# ระยะเวลาการบ่มเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

# Effective Actinomycetes Culture Medium Incubation Period in Controlling *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Causing Mango Anthracnose

วิลาสินี แสงนาค[1/,2/,3/] สรัญยา ณ ลำปาง [1/,2/,3/]

Vilasinee Saengnak[1/,2/,3/] Sarunya Nalumpang[1/,2/,3/]

## ABSTRACT

Studies on evaluation of the suitable incubation range of culture mediums from six strains of soil actinomycetes namely NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 snd NSP6 isolated from the Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai province in controlling *Colletotrichum gloeosporioides* isolate NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide. HR) causing anthracnose disease on mango cv 'Nam Dok Mai'. The actinomycetes were cultivated on enzyme production medium (EPM) and then were separated into two parts: culture medium (NF) and another part which were filtrated by bacterial filtrate membrane (Minisart®), culture filtrate medium (F). The suitable incubation period of actinomycetes culture mediums in inhibiting the colony growth of the pathogen were 3 – 7 days and decreased when the incubation time was increased, which showed antifungal activities in range of 38.88 - 77.50%. Moreover, the antifungal activities from culture mediums which filtrations of actinomycetes away were significantly lower than culture mediums. For testing in term of decreasing anthracnose disease on mango fruits, the highest efficacy were given from 5 days incubation cultured medium, which were in

1/ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

1/ Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai province 50200

2/ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

2/ Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom province 73140

3/ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา จตุจักร กทม. 10900

3/ Centre of Exellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Science and Technology Postgradute of Higher Education Commission, Education and Research Development Office, Chatuchak, Bangkok, 10900

range of 16.56 - 37.80%. Both actinomycetes culture mediums were not given any effect on the mango fruits.

**Key-words**: actinomycetes culture medium, anthracnose, mango

## บทคัดย่อ

การวิจัยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาระยะเวลาของการบ่มโดยการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินเขตป่าที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ. เชียงใหม่ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ไอโซเลท NDM__F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ในระดับสูง (highly resistant, HR) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (culture medium, NF) และอีกส่วนนำไปกรองผ่านชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) เรียกว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่กรองเอาเชื้อออก (culture filtrate medium, F) โดยจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion method พบว่าระยะเวลาการบ่มอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคคือ 3 - 7 วัน และประสิทธิภาพลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มเลี้ยงเชื้อ โดยมีประสิทธิภาพในระหว่าง 38.88 - 77.50% นอกจากนี้การกรองเอาเชื้อออกทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเหลวลดลงต่างจากการไม่กรองเชื้อออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทดสอบในด้านลดการเกิดโรคบนผลมะม่วง พบว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มเป็นเวลาเวลา 5 วัน ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด อยู่ในระหว่าง 16.56 - 37.80% โดยที่อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผลมะม่วง

**คำหลัก**: อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ แอนแทรคโนส มะมวง

## คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นหนึ่งในพืชปลูกที่มีความสำคัญในเขตร้อน และกึ่งร้อนของโลก โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย (Singh *et al.*, 2008) ซึ่งในปัจจุบันนี้ความต้องการผลสดของมะม่วงทั้งภายในและต่างประเทศ ต่างก็มีปริมาณสูงขึ้นเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มว่าจะมีการส่งออกมากขึ้นด้วย ทำให้มะม่วงกลายเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยอีกชนิดหนึ่ง แต่ปัญหาที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งในการปลูกมะม่วง นอกเหนือจากการปฏิบัติดูแลรักษาในระยะต่างๆ การผลิตมะม่วงได้ผลผลิตมีคุณภาพและคุ้มค่าการลงทุนแล้ว คือปัญหาในการควบคุมและการ

ป้องกันกำจัดโรคมะม่วง โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส (สมศิริ, 2530; Rewal, 1997; Akem, 2006; Nelson, 2008) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตเป็นอย่างมาก ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยว และโดยเฉพาะหลังการเก็บเกี่ยว (Ploetz, 2003) ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ส่งผลทำให้ผลผลิตเน่าเสีย อายุการเก็บรักษาสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และไม่สามารถส่งออกผลผลิตได้ (สมศิริและคณะ, 2539) โรคแอนแทรคโนสเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (หรือ *Glomerella cingulata* ในระยะ perfect stage) ซึ่งสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วน และระยะการเจริญเติบโตของมะม่วง ตั้งแต่ระยะกล้า แทงช่อดอก ติดผลและระยะหลังการเก็บเกี่ยว (Mills *et al.*, 1992; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Yenjit *et al.*, 2004, Akem, 2006) โดยเชื้อราชนิดนี้จะสร้างสปอร์เมื่ออากาศมีความชื้น และแพร่กระจายโดยฝนและลม ซึ่งลักษณะดังกล่าวส่งผลให้เชื้อราสามารถแพร่โรคในระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้น (Pitkethley and Conde, 2007)

ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสนั้น เกษตรกรนิยมใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมในกลุ่มเบนซิมิดาโซล เช่น คาร์เบนดาซิม เบนโนมิลหรือไทอะเบนดาโซลมากกว่า 20 ปี เนื่องจากเชื่อว่าเป็นวิธีการควบคุมโรคที่ดีกว่าวิธีการอื่นๆ (Pongsuwan, 1993) ซึ่งสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทนี้ให้ผลดี และใช้ควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด แต่ผลเสียของการใช้สารเคมีประเภทดังกล่าว เมื่อใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน คือทำให้เชื้อราต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ โดยลักษณะดังกล่าวสามารถสืบต่อไปยังเชื้อรารุ่นต่อไปได้ ทำให้ไม่สามารถใช้สารเคมีนั้นในการควบคุมโรคได้อีกในคราวต่อไป (ธรรมศักดิ์, 2543) ซึ่งปัญหาการต้านทานต่อสารเคมีได้กลายเป็นปัญหาใหญ่ต่อการควบคุมโรคพืชในหลายพื้นที่ปลูก (Akem, 2006) อีกทั้งนี้ผู้บริโภคยังคงต้องการอาหารที่ปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ทำให้ในปี พ.ศ. 2547 World Trade Organization (WTO) ได้มีการประกาศให้ตรวจสอบสารเคมีตกค้างในโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (Codex Alimentarius Commission, CAC) เพื่อเป็นจุดวัดมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (sanitary and phytosanitary, SPS) (Arauz, 2000) รวมถึงปัญหาการขึ้นราคาของสารเคมีเหล่านี้ จึงทำให้เกษตรกรเริ่มแสวงหาหนทางในการป้องกันกำจัดโรคด้วยวิธีการอื่น เช่น การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นต้น

การใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในการควบคุมโรคพืช ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืช โดยวิธีการทางชีวภาพ เนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เป็นจุลินทรีย์ (Goodfellow and O'Donnell, 1989) ที่มีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ การย่อยสลายอินทรียวัตถุ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟตในรูปที่

พืชนำไปใช้ได้ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และมีความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช (มาลินี, 2540) และ Macagnan และคณะ (2008) ยังพบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อ *Streptromyces* spp. สร้างขึ้น สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อรา *Moniliopthora perniciosa* (Stahel) Aime + Phillips-Mora โดยไคติเนสจะย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากคุณสมบัติดังกล่าวในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง โดยปรับใช้ในรูปแบบของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสผิวของมะม่วงโดยตรง รวมถึงหาระยะเวลาสำหรับการบ่มเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำไปใช้ในการควบคุมโรคโดยชีววิธี

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงที่แยกจากผลมะม่วง (fruit, F) พันธุ์น้ำดอกไม้ (cv Nam Dok Mai, NDM) ไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง (highly resistance, HR) จากภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ (Kongtragoul *et al.*, 2011) เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน

### การเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์

เตรียมเชื้อแอกติโนไมซีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย (Suthep-Pui National Park) อ. เมือง จ. เชียงใหม่ เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 °ซ. เป็นเวลา 10 วัน ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เจาะโคโลนีของเชื้อแล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มม. ปริมาตร 100 มม. จำนวน 20 ชิ้นเชื้อ (culture disc) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เมื่อครบ 3 วัน แบ่งอาหารเหลวที่บ่มไว้ออก ส่วนอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อในส่วนที่เหลือนำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่า ดำเนินการเช่นนี้ทุกวันจนครบ 15 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่แบ่งออกมาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อให้ตกตะกอน แล้วแยกส่วนของตะกอนทิ้งแล้วนำส่วนใสแบ่งใส่หลอดใหม่ 2 ส่วน ส่วนแรกเรียกว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (non filtrated culture medium, NF) และส่วนที่สองนำไปกรองผ่านชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ซึ่งมีขนาดของรู 0.22 ไมโครเมตร เรียกอาหารส่วนนี้ว่า อาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่กรองเอาเชื้อออก (culture filtrated medium, F)

**1. ประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค**

ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method (Bauer, 1996) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ 2 ชั้น (double layers) เจาะหลุมบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นบน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. โดยให้แต่ละหลุมห่างจากขอบจานอาหาร 2 ซม. จำนวน 4 หลุม/จานอาหาร สำหรับการทดสอบในแต่ละจานอาหารประกอบด้วยชุดทดสอบคือ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบหลุมละ 1 ไอโซเลท และชุดควบคุมคือ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ EPM ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ โดยหยดหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นวางชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคไว้ตรงกลางจานอาหารใน วันเดียวกับการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ บ่มจานอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การทดลองแบบวางแผน Factorial in CRD ทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (percent inhibition of colony growth, PICG)

$$\text{โดยใช้สูตร } PIRG = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือความยาวรัศมีของเชื้อราชุดควบคุมและ R2 เป็นชุดทดสอบ (เกษม, 2532)

**2. ประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง**

คัดเลือกอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มโดยการเขย่าเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส บนผลมะม่วงสุกพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปราศจากโรคและแมลง โดยล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 1 นาที ทำแผลก่อนการปลูกเชื้อด้วยเข็มที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 8 แผล/ผล แผลละ 6 เข็ม ลึกประมาณ 2 มม. จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อราสาเหตุโรคความเข้มข้น $10^6$ สปอร์/มล. แล้วทดสอบโดยการนำ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุผสมกับอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในอัตราส่วน 1:1 ส่วนชุดควบคุมนำ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุผสมกับอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เขย่าให้เข้ากัน สำหรับการปลูกเชื้อมะม่วง 1 ผล ประกอบด้วยกรรมวิธีดังนี้ ชุดทดสอบ ได้แก่ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุผสมกับอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ส่วน NF และ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุผสมกับอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ส่วน F ส่วนชุดควบคุมได้แก่ อาหาร

เหลว EPM ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ น้ำกลั่น อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ส่วน NF อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ส่วน F spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคความเข้มข้น $10^6$ สปอร์/มล. และกรรมวิธีที่ทำแผลเพียงอย่างเดียว โดยในแต่ละกรรมวิธีจะปลูกเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร การทดลองแบบวางแผน CRD ทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ รวบรวมผลมะม่วงไว้ในกล่องความชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 °ซ. หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งขนาดของแผล

$$\text{โดยใช้สูตร } \% = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราชุดควบคุม และ B เป็นชุดทดสอบ (เกษม, 2532)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 โดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมดผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิดได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก และเชื้อรา *Cercospora lactucae-sativae* Sawada สาเหตุโรคใบจุดในผักกาด (ณัฐพงศ์, 2553; วรรษมน, 2553) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย 100% นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Curvilaria lunata* (Wakker) Boedjin และ *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ, *F. oxysporum* f. sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของพริก *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ของสตรอเบอร์รี และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง (จันทร์ฉาย, 2553; จิราภรณ์, 2553; ชิงชัย, 2553; ฉวีวรรณ, 2553; วราพรรณ์, 2553; วิลาสินี, 2555) ได้มากกว่า 70% และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมดยังมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลสและไคติเนส (ณัฐพงศ์, 2553; วรรษมน, 2553; วิลาสินี, 2555; Suwan, 2012) ซึ่งจากการจัดจำแนกด้วยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ และการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บางส่วนของตำแหน่ง 16S rDNA gene พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptpmyces* (วิลาสินี, 2555; Suwan *et al.*, 2012)

### 1. ประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

หลังจากการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคคือ 3 - 7 วัน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเหลวเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM__F012 อยู่ในระหว่าง 50.00 - 77.50% โดยที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์

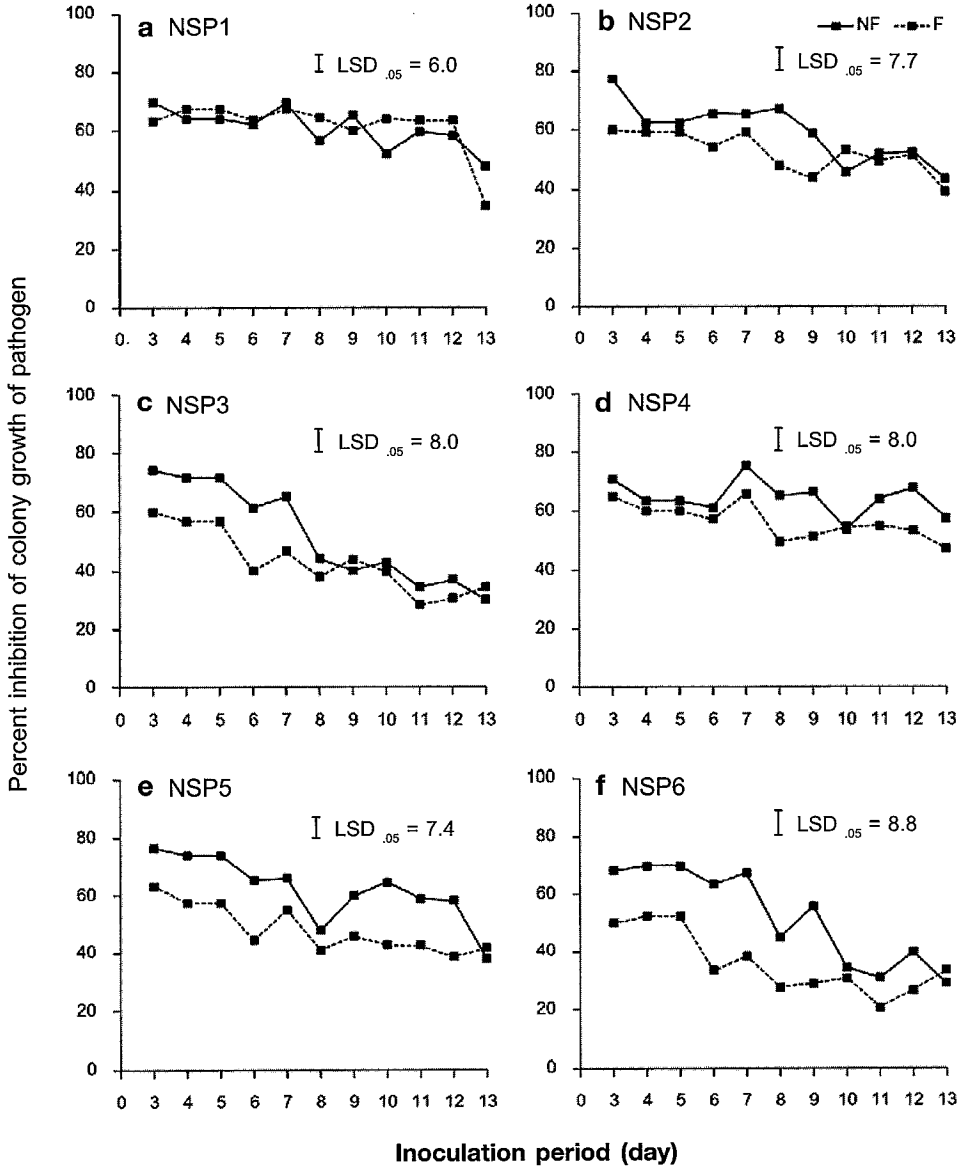


**Figure 1.** Efficacy of actinomycetes culture mediums (NF and F) incubated by shaking for 3 - 13 days, on inhibiting the mycelia growth of *Colletotrichum gloeosporioides* NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide, HR) causing mango anthracnose on potato dextrose agar at 7 days after inoculation by agar well diffusion method.

ไอโซเลท NSP2 มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเหลวเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 4 และ 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญอยู่ในระหว่าง 52.50 - 74.17% โดยที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP5 มีประสิทธิภาพสูงสุด และอาหารเลี้ยงเหลวเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 7 วัน โดยมีการยับยั้งการเจริญอยู่ในระหว่าง 38.33 - 75.20 % โดยที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP4 มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีตส์แต่ละไอโซเลทจะให้ประสิทธิภาพต่างกัน และพบว่าประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ลดลงตามระยะเวลาของการบ่มเชื้อที่เป็นเวลานานขึ้น (Figure 1)

สำหรับวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงด้วยวิธี Ager well diffusion method เป็นวิธีการที่มีความเหมาะสม สามารถสังเกต inhibition zone จากบริเวณที่ทดสอบได้ (Figure 2) โดย inhibition zone ที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์สร้างขึ้น ซึ่งได้ทดสอบโดยพรนภาและคณะ (2554) ที่ได้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่กรองเอาเชื้อออก (F) ทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ โดยวัดจาก *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และใช้ *N*-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า enzyme activity โดยวัดตั้งแต่วันที่ 1 - 7 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทุกไอโซเลทมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

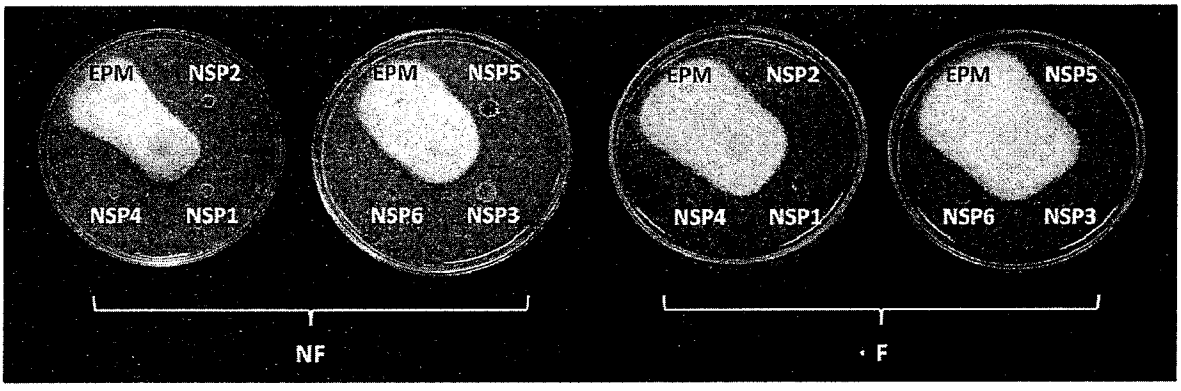


**Figure 2.** Efficacy of actinomycetes culture mediums (NF and F) incubated by shaking for 5 days, on inhibiting the mycelia growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide; HR) causing mango anthracnose on potato dextrose agar at 7 days after inoculation by agar well diffusion method; the control was tested with enzyme production medium (EPM).

คือ ในระยะแรก (1 - 2 วัน) มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสขึ้นเพียงเล็กน้อย ต่อมาเอนไซม์ถูกสร้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 และ NSP6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่า 0.080 0.111 0.051 0.151 และ 0.110 mUnit/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ 0.094 mUnit/ml หลังจากนั้นเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP4 สร้างเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของพรนภาและคณะ (2554) ให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในงานวิจัยชิ้นนี้ (สูงที่สุดโดยเฉลี่ยในวันที่ 3) และเมื่อหาค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีตส์ทุกไอโซเลทในแต่ละวันของการบ่มเขย่า (ตั้งแต่ 3 - 13 วัน) พบว่าการกรองเอาเชื้อออกทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเหลวลดลง ซึ่งแตกต่างจากส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นการบ่มเขย่าเป็นเวลา 10 และ 13 วัน (Figure 3) เนื่องจากในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกยังมีเซลล์ของเชื้อเจริญในอาหาร ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสออกมาได้

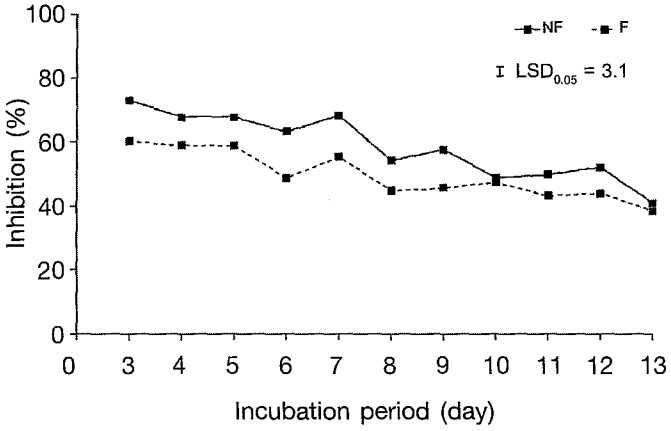


**Figure 3.** Average efficacy of actinomycetes culture mediums (NF and F) incubated by shaking for 3 - 13 days, on inhibiting the mycelia growth of *Colletotrichum gloeosporioides* NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide; HR) causing mango anthracnose on potato dextrose agar at 7 days after inoculation by agar well diffusion method; the control was tested with enzyme production medium (EPM).

อย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงกว่า แต่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อออกอาจมีเอนไซม์อยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำกว่า

## 2. ประสิทธิภาพของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มเป็นเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงสุด แต่สำหรับการทดสอบในด้านลดการเกิดโรค พบว่าไม่สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงได้ ต่างจากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มเป็นเวลาเวลา 5 วัน หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรคบนผลมะม่วง โดยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 22.55 - 37.80% ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท NSP4, NSP3 และ NSP5 มีประสิทธิภาพลดการเกิดโรคได้ 37.80 34.69 และ 34.69% ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพอยู่ในระหว่าง 16.56 - 28.62% ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดได้แก่ ไอโซเลท NSP4 และ NSP3 มีประสิทธิภาพลดการเกิดโรคได้ 28.62 และ 27.24% ส่วนอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่บ่มเป็นเวลาเวลา 7 วัน มีประสิทธิภาพลดลงมา ซึ่งอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในระหว่าง 24.14 – 33.24% ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดได้แก่ไอโซเลท NSP4 มีประสิทธิภาพลดการเกิดโรคได้ 33.24% ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในระหว่าง 15.17 – 22.69% ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด

**Table 1.** Effect of actinomycetes culture medium (NF) and actinomycetes culture filtrate medium (F), incubated by shaking for 5 and 7 days, on reduction anthracnose disease on mango fruits cv 'Nam Dok Mai' by *Colletotrichum gloeosporioides* NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide, HR) at 4 days after inoculation.

| Actinomycetes isolate | Percent reduction of anthracnose disease | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 5 days incubation period | | 7 days incubation period | |
| | NF | F | NF | F |
| NSP1 | 28.62 ab | 21.10 ab | 25.58 ab | 19.72 ab |
| NSP2 | 28.69 ab | 20.62 ab | 27.11 ab | 16.56 ab |
| NSP3 | 34.69 a | 27.24 a | 24.14 b | 22.69 a |
| NSP4 | 37.80 a | 28.62 a | 33.24 a | 21.18 ab |
| NSP5 | 34.69 a | 24.21 ab | 31.72 ab | 21.04 ab |
| NSP6 | 22.55 b | 16.56 b | 24.21 b | 15.17 b |
| **$LSD_{0.05}$** | **10.15** | **9.16** | **8.23** | **6.97** |
| **CV(%)** | **18.30** | **22.33** | **16.71** | **20.20** |

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

NF = non filtrated culture medium, F = culture filtrated medium

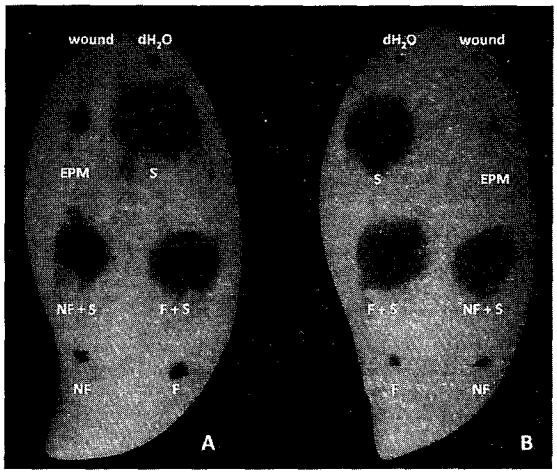


**Figure 4.** Effect of actinomycetes culture mediums (NF and F) incubated by shaking for 5 and 7 days, on reduction anthracnose disease on mango fruits cv 'Nam Dok Mai' by *Colletotrichum gloeosporioides* NDM__F012 (highly resistant to carbendazim fungicide, HR) at 4 days after inoculation; wound = wounding only, $dH_2O$ = distilled water, EPM = enzyme production medium, S = pathogen spore suspension 1 × $10^6$ spores/ml, A = 5 day-old actinomycetes culture mediums treated and B = 7 day-old actinomycetes culture mediums treated.

ได้แก่ ไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพลดการเกิดโรคได้ 22.69% (Table 1)

เมื่อตรวจสอบผลของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ต่อผลมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไม่มีผลกระทบใดๆ ซึ่งจะเห็นได้จากบริเวณชุดควบคุมที่หยดเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไม่พบอาการผิดปกติหรืออาการของโรคแอนแทรคโนสแต่อย่างใด พบเพียงรอยช้ำที่เกิดจากการทำแผลเท่านั้น (Figure 4) แต่ในการศึกษาโดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไปใช้ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงยังอยู่ในระดับต่ำ (ต่ำกว่า 50%) (เกษม, 2532) คืออยู่ระหว่าง 15.17 - 37.80% ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาด้านการนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มเติม เช่น การฉีดตั้งแต่ระยะออกดอก เป็นต้น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรค เนื่องจากโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคแฝง (latent infection) สามารถทำให้เกิดโรคขึ้นได้กับทุกระยะการเจริญเติบโตของผลมะม่วง โดยทั่วไปแล้วการติดเชื้อนั้นเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของผลมะม่วง แต่อยู่ในลักษณะของการเข้าทำลายแบบแฝงก่อนที่ผลจะสุก (Spould and Schrenk, 2000) โดยเชื้อมีการพักแฝงตัวอยู่ในผลมะม่วงในรูปของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น epidermis และ subepidermis ลึกลงไปในผิวผลมะม่วง 2 - 3 ชั้น ของผิวของเซลล์จากผิวนอกสุด ซึ่งยังไม่มีการแสดงอาการของโรค และเริ่มมีการพัฒนาเป็นอาการของโรคแอนแทรคโนสเมื่อผลมะม่วงเริ่มสุก ภายหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับผลิตผลได้เป็นอย่างมาก (Mills *et al.*, 1992; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Yenjit *et al.*, 2004; Akem, 2006) รวมถึงการทดสอบในด้านของการป้องกัน โดยการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทิ้งไว้ก่อนการปลูกเชื้อ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ในการป้องกันโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง และเพื่อ

ทดสอบในแง่ของการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคในการสร้างภูมิคุ้มกันอีกด้วย

## สรุปผลการทดลอง

ในการนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง และการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท NDM__F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง โดยทดสอบในรูปของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่กรองเอาเชื้อออก (F) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ส่วน ที่บ่มโดยการเขย่าเป็นระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด ตามลำดับ แต่สำหรับการลดการเกิดโรคบนผลมะม่วง การบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการ โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผลมะม่วง ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์นี้ จะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี ซึ่งจะทำให้สามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดโรคแอนแทรคโนสได้


## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ ศ.ดร. คาซึยะ อะคิมิสึ รวมถึงสมาชิกของห้องปฏิบัติการของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยคากาว่า ประเทศญี่ปุ่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย รวมถึงสอนเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย


## เอกสารอ้างอิง


เกษม สร้อยทอง. 2532. *การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.* คณะเทคโนโลยีการอาหารสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ. 326 หน้า.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. *สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช.* พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ลินคอร์น กรุงเทพฯ. 317 หน้า.

จันทร์ฉาย จันทิมา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme ที่ติดมากับเมล็ดข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 64 หน้า.

จิราภรณ์ วิริยา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 66 หน้า.

ฉวีวรรณ มุกทา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 76 หน้า.

ชิงชัย ไชยศิริ. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme f.* sp. *capsici สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 81 หน้า.

ณัฐพงศ์ นวลดี. 2553. *การวิเคราะห์พันธุกรรมและควบคุมเชื้อรา Cercospora* spp. *ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสต์.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 164 หน้า.

พรนภา โทตรี ชาติชาย โขนงนุช และสรัญยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. *ว. วิทย. กษ.* 42 (1) (พิเศษ): 163-166.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2540. *ยาต้านจุลชีพ.* พิมพ์ครั้งที่ 4 จรัลสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ. 680 หน้า.

วราพรรณ์ ใจเย็น. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme f.* sp. *lycopersici สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 53 หน้า.

วิลาสินี แสงนาค. 2555. *ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อรา สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 200 หน้า.

สมศิริ แสงโชติ. 2530. โรคแอนแทรคโนสปัญหาของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว. *ว. พืชสวน* 21(3): 65-69.

สมศิริ แสงโชติ รัติยา พงศ์พิสุทธิ และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2539. โรคที่เกิดกับผลทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยว. หน้า 148-152. *ใน: รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34.* 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 สาขาพืช ประมง ณ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรษมน บุญยิ่ง. 2553. *การวิเคราะห์ลักษณะและการควบคุมเชื้อรา Colletotrichum* spp. *ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 180 หน้า.

Afanador-Kafuri, L., D. Minz, M.Maymon and S. Freeman, 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a

unique species from the genus. *J. Phytopatho.* 93(5): 579-587.

Akem, N.C. 2006. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. *J. Plant Pathol.* 5(3): 266-273.

Arauz, F.L. 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84(6): 600-611.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, S.C. Sherries and M. Turk, 1996. Antibiotic susceptibility of testing by a standard single disc method. *Am. J. Clinical. Pathol.* 36: 492-496.

Goodfellow, M. and A.G. O'Donnell. 1989. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. Pages 343-383. *In: Microbial Products: New Approaches. Society for General Microbiology Symposium.* Baumberg S., I. S. Hunter and P.M.Rhodes (eds.). No. 44. 1989 April. Cambridge University Press, Cambridge.

Kongtragoul, P., S. Nalumpang, Y. Miyamoto, Y. Izumi and K. Akimitsu, 2011. Mutation at codon 198 of *TUB2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *J. Plant Prot. Res.* 51(4): 377-384.

Macagnan, D., R.S. Romerio, A.W.V. Pomella and J.T. Souza, 2008. Production of lytic enzymes and siderophores and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control* 47(3):309-314.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Mills, P.R., S. Sreenivasaprasad and A.E.Brown. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 137–143.

Nelson, S.C. 2008. Mango Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) www.ctahr. hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/pd-48.pdf. 12 November, 2011.

Pitkethley, R. and B. Conde, 2007. *Plant Pathology*, Diagnostic Services, Darwin. No: 123 http://www.nt.gov.au/dpifm 24 March, 2011.

Ploetz, R.C. 2003. Diseases of mango.

Pages 327-363. *In: Disease of Tropical Fruit Crops.* Ploetz. R.C., and R.C. Ploetz (*eds.*), CAB International, Wallingford, UK.

Pongsuwan, D. 1993. *Quality Improvement of Fruit and Vegetable Crops for Export.* Bangkok: Section of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture, Bangkok. 112 p.

Rawal, D.R. 1997. Management of fungal diseases in tropical fruits. Pages 18-31. *In: Proceedings of the IPGRI-ICAR-UTFANET Regional Training Course on the Conservation and Use of Germplasm of Tropical Fruits in Asia.* Arora, R.K., and R.V. Ramanatha (eds.), held at Indian Institute of Hort. Res. 18-31 May, 1997, Bangalore, India.

Singh, S.B., I. Mukherjee, J. Maisnam, P. Kumar, M. Gopal and G. Kulshrestha. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *J. Environ. Sci. Health Part B.* 43: 300-306.

Spould, S. and H. Schrenk, 2000. Mango diseases. Pages. 153-182. *In: Disease of Fruits Crops.* Singh, R.S. (ed), Science Publishers, Inc. Plymounth, UK.

Suwan, N. 2012. *Actinomyctes Isolated from Natural Forest Soils and their Efficacy to Control Chili Anthracnose.* Doctor of philosophy in plant pathology thesis. Chiang Mai University. 178 p.

Suwan, N., W. Boonying and S. Nalumpang, 2012. Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides. J. Agri. Tech.* 8(2): 725-737.

Yenjit, P., W. Intanoo, C. Chamswarng, J. Siripanich and W. Intana. 2004. Use of promising bacterial strains for controlling antracnose on leaf and fruit of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides. Walailak J. Sci. & Tech.* 1: 56-69.