจำหน่าย ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกากมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

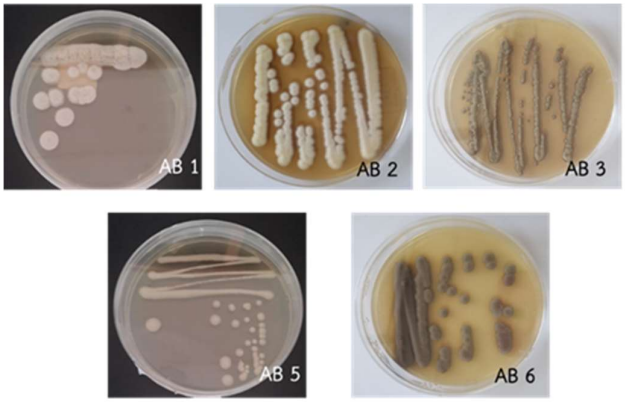
7.2 การปลูกเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำเชื้อราที่เลี้ยงไว้มาชะเอาสปอร์ที่ผิวหน้าโคโลนีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่หยด tween 20 ลงไป 3-4 หยด โดยใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าโคโลนีเบาๆ จากนั้นนำส่วนของสารละลายสปอร์ที่ได้มาปรับให้ได้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 10^5-10^7 spore/ml แล้วนำไปฉีดพ่นลงบนต้นหน้าวัวบริเวณใบที่ทำแผลด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ

7.3 การทดสอบ ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว โดยทำการฉีดพ่นสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สกัดได้ปริมาตร 10 ml ต่อใบ ด้วยเครื่องพ่นมือให้กับใบต้นหน้าวัว โดยทำให้ใบเกิดแผลด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^5-10^7 spore/ml ฉีดพ่นลงบนของต้นหน้าวัวบริเวณเดียวกันกับที่มีการฉีดพ่นสารสกัด ทำการฉีดพ่นสารสกัดและน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน คลุมต้นพืชด้วยด้วยถุงพลาสติก ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น ทำการตรวจนับขนาดของแผลบนใบหลังจากปลูกเชื้อ จำนวน 5 ใบต่อต้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงและประเมินการเกิดโรคโดยวัดพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรคเป็นร้อยละของพื้นที่ที่เกิดโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทุก 7 วัน

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกแอคติโนมัยสีท

จากการคัดแยกแอคติโนมัยสีทโดยวิธีการทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อบนอาหาร actinomycete isolation agar หลังทำการบ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าตัวอย่างวัสดุปลูกแต่ละแหล่งเมื่อนำมาคัดแยกสามารถคัดแยกไอโซเลตแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแสดงดังภาพที่ 1 คือ สีโคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาว ขอบเรียบ โคโลนียกตัวนูน ตรงกลางโคโลนียุบตัวลงเล็กน้อย เมื่อดูโคโลนีใต้จานอาหารพบว่า แผ่นโคโลนีเรียบ โคโลนีดูคล้ายผ้ากำมะหยี่ หนังสัตว์ หรือหยาบขรุขระคล้ายผงแป้ง



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร starch casein agar

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลตแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต พบว่าสีของกลุ่มสปอร์ (spore mass) มีสีเทา คือไอโซเลต AB-1, AB-3 และ AB-6 และสีของกลุ่มสปอร์มีสีขาว คือ AB-2 และ AB-5 แสดงดังภาพที่ 2 และลักษณะของสีเส้นใยใต้ผิวอาหารมีความหลายกหลายของสี เช่น สีเทา เหลือง น้ำตาล ดำ และ ขาว แสดงดังภาพที่ 3 โดยส่วนใหญ่ไอโซเลตแอคติโนมัยสีทมีลักษณะของการสร้างสปอร์เป็นแบบ conidia คือ จะสร้าง conidia ต่อกันเป็นเส้นสาย 80% และลักษณะสปอร์เรียงต่อกัน 2 เซลล์สปอร์ 20% และเมื่อศึกษาถึงการแตกหักของไมซีเลียม พบว่าทุกไอโซเลตแอคติโนมัยสีทมีลักษณะไมซีเลียมไม่แตกหัก เมื่อทำการทดสอบการผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร พบว่าไอโซเลต AB-1 และ AB-5 พบว่าไม่ผลิตรงควัตถุ และไอโซเลต AB-2 AB-3 และ AB-6 มีการผลิตรงควัตถุ โดยทั้งสามไอโซเลตมีการผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหารเป็นสีน้ำตาล ดังภาพที่ 4 ซึ่งสามารถสรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ดังตารางที่ 1

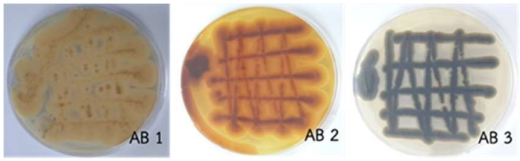
ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	Aerial mycelium		Substrate mycelium			Melanin pigment
	สีของ Spore	ลักษณะการสร้าง Spore (conidia)	สีของ Substrate mycelium	ลักษณะการแตกหัก/ไม่แตกหัก		
				แตกหัก	ไม่แตกหัก	
AB-1	เทา	เส้นสาย	ขาว	-	✓	-
AB-2	ขาว	เส้นสาย	น้ำตาล	-	✓	น้ำตาล
AB-3	เทา	เส้นสาย	เทา	-	✓	น้ำตาล

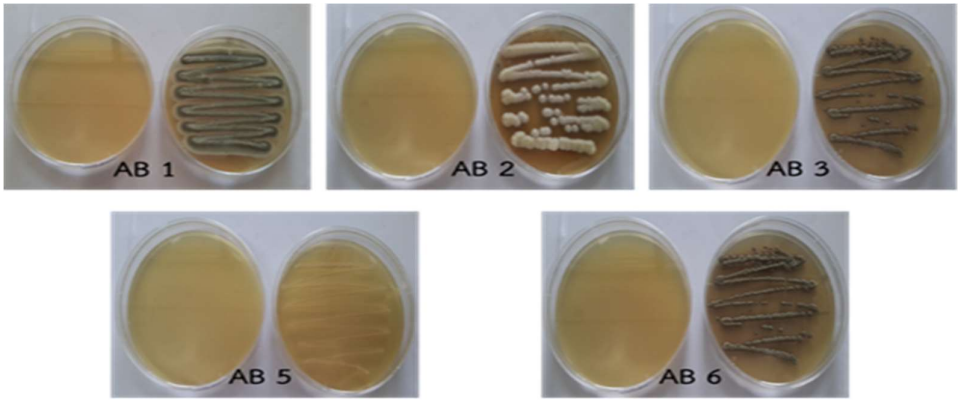
ไอโซเลต	Aerial mycelium		Substrate mycelium			Melanin pigment
	สีของ Spore	ลักษณะการสร้าง Spore (conidia)	สีของ Substrate mycelium	ลักษณะการแตกหัก/ไม่แตกหัก		
				แตกหัก	ไม่แตกหัก	
AB-5	ขาว	สปอร์คู่ต่อกัน	เหลือง	-	✓	-
AB-6	เทา	เส้นสาย	ดำ	-	✓	น้ำตาล

จากรายงานการวิจัยพบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ถูกคัดแยกได้จากดินซึ่งถือเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดที่พบแอคติโนมัยสีท โดยสามารถพบเป็นจำนวนประมาณ 10% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน (Janssen, 2006) แอคติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (saprophyte) ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบพวก พอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน ไคติน โดยจะพบแอคติโนมัยสีทในดินที่มีฮิวมัสและแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นจำนวนมากถึง 106 cell/g ดินแห้ง (Goodfellow and Williams, 1983) ในขณะที่ดินที่มีน้ำขัง ไม่มีออกซิเจน และดินที่เป็นกรด จะพบแอคติโนมัยสีทในจำนวนที่น้อยกว่า คือ 10^2-10^3 cell/g ดินแห้ง (Williams and Wellington, 1982) ชนินทร์ และคณะ (2546) รายงานการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง โดยคัดแยกได้แอคติโนมัยสีท 160 และ 186 ไอโซเลต ส่วนใหญ่เป็น แอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ Wang *et al.* (2001) รายงานการค้นพบแอคติโนมัยสีทสกุล *Actinopolymorpha* จากดินในป่าเขตร้อน (tropical rainforest) ในประเทศสิงคโปร์ นอกจากนี้สามารถพบแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือและอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนในสิงค์โปร์ ป่าภูเขาในญี่ปุ่น ป่าใบแข็งในออสเตรเลีย (Jayasinghe and Parkinson, 2008) Jiménez-Esquilín and Roane (2005) รายงานว่าจำนวนแอคติโนมัยสีทในดินบริเวณรอบรากพืชพวก Artemisia ที่ระดับสูงกว่าระดับน้ำทะเลมีจำนวนมากกว่าที่ระดับต่ำกว่าระดับน้ำทะเล และมี 4 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้กว้าง ซึ่งทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ สุจิตกัลยา (2560) สามารถแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร starch casein agar ได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต เมื่อจำแนกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces Norcardiopsis* และ *Actinomyces*

ภาพที่ 2 สีของกลุ่มสปอร์ของไอโซเลตแอคติโนมัยสีท



ภาพที่ 3 สีเส้นใยใต้ผิวอาหารของไอโซเลตแอคติโนมัยสีท



ภาพที่ 4 ความสามารถในการผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหารของไอโซเลตแอคติโนมัยสีท

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในหน้าวัว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่าไอโซเลต AB-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสสูงสุดคือ 61.25% แตกต่างจากแอคติโนมัยสีทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต AB-2 (46.67%) ส่วนไอโซเลต AB-3 และ AB-6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกันคือ 42.50% และ 42.08% ตามลำดับ และไอโซเลต AB-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสต่ำที่สุดคือ 8.75% (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร ISP 2 โดยวิธี dual culture technique

แอคติโนมัยสีท	**เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ**[1]
ไอโซเลต AB-1	61.25a
ไอโซเลต AB-2	46.67bc
ไอโซเลต AB-3	42.50c
ไอโซเลต AB-5	8.75d
ไอโซเลต AB-6	42.08c

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

[2] ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาพที่ 5 ความสามารถของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร ISP 2 โดยวิธี dual culture technique

4. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว (ตารางที่ 3) พบว่าร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวเมื่อใช้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยชุดทดลองที่ใช้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสทำให้เกิดโรคบนใบหน้าวัวร้อยละ 11.09 ในขณะที่ชุดควบคุมร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวเท่ากับ 9.11 แม้ว่าการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AB-1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร ISP 2 ได้สูงถึง 61.25% ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการผลิตสารปฏิชีวนะหรือฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ น่าจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ดังกล่าวอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าบนเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ถึงว่าสารที่สกัดได้มีความคงตัวต่ำจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวต่ำด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Shahidi *et al.* (2006) พบว่าสารสกัดที่ผลิตจากสายพันธุ์ *Streptomyces coralus* strain 63 สามารถยับยั้ง *Ralstonia solanacearum* โดยมีความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน 40 วัน แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาสารสกัดที่อุณหภูมิห้อง และ 45°C ทำให้ความคงตัวของสารสกัดเสื่อมประสิทธิภาพได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ นวลรัตน์ (2554) ทำการทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces vinaceusdrappus* พบว่าสารสกัดจากเชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน

ตารางที่ 3 ลักษณะอาการเกิดโรคที่ใบของต้นหน้าวัวเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว

การทดลอง	ลักษณะอาการเกิดโรคที่ใบ		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 30
ชุดควบคุม			

การทดลอง	ลักษณะอาการเกิดโรคที่ใบ		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 30
ชุดทดลอง			

สรุปผล

จากการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากวัสดุปลูกต้นหน้าวัวจากแหล่งขยายพันธุ์และจำหน่าย 5 แหล่ง คือ ขอนแก่น บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี นครราชสีมา และมหาสารคาม สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังนี้ สีของกลุ่มสปอร์มีสีเทา คือไอโซเลต AB-1, AB-3 และ AB-6 และสีของกลุ่มสปอร์มีสีขาว คือ AB-2 และ AB-5 และลักษณะของสีเส้นใยใต้ผิวอาหารมีความหลายกหลาย เช่น สีเทาเหลือง น้ำตาล ดำ และขาว โดยส่วนใหญ่ไอโซเลตแอคติโนมัยสีทมีลักษณะของการสร้างสปอร์เป็นแบบ conidia คือจะสร้าง conidia ต่อกันเป็นเส้นสาย ยกเว้น AB-5 มีลักษณะของการสร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เรียงต่อกัน 2 เซลล์สปอร์ แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหารเป็นสีน้ำตาล แต่ไอโซเลต AB-2 และ AB-5 ไม่พบการผลิตรงควัตถุที่แพร่ลงสู่อาหาร การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่าไอโซเลต AB-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสสูงสุดคือ 61.25% รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต AB-2 (46.67%) ส่วนไอโซเลต AB-3 และ AB-6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกันคือ 42.50% และ 42.08% ตามลำดับ และไอโซเลต AB-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสต่ำที่สุดคือ 8.75% การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัว พบว่าร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวเมื่อใช้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยชุดทดลองที่ใช้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสทำให้เกิดโรคบนใบหน้าวัวร้อยละ 11.09 ในขณะที่ชุดควบคุมร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบของต้นหน้าวัวเท่ากับ 9.11

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ปีงบประมาณ 2557 ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้รา *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช. 9(1): 28-33

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จรัญ เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนัน และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรา เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 363-370 น.

นวลรัตน์ หนูขาว. 2554. การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง. 2560. การคัดแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย. วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. 12(1): 107-117.

สุเนตรา ภาวิจิตร. 2537. โรคใบไหม้ของต้นหน้าวัวพบใหม่ในประเทศไทย. วารสารข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 4: 21.

เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ, โอฬาร พิทักษ์, วารี เจริญผล. 2550. หน้าวัวตัดดอก. (สืบค้นเมื่อ 10 มีนาคม 2556) Available from: http://www.ku.ac.th/e-magazine/apr50/agri.html

เสมอใจ ชื่นจิตต์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2547. การควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยชีววิธี. (สืบค้นเมื่อ 25 ตุลาคม 2556) Available from: http://natres.psu.ac.th/researchcenter/websitebio/research47/Anthurium47.pdf

Desshmukh, H.V. and Mehetre, P.B. 2011. Influence of different carbon compounds on vegetative growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of anthurium. International Journal of Plant Protection. 4(2): 421-422.

Fguira, L.F., Fotso, S., Ameur-Mehdi, R.B., Mellouli, L. and Laastsch, H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. US80. Res. Microbiol. 156: 341-347.

Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. European Journal of Soil Biology. 38: 85–88.

Goodfellow, M. and William, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 37: 189-216.

Hayakawa, M., Kajiura, T.K. and Nonomura, H. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil. Journal of Fermentation and Bioengineering. 72: 327 – 333.

Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1719-1728.

Jayasinghe, B.A.T.D and Parkinson, D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Appl. Soil Ecol. 38: 109-118.

Jiménez-Esquilín A.E. and Roane, T.M. 2005. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32: 378-381.

Kandasamy, S., Muthusamy, G., Thangaswamy, S. and Senthilkumar, B. 2012. Screening and Identification of Antibiotic Producing Actinomycetes and their Antagonistic Activity Against Common Pathogens. World Research Journal of Antimicrobial Agents. 1(1): 7- 10.

Mahadevan, B. and Crawford, D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108. Enzyme and Microbial Technology. 20: 489–493.

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 45: 417-420.

Norman, D.J. and Yuen, J.M.F. 1999. First report of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* infecting pot anthurium production in Florida. Plant Disease 83: 300.

Nanjwade, B.K., Chandrashekhara, S., Shamarez, A.M., Goudanavar, P.S. and Manvi, F.A. 2010. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes. Trop. J. Pharm. Res. 9(3): 231-236.

Samac, D.A., Willert, A.M., McBride, M.J. and Kinkel, L.L. 2003. Effects of antibioticproducing Streptomyces on nodulation and leaf spot in alfalfa. Applied Soil Ecology. 22: 55–66.

Shahidi, G.H., Zamanian, S., Aghighi, S., Rashid, P., Mahdavi, M.J. and Saadoun, I. 2006. Antibacterial activity of Iranian *Streptomyces coralus* strain 6 3 against Ralstonia solanacearum. Journal of Biological Sciences. 6(1): 127-129.

Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Method for characterization of Streptomyces species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16(3): 313-340.

Upadhyay, R.S. and Rai, B. 1988. Biocontrol agents of plant pathogens: their use and practical constraints. In: Mukerji, K.G. and Garg, K.L. (eds.) Biocontrol of Plant Disease Vol. 1. CRC Press Inc.: Florida, USA. pp. 15–36.

Waksman, S.A. and Woodruft, H.B. 1940. Bacterioatatic and Bactericidal substances produced by soil actinomycetes. J. Bacteribiol. 40: 609.

Wang, Y.M., Zhang, Z.S., Xu, X.L., Ruan, J.S. and Wang, Y. 2001. *Actinopolymorpha singaporensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 467-473.

Williams, S.T., Davies, F.L. and Cross, T. 1968. Identification of genera of the Actinomycetales. In Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. (Eds.) Identification Methods for Microbiologists. Academic Press, London.

Williams, S.T. and Wellington, E.M.H. 1982. Actinomycetes, In Page, A.L., Miller, R.H. and Keency, O.R. (Eds.) Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. (pp. 969-987). American Society of Agronomy/Soil Science Society of America: Madison.

Wiriyaampaiwong, P., Chomnawang, P., Sootsuwan, K. and Samranpong, O. 2013. Preliminary study on isolation of fungal pathogen causing anthracnose of *Anthurium andraeanum* in Thailand. In The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013), The Emerald Hotel, Bangkok, 16-19 October.