บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

พริกเป็นพืชเครื่องเทศที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ถูกนำมาใช้ประโยชน์มาเป็นเวลายาวนาน โดยมุ่งประโยชน์ทางด้านเป็นเครื่องปรุงแต่งรสและกลิ่นของอาหารทั้งในรูปของผลสดและผลแห้ง หรือถูกนำมาแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ซอสพริก เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำพริกมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอุตสาหกรรมยา สารสำคัญหลายชนิดที่พบในพริก เช่น quercetin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ flavonoid มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ ส่วนสาร capsaicin ที่ทำให้เกิดรสเผ็ดร้อนสามารถบรรเทาอาการปวดเมื่อย และชะลอความเสื่อมของร่างกายได้ (สุชีลา, 2549)

พริกที่รู้จักในประเทศไทยมีอยู่ในหลายชนิด ที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่ พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า พริกหนุ่ม พริกหวาน พริกหยวก เป็นต้น

อนุกรมวิธานของพริก

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Arteridae

Order: Solanales

Family: Solanaceae

Genus: *Capsicum*

Species: *C. annuum* Linn. var. *acuminatum* Fingerh (พริกชี้ฟ้า)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริก (สุชีลา, 2549 และมณีฉัตร, 2547)

ลำต้น พริกเป็นพืชไม้พุ่ม ลำต้นตรง แตกกิ่งก้านแบบรัศมี และกิ่งแขนงแตกสาขาแบบทวีคูณจาก 2 กิ่ง เป็น 4 กิ่ง และ 8 กิ่งไปเรื่อยๆ ต้นมีขนาดพุ่มลักษณะต่างๆ กัน เช่น พุ่มเตี้ยและพุ่มสูง

ราก พริกมีระบบรากแตกต่างกันไปตามพันธุ์ โดยส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีอายุยืนซึ่งมีรากแก้วที่แข็งแรง มีระบบรากหากินลึกมาก ต้นพริกที่โตเต็มที่จะมีรากฝอยแผ่ออกไปหากินด้านข้างในรัศมีเกินกว่า 1 เมตร และหยั่งลึกลงไปในดินเกินกว่า 1.2 เมตร

ใบ เป็นใบเดี่ยว ลักษณะแบนเรียบ มีขนบ้างเล็กน้อย มีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ไปจนกระทั่งเรียวยาว ก้านใบมีความยาวประมาณ 0.5-2.5 เซนติเมตร

ดอก เป็นดอกเดี่ยว เกิดที่ข้อ อาจจะมีหลายดอกเกิดจากข้อติดๆ กันจนดูคล้ายเป็นดอกช่อ ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2-3.5 เซนติเมตร ส่วนประกอบของดอกประกอบด้วย กลีบรองดอก 5 พู กลีบดอก 5 กลีบ บางชนิดอาจมี 4-7 กลีบก็ได้ เกสรตัวผู้มี 5-6 อันอยู่ที่ฐานของกลีบดอก อับละอองเกสรมีสีฟ้าหรือสีน้ำเงินอ่อน แยกตัวเป็นกระเปาะยาว รังไข่มี 2 ส่วน หรือมากกว่า ก้านชูเกสรตัวเมียสีขาวหรือม่วง

ผล เป็นประเภท berry ลักษณะเป็นกระเปาะ มีฐานขั้วผลสั้นและหนา โดยปกติผลอ่อนมักชี้ขึ้น เมื่อเป็นผลแก่พันธุ์ที่มีลักษณะขั้วผลอ่อนจะให้ผลที่ห้อยลง ผลมีลักษณะตั้งแต่แบนๆ กลมยาว จนถึงพองอ้วน สั้น ขนาดผลมีความยาวตั้งแต่ 1-30 เซนติเมตร ผนังผลบางจนกระทั่งหนา ผลอ่อนสีเขียวหรือม่วง ผลสุกมีสีแดง ส้ม เหลือง น้ำตาล ครีม หรือม่วง ผลพริกมีความเผ็ดแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ฐานของผลเป็นฐานรูปถ้วย หรือรูปจานรองถ้วยซึ่งใช้ในการแยกประเภทของพริก เมล็ดมีสีเหลืองซีด ความยาว 3-5 มิลลิเมตร

การจัดจำแนกพริกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ได้จัดจำแนกพันธุ์ปลูกออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะดอกและผล ในการจัดจำแนกกลุ่มต่างๆ ดังนี้

***Capsicum annuum* L.** เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันแพร่หลายมากที่สุด พริกชนิดนี้แตกต่างจากชนิดอื่น ได้แก่ มีดอกเดี่ยวและผลเดี่ยวๆ และก้านดอกมีทั้งชี้ขึ้นหรือห้อยลง ผลกว้างเกิน 0.8 เซนติเมตร และยาวตั้งแต่ 0.8-25 เซนติเมตร มีรสเผ็ดและไม่เผ็ด ในประเทศไทยมีการปลูกพริกพันธุ์นี้มากกว่าชนิดอื่นๆ โดยเรียกตามชื่อพื้นเมืองได้แก่ พริกยักษ์หรือพริกหวาน พริกจินดา พริกชี้ฟ้า พริกแดง เป็นต้น

***Capsicum baccatum* L.** มีต้นกำเนิดในเปรูและโบลิเวีย ปัจจุบันแพร่กระจายอยู่ทั่วทวีปอเมริกาใต้ พริกชนิดนี้มีขนาดและรูปร่างลักษณะของผลแตกต่างกันออกไปหลายรูปแบบ ผลอ่อนมีทั้งสีส้มไปจนถึงสีแดง มีความแตกต่างกับพันธุ์พริกอื่นตรงที่กลีบดอกสีขาวมีจุดสีเหลืองหรือสีน้ำตาลที่โคนกลีบดอกตัวอย่างของพันธุ์พริกชนิดนี้ ได้แก่ พริกอาจิ (aji)

***Capsicum chinense* Jacq.** พริกชนิดนี้ปลูกมากในแถบภูเขาแอนดีสในอเมริกาใต้ จากนั้นเริ่มแพร่เข้าสู่อเมริกาตอนกลางและตอนใต้ ลักษณะทั่วไปมีความคล้ายคลึงมากกับ *C. annuum* L. และ *C. frutescens* L. แต่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยพริกพันธุ์นี้มีรอยคอดบริเวณรอยต่อของกลีบเลี้ยงกับก้านดอก ในประเทศไทยมีพริกชนิดนี้อยู่หลายสายพันธุ์ ได้แก่ พริกขี้หนู พริกขี้หนูแดง พริกสวน เป็นต้น

***Capsicum frutescens* L.** มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้เช่นเดียวกับพริกชนิด ผิวผลเป็นมันหรือสะท้อนแสง ยาวประมาณ 6-10 มิลลิเมตร รูปร่างผลมีทั้งกลม กรวย จนถึงผลยาว มีรสเผ็ดจัด ตัวอย่างของพริกพันธุ์นี้ คือ พริกขี้หนูสวน และพันธุ์ Tobasco

***Capsicum pubescens* Ruiz & Pavon** เป็นพริกที่มีต้นกำเนิดในโบลิเวีย แต่ปัจจุบันปลูกกันทั่วทวีปอเมริกาจนถึงอเมริกากลาง ผลของพริกมีเนื้อหนา มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำสูง แต่มีรสเผ็ด ลักษณะเด่นของพริกชนิดนี้ได้แก่ กลีบดอกสีม่วง ไม่มีจุดและเมล็ดสีดำ พบพริกชนิดนี้ในประเทศไทยเพียงสายพันธุ์เดียวเรียกว่าพริกขาวดำ

การผลิตและการส่งออก

พันธุ์พริกที่ปลูกภายในประเทศไทยมีมากมายหลายชนิด กรมส่งเสริมการเกษตรจึงทำการแยกพริกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ พริกผลใหญ่ขนาดผลยาว 5-10 เซนติเมตร และพริกเล็กขนาดผลยาว 2-5 เซนติเมตร เพื่อสะดวกในการเก็บข้อมูล การปลูกพริกกระจายอยู่ทั่วไป พริกใหญ่ปลูกมากที่สุดในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ แหล่งผลิตใหญ่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ ลำพูน นครราชสีมา เป็นต้น พริกใหญ่ที่นิยมบริโภคได้แก่ พริกชี้ฟ้า พริกพันธุ์สันป่าตอง พริกพันธุ์บางช้าง เป็นต้น (มณีฉัตร, 2547) ปริมาณพริกที่ผลิตได้ในแต่ละปีนอกจากจะนำมาใช้ประโยชน์ภายในประเทศแล้ว พบว่ามีการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย ไต้หวัน และประเทศในกลุ่มตะวันออกกลางเป็นมูลค่าค่อนข้างสูง ตั้งแต่ปี 2540 เป็นต้นมา ปริมาณและมูลค่าการส่งออกพริกของไทยในแต่ละปีมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากสถิติการส่งออกของกรมศุลกากรปี 2549 พบว่าการส่งออกพริกทั้งรูปพริกสด ซอสพริก พริกแห้ง พริกแกงสำเร็จรูปและพริกป่นเป็นปริมาณรวมถึง 34,653 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,139 ล้านบาท (กมล, 2551)

อย่างไรก็ตาม การส่งออกพริกของไทยสู่ตลาดต่างประเทศยังคงประสบปัญหาในหลายด้าน ซึ่งปัญหาหลัก คือ ปริมาณการผลิตที่ไม่แน่นอนในแต่ละปีและคุณภาพผลิตพริกที่ไม่ได้มาตรฐาน สาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดปัญหาเหล่านี้มักเกิดจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง ซึ่งจะทำให้พริกเสียหายตั้งแต่แปลงปลูก ผลพริกที่ได้เกิดรอยตำหนิ ซึ่งจากรายงานของ Than *et al.* (2008) กล่าวว่า โรคที่สร้างความเสียหายอันดับหนึ่งของพริก คือ โรคแอนแทรคโนสซึ่งสร้างความเสียหายให้กับพริกได้สูงถึง 80% และเมื่อมีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโรคแมลงศัตรูพริกเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ตรวจพบสารพิษตกค้างเกินกำหนดทั้งในพริกสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปอีกด้วย (กมล และคณะ, 2544)

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) หรือโรคกุ้งแห้ง

เป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับพริกอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราสาเหตุสามารถเข้าทำลายได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยการเข้าทำลายพบได้ 3 ระยะ (Nayaka *et al.*, 2009) คือ

1. ระยะต้นกล้า ถ้ามีเชื้อราสาเหตุติดมากับเมล็ดพันธุ์ เชื้อจะเข้าทำลายต้นกล้า ทำให้ต้นกล้าแห้งตาย (seedling blight) และเกิดอาการโรคเน่าคอดิน (damping-off)

2. ระยะต้นโต โดยเชื้อราสาเหตุจะเข้าทำลายใบพริกทำให้ใบพริกมีอาการใบจุด (leaf spot) และเกิดการอาการแห้งตายจากปลายยอดเข้ามา (die back)

3. ระยะติดผล อาการของโรคแอนแทรคโนสแสดงให้เห็นชัดเจนในระยะผลพริกเริ่มสุก โดยทำให้เกิดรอยช้ำ เป็นแอ่งลึก เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกทำลายหยุดการเจริญ ทำให้ผลพริกมีลักษณะโค้งงอ นอกจากนี้ ผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจะมีปริมาณของสาร capsicin และ oleoresin ลดลงอีกด้วย

สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อในสกุล *Colletotrichum* (ตาราง 1) เช่น *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* และ *C. coccodes* เป็นต้น แต่ในประเทศไทยพบเพียง 3 สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส คือ *C. gloeosporioides, C. capsici* และ *C. acutatum* (Than *et al.*, 2008) โดย *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* พบว่ามีการแพร่ระบาดรุนแรง (สมศิริ และบุญญวดี, 2538)

การจัดจำแนกชั้นของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. (Sutton, 1992)

Kingdom: Mycetae

Division: Eumycota

Sub division: Deuteromycotina

class: Deuteromycetes

Order: Melanconiales

Family: Melanconiaceae

Genus: *Colletotrichum*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา คือ สร้างเส้นใยอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น conidia เกิดบน conidiophore ซึ่งมีกำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า acervulus ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก conidia จะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจะสร้าง conidia เป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium การสังเกตลักษณะของ acervulus จึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ

หรือบนพืชอาศัย บางครั้งพบการสร้าง sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อ conidia เดี่ยวๆ ไม่มีสีเซลล์เดียว ผนังบาง เรียบ ลักษณะรูปร่างรูปไข่หรือยาว ตรงหรือโค้งงอ อาจมี gutule ลักษณะคล้ายฟองอากาศอยู่ภายใน มีการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาล ผนังหนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนามเรียกว่า setae บริเวณขอบของ acervulus หรือปะปนอยู่กับ conidiophore ลักษณะการสร้าง setae ของเชื้อรานี้เป็นลักษณะไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ appressorium สีน้ำตาล มีผนังสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี คล้ายกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งมีรอยหยัก (lobe) สร้างเดี่ยวๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม teleomorph state ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* (Sutton, 1992)

ตาราง 1 รายงานเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกในประเทศต่างๆ (Than *et al.*, 2008)

ประเทศ	เชื้อสาเหตุ
อินเดีย	*C. capsici*
อินโดนีเซีย	*C. acutatum, C. gloeosporioides, C. capsici*
เกาหลี	*C. acutatum, C. dematium, C. gloeosporioides, C. coccodes*
พม่า	*C. nigrum*
ไต้หวัน	*C. acutatum, C. gloeosporioides, C. capsici*
ไทย	*C. acutatum, C. gloeosporioides, C. capsici*
เวียดนาม	*C. acutatum, C. nigrum, C. gloeosporioides, C. capsici*

เชื้อรา *Colletotrichum* ต่างสปีชีส์ (species) มีความสามารถในการเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของพริกได้แตกต่างกัน เช่น *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* สามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะของการเจริญของผลโดยเฉพาะระยะผลอ่อนและระยะ mature green ในขณะที่ *C. capsici* เข้าทำลายผลพริกในระยะที่ผลสุกมีสีแดง นอกจากนี้ *C. coccodes* จะเข้าทำลายในใบและลำต้นของพริกเท่านั้น (Than *et al.*, 2008)

ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ศศิธร, 2549)

C. capsici ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน มีจุดสีน้ำตาลเข้มดำเรียงซ้อนกันเป็นวงอยู่ในบริเวณแผล (ภาพ 1ก) เชื้อราชนิดนี้มี conidia สีใส เซลล์เดียว รูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ขนาดเฉลี่ย 9-14 x 6.5-11.5 ไมโครเมตร มี setae มาก

C. gloeosporioides ทำให้เกิดแผลรูปร่างกลมรีขนาดใหญ่ประมาณ 1-2 เซนติเมตร เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่ง แผลที่เกิดในระยะแรกมีสีเหลืองส้ม และมี acervulus สีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวงๆ อยู่ในบริเวณแผล ต่อมาแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพ 1ข) เชื้อราชนิดนี้มี conidia สีใส เซลล์เดียว รูปร่างเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน ขนาดเฉลี่ย 9-24 x 3-4.5 ไมโครเมตร ไม่มี setae

ก) *Colletotrichum capsici*

ข) *Colletotrichum gloeosporioides*

ภาพ 1 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ที่มา: (Nayaka *et al.*, 2009)

การแพร่ระบาดและการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการแพร่ระบาดของเชื้อ โดยเชื้อเข้าทำลายได้ดีและเกิดการแพร่ระบาดได้มากในสภาพอากาศที่มีความชื้นและอบอุ่น คือ มีอุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์สูงประมาณ 80% การเข้าทำลายของเชื้ออาศัยการพาของน้ำในช่วงที่ฝนตก ลม หรือแมลง โดยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จะสร้างโครงสร้างพิเศษที่มีหน้าที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของพืชอาศัย เช่น germ tube, appressoria, intracellular hypha และ secondary necrotrophic hypha ขั้นตอนการเข้าทำลายของเชื้อเริ่มจาก conidia ตกลงบนผิวพืชอาศัย เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะ

เริ่มงอกเส้นใยอยู่บนผิวของพืช โดยงอกเป็นท่อเรียกว่า germ tube และพัฒนาเป็นโครงสร้างที่มีผนังหนาเกาะติดแน่นกับผิวของผลิตผลโดยสารเมือก (mucilaginous material) ที่ germ tube สร้างขึ้นมา เรียกโครงสร้างทั้งหมดนี้ว่า appressorium จากนั้นจะสร้าง peg เพื่อแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชซึ่งต้องอาศัยแรงกดและสร้างเอนไซม์คิวติเนส (cutinase) เพื่อย่อยสลายคิวติเคิลที่ผิวของพืช (Bailey and Jeger, 1992) ช่วงนี้ appressorium อาจเข้าสู่ระยะพักตัวได้เมื่อพืชอาศัยมีความสามารถในการสร้างสารระงับการเจริญของเชื้อรา เมื่อพืชอาศัย เช่น ผลไม้เริ่มเข้ากระบวนการสุก การสร้างสารต่อต้านการเจริญของเชื้อราหรือกลไกการป้องกันตัวเองของพืชมีลดลงทำให้ appressorium ที่พักตัวอยู่งอกเจริญสร้างเส้นใยอยู่ภายใต้ชั้นคิวติเคิล และลุกลามเข้าทำลายเซลล์ของพืชอาศัยอย่างรวดเร็วทำให้อาการของโรคแสดงออกมา เรียกการเข้าทำลายแบบนี้ว่า การเข้าทำลายแฝง (latent infection) (ดนัย, 2549) นอกจากความสามารถในการเข้าทำลายแฝงแล้ว เชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ยังเป็นเชื้อสาเหตุที่สามารถถ่ายทอดไปทางเมล็ดพันธุ์ (seed-borne pathogen) ได้อีกด้วย โดยพบการติดเชื้อของเชื้อรา *C. capsici* ทั้งแบบภายในเมล็ดและติดอยู่บนผิวของเมล็ดพริก (Nayaka *et al.*, 2009) โดยอยู่ในรูปของ mycelia เชื้อราจะเจริญสร้างเส้นใยปกคลุมในส่วนของ seed coat และเข้าไปถึง peripheral layer ของ endosperm ในกรณีที่เชื้อมีการเข้าทำลายอย่างหนักจะพบว่ามีการสร้างเส้นใยลุกลามเข้าไปภายใน endosperm และ embryo ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* จะเจริญอยู่เพียงบริเวณผิวของเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเท่านั้น (Chitkara *et al.*, 1990)

ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้น ส่วนใหญ่เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่นำมาใช้ในงานวิจัยได้จากการแยกเชื้อจากผลพริกชนิดต่างๆ ที่แสดงอาการของโรค จากนั้นเชื้อที่แยกได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเพื่อหาระดับความรุนแรงของเชื้อนั้น โดยการปลูกเชื้อกลับเข้าไปบนผลพริกที่ไม่เป็นโรค การปลูกเชื้อมีอยู่หลายวิธี เช่นจากงานวิจัยของ Kanchana-udomkan *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก 4 ระยะคือ immature green, mature green, color turning และ ripe red โดยใช้วิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี คือ การฉีดเข้าผลพริก (injection) การหยดลงบนผิวของผลพริก (drop) และการทำแผลบนผลพริกและหยด (wound/drop) โดยเชื้อรา *C. capsici* ที่

นำมาทดสอบถูกเตรียมให้อยู่ในรูปสปอร์ผสมน้ำ (spore suspension) ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่า วิธีการฉีดเข้าผลพริก (injection) และการทำแผลบนผลพริกและหยด (wound/drop) spore suspension ทำให้ผลพริกแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสได้หลังจากปลูกเชื้อเพียง 3-5 วันในผลพริกทั้ง 4 ระยะ ในขณะที่วิธีการหยด (drop) spore suspension ลงบนผลพริกไม่ทำให้เกิดอาการของโรคได้ ดังนั้น วิธีการปลูกเชื้อแบบ injection และ wound/drop จึงถูกนำมาใช้ในงานวิจัยต่างๆ วิธีการ injection นั้นทำได้โดยใช้ microinjector ที่ประกอบด้วย Micro syringe™ model 1705 TLL และ dispenser PB600-1 เส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม microinjector มีขนาด 1 มิลลิเมตร และกำหนดความยาวที่ใช้ 1 มิลลิเมตร ส่วนวิธีการทำแผลนั้นทำได้โดยใช้เข็มที่มีขนาด 0.1 เซนติเมตร แทงลงบนผลพริกให้มีความลึก 0.1 เซนติเมตร (Kanchana-udomkan *et al.*, 2004) นอกจากวิธีการทำแผลโดยใช้เข็มแล้ว Chanchaichaovivat *et al.* (2007) ได้ทำแผลโดยใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากดลงบนผลพริกได้อีกด้วย

การป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริก

การใช้สายพันธุ์ต้านทาน เช่น Mongkolporn *et al.* (2004) นำพริกพันธุ์ *Capsicum annuum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคมาผสมข้ามสายพันธุ์กับพริก *C. chinense* CM 021 ซึ่งมีความต้านทานต่อโรคสูง ได้ลูกผสม F1 ที่มียีนต่อต้านการเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide) ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ carbendazim, benomyl, mancozeb และ captan สารเคมีเหล่านี้สามารถนำมาใช้ได้หลายลักษณะ เช่น ใช้รมในรูปของควันระเหย ผสมน้ำหรือแวกซ์ ขึ้นอยู่กับสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของสารเคมีนั้นๆ โดยนิยมนำมาฉีดพ่นพริกในระยะแปลงปลูก ระยะออกดอกจนถึงติดผล นอกจากนี้ ยังมีการนำสารเคมีมาใช้คลุกเมล็ดเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดได้ carbendazim และ benomyl เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการเข้าทำลายทางแผลของเชื้อราหลายชนิด เนื่องจากสารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมทำให้สามารถ

แทรกซึมเข้าไปในผลิตผลจนถึงจุดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อราได้ อีกทั้งสามารถป้องกันการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนผิวของผลิตผลที่เป็นโรคได้ (ดนัย, 2549) นอกจากสารในกลุ่ม benzimidazole แล้ว captan ถือเป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้ในวงกว้าง ซึ่ง captan จะทำหน้าที่ในการป้องกัน (protective) และรักษา (curative) ผลิตผลจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ (National Pesticide Information Center, 2011) โดยมีกลไกการทำงาน คือ captan จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ thiol ทำให้เกิด thiophosgene ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียรแต่มีความสามารถสูงในการทำปฏิกิริยากับหมู่ sulfhydryl-, amino- และ hydroxyl- ซึ่งพบได้ในเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของบริเวณ active site ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นต่างๆ ได้ กระบวนการหายใจของเชื้อราสาเหตุจึงถูกยับยั้ง (ปวิตรา, 2554; Dillwith and Lewis, 1982 and National Pesticide Information Center, 2011) ดังนั้นพลังงานที่ได้จากกระบวนการหายใจเพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น การเจริญ การควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร และการสืบพันธุ์ลดลง เป็นผลให้เชื้อราสาเหตุตายในที่สุด ต่อมา Gopinath *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของสาร propiconazole และ difenoconazole ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสาร carbendazim ที่ใช้กันทั่วไปแล้ว สาร propiconazole ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์และลดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อสาเหตุได้มากที่สุด ตามด้วยสาร difenoconazole และ carbendazim เมื่อทดลองในระดับแปลงปลูก พบว่าการใช้ 0.1% (w/v) propiconazole สามารถลดการเกิดโรคในต้นพริกได้สูงสุดถึง 70% แต่สารเคมีเหล่านี้เมื่อใช้ในปริมาณมากและเป็นเวลานานจะเกิดสารพิษตกค้างสะสมอยู่ในต้นพืชและสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งประสบปัญหาการดื้อยาของเชื้อราสาเหตุต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาเบื้องต้นในการใช้สารเคมีทางเลือกใหม่ คือ สารเคมีที่ปลอดภัย (GRAS) เช่น การใช้สาร food additive มาควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยวิธี poisoned food technique เพื่อทดสอบการควบคุมการเจริญของเส้นใย และยับยั้งการงอกของสปอร์บนอาหาร PDA พบว่า 3% (w/v) sodium carbonate ให้ผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ถึง 92.83% และยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) (โชติรส และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุ (biofungicide) อีกด้วย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เช่น Charigkapakorn (2000) ได้สกัดสารจากสมุนไพรสองชนิดคือ ว่านน้ำ และใบพลู นำมาฉีดพ่นให้กับต้นพริกใน 2 ระยะคือ ระยะออกดอก (first bloom stage) และระยะผลพริกมีความแก่เต็มที่ (mature green stage) พบว่าสารสกัดหยาบว่านน้ำความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกได้ ทำให้เชื้อราสาเหตุมีการเจริญต่ำสุดเพียง 12.8% และมี total yield สูงสุดคือ 9.35 t/plot ในขณะสารสกัดหยาบของใบพลู และสารสกัดหยาบผสมไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและให้ผลผลิตในปริมาณต่ำ

การควบคุมโดยชีววิธี (biocontrol) เนื่องจากประชาชนได้ให้ความสนใจในเรื่องสารพิษตกค้างของสารเคมีในผลิตผลทางการเกษตรและเห็นถึงความเสี่ยงในการใช้สารเคมีที่มีต่อสุขภาพของเกษตรกรมากขึ้น ทำให้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิดถูกห้ามใช้กับผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว หรือถูกห้ามจำหน่ายในท้องตลาด การควบคุมโดยการใช้สารเคมีจึงมีข้อจำกัดมากขึ้น และทำให้การป้องกันกำจัดโรคหลังการเก็บเกี่ยวทำได้ยากขึ้น ดังนั้น จึงต้องหาวิธีอื่นที่เหมาะสมนำมาใช้ทดแทน การควบคุมโรคโดยชีววิธี จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่นักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจศึกษามาเป็นเวลานาน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมี การควบคุมโดยชีววิธี เป็นวิธีการลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์อื่น หรือสารอนุพันธ์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์นั้น (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007)

ในปัจจุบัน เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพริกและเป็นที่ยอมรับในทางการค้า ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยจำหน่ายภายใต้ชื่อ Quantum 4000 HP ที่ผ่านการรับรองจากสำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency: EPA) และ Larminar ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในประเทศไทย (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3, 2554) สารชีวภัณฑ์ Larminar เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AP-01 ที่อยู่ในรูปผงเปียกน้ำ (wettable powder) จากงานวิจัยต่างๆ ทำให้ทราบว่า กลไกในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* นั้นมี 4 ลักษณะคือ

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* RB14 ผลิตสารปฏิชีวนะ iturins A ซึ่งเป็นสาร cyclolipopeptide ที่ประกอบด้วย α amino acid 7 หน่วย และ β amino acid 1 หน่วย สารชนิดนี้สามารถยับยั้งการแสดงอาการของโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในมะเขือเทศได้ (Asaka and Shoda, 1996) โดยกลไกในการยับยั้งนั้นเกิดจากการที่สาร itulin สามารถเข้าทำ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ก.ย. 2555
248342
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....

ปฏิกิริยากับ cholesterol ได้โดยตรง ซึ่ง cholesterol นั้นพบมากในส่วนของ external plasmatic membrane ของเชื้อรา ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เกิดขึ้น (Araújo *et al.*, 2005)

2. การแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุในการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย แผลซึ่งเกิดที่ผลิตผลถือเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับเชื้อสาเหตุ ในการแข่งขันที่เชื้อปฏิปักษ์สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุได้ เชื้อปฏิปักษ์ต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและอาหารได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุ ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วโดยใช้อาหารที่มีอย่างจำกัด (Janisiewicz and Korsten, 2002) และโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เจริญได้ดีในสภาวะความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.5-8.5 ส่งผลให้บริเวณของบาดแผลมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ (Araújo *et al.*, 2005)

3. กระบวนการเป็นปรสิต โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุ และใช้ส่วนประกอบภายในเซลล์มาเป็นอาหารโดยตรง (ชมรมเกษตรปลอดสารพิษ, 2551) จากงานวิจัยของพันธ์ทิพย์ (2548) พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* PP-10 สามารถผลิตเอนไซม์ exochitinase, endochitinase และ β-1,3-glucanase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะย่อยสลายไคตินและกลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ *Penicillium digitatum* เชื้อราสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวในส้มได้

4. การกระตุ้นให้เกิดกลไกการต้านทานโรค จากงานวิจัยของ Araújo *et al.* (2005) ทำให้ทราบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PRBS-1 และ AP-3 มีความสามารถในการสร้าง phytohormone 2 ชนิดคือ indole-3-acetic acid (IAA) และ abscisic acid (ABA) ออกมาในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ โดย phytohormone 2 ชนิด จะกระตุ้นให้ต้นกล้าถั่วหลืองมีปริมาณของรากเพิ่มขึ้นและมีการเจริญของรากแขนงดีขึ้น ในทางตรงข้าม สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิบางชนิดที่เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างขึ้นมานั้น อาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อพืชอาศัย (phytotoxicity) ได้เช่นกัน เช่น ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตช้า ไม่แข็งแรง และให้ผลผลิตต่ำอีกด้วย (Fravel, 1988)

นอกจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ยังมีการศึกษาเพื่อใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เช่น จรัสสา และคณะ (2548) ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบและต้นพริกด้วยวิธี leaf wash technique และ leaf grinding technique พบว่า เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรีย โดยมี 4 ไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ได้โดยให้ผลการ

ยับยั้ง 46.25-76.67% และ 53.35-81.31% ตามลำดับ และให้ผลการยับยั้งได้ดีเท่ากับการใช้สารเคมี 2 ชนิดคือ benomyl และ mancozeb ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* อีก 1 ไอโซเลทไม่สามารถจำแนกได้ ต่อมา Chanchaichovivat *et al.* (2007) ได้คัดเลือกเชื้อยีสต์จากผิวผลไม้ตามวิธีของ Assis *et al.* (1999) พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่มีความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. capsici* เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก โดยไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งสูงสุด คือ *Pichia guilliermondii* โดยเมื่อนำมาฉีดพ่นบนผลพริก สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ถึง 93.3% และให้ผลยับยั้งดีกว่าการฉีดพ่นด้วยน้ำคลอรีน ในแง่ของผู้บริโภคในการยอมรับผลิตผลทางการเกษตรที่ผ่านการใช้สารชีวภัณฑ์ในรูปของเซลล์ หรือสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยตรงเพื่อนำมาบริโภคนั้นเป็นเรื่องยาก ดังนั้น การใช้เฉพาะสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะ หรือเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตได้ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่นักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจนำมาศึกษา เชื้อจุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีในเรื่องของความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์หลายชนิด อีกทั้งยังเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุได้ดี คือ เชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างเชื้อราและแบคทีเรีย ลักษณะรูปร่างมีทั้งแบบเซลล์เดียวจนถึงเป็นเส้นใยที่แตกสาขา (branched mycelium) และเส้นใยเหล่านี้จะแตกหักออกเป็นท่อนสั้นๆ มีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กและสั้นกว่ามาก สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ชนิดแข็งได้ โดยสร้างเส้นใยที่เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) โดย substrate mycelium จะเจริญบนอาหารก่อน และแทงเส้นใยเข้าไปในอาหารเพื่อนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium เกิดขึ้นมาภายหลังและยื่นไปในอากาศเพื่อทำหน้าที่หลัก คือ สืบพันธุ์ระหว่างที่โคโลนีเจริญ aerial mycelium อาจถูกสร้างขึ้นในสภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้น aerial mycelium จึงจำเป็นต้องมี hydrophobic sheath เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ (Mendez *et al.*, 1985)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทโดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ คือ แบบ mycelium fragmentation และแบบ sporulation ในพวก *Streptomyces* spp. จะมีการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาวของ aerial mycelium โดยเซลล์ขยายใหญ่และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า chlamydospore หรือ arthrospore มักพบแบบเดี่ยวๆ (single spore) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) ในพวก *Actinoplane armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ สปอร์แบบมี flagella เรียกว่า zoospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสปอร์แบบ arthrospore บน aerial mycelium ในการสร้างสปอร์แบบใดนั้นมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญ

ตาราง 2 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียและเชื้อรา

ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงกับเชื้อรา
1. มีขนาดรูปร่างใกล้เคียงกัน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร 2. ส่วนที่ขาดออกเป็นท่อน (fragment) มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียในกลุ่ม Mycobacterium และ Coryneform 3. ถูกทำลายได้โดย bacteriophage และสารปฏิชีวะนะประเภทเดียวกับที่ทำลายแบคทีเรีย 4. ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส 5. ผนังเซลล์ไม่มีไคตินหรือเซลลูโลสแต่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาล กรดอะมิโน คล้ายกับแบคทีเรียแกรมบวก	1. เส้นใยของแอคติโนมัยซีทชั้นสูงแตกสาขาคล้ายเส้นใยเชื้อรา 2. แอคติโนมัยซีทที่สร้าง aerial mycelium จะมี conidia ตรงปลายเส้นใยคล้ายเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา 3. การเจริญในอาหารเหลวมักไม่ปรากฏว่าทำให้เกิดสีขุ่น (turbidity) เนื่องจากเจริญเป็นกลุ่มก้อน 4. เพิ่มจำนวนแบบ apically เช่นเดียวกับเชื้อรา

แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) และเป็น chemo-organotrophic ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ สามารถเจริญอยู่ได้ทั้งในดิน อากาศ และน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่จะพบมากในดินที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น มูลสัตว์ ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย ฟางหรือใบไม้

เป็นต้น เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีในดินที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 5.0-9.0 จากงานวิจัยของ Williums and Wellington (1982) พบว่า เมื่อปรับสภาพดินให้มีค่าความเป็นด่างเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แอคติโนมัยซีทเจริญเติบโตได้ดีมากขึ้นจากเดิมถึง 100 เท่า แอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) และในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ โดยจะพบอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณดินชั้นบนและลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลงไป ซึ่งแอคติโนมัยซีทที่พบเป็นส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* ส่วน non-streptomycete actinomycetes (NSA) พบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006) Williums and Wellington (1982) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีทจากดินพบว่า ความถี่ของเชื้อที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* spp. ถึง 95.3% ส่วนพวก NSA พบในปริมาณน้อย คือ *Actinoplanes* 0.2%, *Actimadura* 0.1%, *Microbispora* 0.18%, *Micromonospora* 1.4%, *Norcardia* 1.98%, *Pseudonocardia* 0.06%, *Streptosporangium* 0.1%, *Thermoactinomyces* 0.14% และ *Thermomonospora* 0.22%

การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มตาม Bergy' s Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ซึ่งกลุ่มที่นิยมนำมาศึกษาการสร้างเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ได้แก่ Sporostreptomycetes, Norcardioform actinomycetes และ Actinoplanete เป็นต้น เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 8 กลุ่มมีลักษณะสำคัญแตกต่างกันออกไปดังนี้

1. Norcardioform actinomycetes

มีลักษณะที่ต่างกันอย่างหลากหลาย substrate mycelium จะแตกหักออกเป็นท่อนสั้นๆ และบางสกุลสร้าง aerial hypha ที่ปลายมี arthrospore ประกอบด้วยสมาชิกสกุลต่างๆที่มี wall chemotypes แตกต่างกันหรือการมี mycolic acid เป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ หรือลักษณะอื่นๆ แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ผนังเซลล์มี mycolic acid เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มย่อยที่ 2 *Pseudonorcardia* และสกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มย่อยที่ 3 *Norcardioides* และ *Terrabacter*

กลุ่มย่อยที่ 4 *Promicromonospora* และสกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

2. แอคติโนมัยซีทสกุลต่างๆ ที่สร้าง multilocular sporangia

Substrate mycelium จะแบ่งตามยาวและตามขวางหลายระนาบ จึงทำให้ได้สปอร์ค่อนข้างกลม เคลื่อนที่ได้ เช่น สกุล *Dermatophilus* หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น สกุล *Frankia*

3. Actinoplanetes

Substrate mycelium ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ อาจสร้าง aerial mycelium บ้างเล็กน้อยหรือไม่สร้างเลย และสร้าง motile spore ภายใน sporangium หรือสร้าง non-motile spore เดี่ยวๆ เช่น สกุล *Micromonospora* หรืออาจสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย ผนังเซลล์มี meso-DAP และ glycine เป็นองค์ประกอบ และ whole cell hydrolysate มี arabinose, xylose เป็นองค์ประกอบ

4. Streptomycetes และสกุลอื่น

สมาชิกมีลักษณะต่างกันอย่างหลากหลาย ผนังเซลล์มี L-DAP และ glycine เป็นองค์ประกอบ สร้าง substrate mycelium และ aerial mycelium ซึ่งที่ปลายมี conidia ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Streptomyces, Streptoverticillum* และสกุลที่ไม่สร้าง aerial mycelium หรือ สร้างเล็กน้อย สร้างสปอร์หลายรูปแบบ

5. Maduromycetes

สร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อน และสร้าง aerial mycelium ซึ่งสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย เช่น *Microbispora* ประกอบด้วย 2 spore/chain *Microtetraspora* ประกอบด้วย 4 spore/chian *Actinomadura* มีจำนวนสปอร์แตกต่างกันบนแต่ละสายสปอร์ สกุลที่สร้าง motile spore ใน sporangium ได้แก่ สกุล *Planobispora, Planomonospora, Spirillospora* และ *Streptosporangium* สร้าง non-motile spore ใน sporangium ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และ cell hydrolysate ประกอบด้วย madurose

6. *Thermomonospora* และสกุลอื่นๆ ที่คล้ายกัน

สร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ สร้าง aerial mycelium สกุลที่สร้างสปอร์เป็นคู่ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ได้แก่ *Thermomonospora* และสร้างสปอร์เป็นสายได้แก่ *Norcardiopsis* และ *Actinosynnema* หรือสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างคล้าย sporangium ได้แก่

Streptoallotrichus ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ไม่พบ amino acid และ sugar ใน whole cell hydrolysate

7. *Thermoactinomyces*

ประกอบด้วยสกุลเดียวคือ *Thermoactinomyces* สร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆ บน aerial mycelium และ substrate filament เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophile) ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ซึ่งไม่มี amino acid และ sugar

8. สกุลอื่นๆ

ประกอบด้วย 3 สกุลที่มีลักษณะแตกต่างกับแอคติโนมัยซีทในกลุ่มอื่น คือสร้าง aerial mycelium ที่มีสปอร์เป็นสายโซ่ ไม่พบสาร mycolic acid ในเซลล์ ได้แก่ *Glycomyces, Kitasatosporangia* และ *Saccharothrix*

ความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทหลายชนิดทั้งพวก *Streptomyces* spp. และ non-streptomycetes (NSA) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุที่ติดมากับดิน (soil-borne fungal plant pathogen) โดยสร้างกลไกต่างๆ ดังนี้ (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006)

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

กลไกการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยเฉพาะในสกุล *Streptomyces* ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในแง่ของโครงสร้างทางเคมี กลไกการทำงาน และระดับความรุนแรงต่อเชื้อสาเหตุ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Streptomyces* sp. ผลิตขึ้นได้แก่ streptomycin และ lincomycin เชื้อ *Micromonospora* sp. ผลิต gentamycin เป็นต้น (เบญจาภา, 2541) สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้หลายชนิด เช่น *Alternaria solani, A. alternata, Phytophthora megasperma* และ *Fusarium solani* ได้ (ชมรมเกษตรปลอดสารพิษ, 2551) ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งนั้นจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น (Soares *et al.*, 2006) จากการศึกษาของ Kim *et al.* (1999) พบสารปฏิชีวนะ As 1 A ที่แยกได้จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces libani* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. capsici*

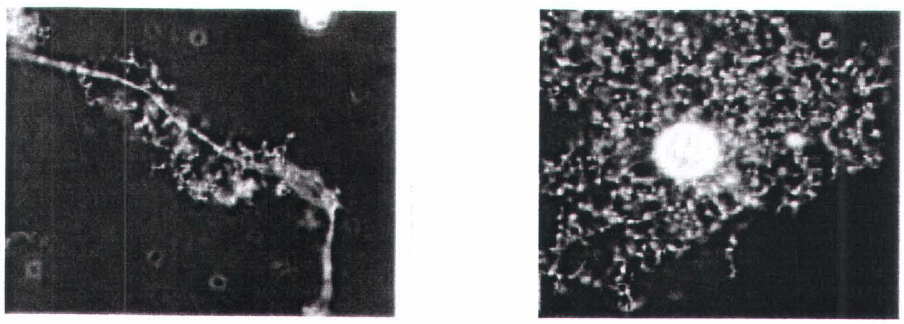
สาเหตุของโรคใบไหม้ในพืชได้ ในทำนองเดียวกัน Gullo *et al.* (1991) ได้พบสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albican* ได้ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *Actinomadura* spp. ที่แยกได้จากดินในรัฐ Florida นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสาร GE37468 A ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จัดอยู่ในกลุ่มของ thiazolyl peptide antibiotic ได้จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* ATCC 55365 โดยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และ *Bacteroides fragilis* ในระดับปฏิบัติการได้

2. การเป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุบางชนิด (hyperparasitism)

เชื้อแอคติโนมัยซีทหลายชนิดทั้งในกลุ่มของ *Streptomyces* spp. และ NSA มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุต่างๆ โดยทำหน้าที่เป็นเชื้อปรสิตเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้โดยตรง เช่น เชื้อ *Norcardiopsis dassonvillei* สามารถเป็นปรสิตกับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* โดยจะเข้าทำลายในส่วนของ vegetative hypha ของเชื้อราดังกล่าว จากนั้นเชื้อราจะสร้างโครงสร้างในรูปของ polymorphous thallospore หรือ chlamydospore ขึ้นมาเพื่อต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อแอคติโนมัยซีท นอกจากนี้ การศึกษาของ Upadhyay and Rai (1987) พบว่า การเป็นปรสิตของเชื้อ *Micromonospora globosa* ในเชื้อรา *Fusarium udum* จะอาศัยการเข้าทำลายซึ่งประกอบด้วยกระบวนการดังนี้ คือ coiling โดยเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทจะแทรกตัวไปตามเส้นใยของเชื้อราในลักษณะพันเกลียว จากนั้นจะเริ่มเข้าทำลาย (penetration) และเจริญเติบโตสร้างโคโลนีและสปอร์จำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อราทำให้เกิดการแตกตัว (granulation) และการตกตะตอน (coagulation) ของไซโตพลาสซึมและเส้นใยของเชื้อราก็จะถูกย่อยสลายในที่สุด

Non-streptomycetes ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุในพืชนั้น สามารถเข้าทำลายได้ทั้ง vegetative mycelium และ oospore ของเชื้อสาเหตุ (ภาพ 2) โดย NSA เข้าทำลายเส้นใยของเชื้อสาเหตุในระยะที่เชื้อมีการเจริญอยู่ในดินหรือพืชอาศัย ในขณะที่เข้าทำลาย oospore ในระยะที่เชื้อสาเหตุมีการสืบพันธุ์เพื่อการอยู่รอด จากรายงานของ El-Tarabily and Sivasithamparam (2006) พบว่า กลไกการเข้าทำลายโดยการเป็นปรสิตของเชื้อ *Actinoplanes philippinensis* ในเชื้อ *Pythium coloratum* เริ่มจาก *A. philippinensis* สร้าง motile zoospore ซึ่งจะทำให้เกิด chemotactic response ต่อ chlamydospore และ sclerotia ของเชื้อราสาเหตุ zoospore ที่ถูกสร้างจะเคลื่อนที่เข้าล้อมรอบเส้นใย

ของเชื้อราและฝังตัวเข้าไปในเส้นใย จากนั้น zoospore เกิดการงอกและเจริญเติบโตเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราในที่สุด



ก ข

ภาพ 2 การเข้าทำลายเส้นใยและ oospore ของเชื้อรา *Pythium coloratum* โดยเชื้อ *Actinoplanes* sp.

ก. การงอกของ zoospore และการสร้าง hypha ของเชื้อ *Actinoplanes* sp. บนและรอบๆ เส้นใยเชื้อรา *Pythium* sp.

ข. การงอก zoospore และการสร้าง hypha ของเชื้อ *Actinoplanes* sp. รอบๆ oospore ของเชื้อรา *Pythium* sp.

ที่มา: El-Tarabily and Sivasithamparam (2006)

3. การสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุ

cell-wall degrading enzyme ที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างขึ้น เช่น chitinase, β-1,3, β-1,4 และ β-1,6 glucanases เป็นต้น จากกลไกการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุ พบว่าเชื้อรามีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด คือ *N*-acetylglucosamine และ *D*-glucosamine ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับเซลล์ โดยเส้นใยของไคตินจะทำให้เซลล์มีรูปร่างที่คงตัว ดังนั้นไคตินจึงกลายเป็นเป้าหมายสำคัญที่ถูกนำมาศึกษาถึงวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไคตินได้ (Mahadevan and Crawford, 1997)

เอนไซม์ไคติเนส จัดเป็น multi-enzyme complex ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (อภิญญา และคณะ, 2545)

Endochitinase เป็นเอนไซม์ที่ตัดภายในสายพอลิเมอร์ของไคติเนสแบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลาย

Exochitinase เป็นเอนไซม์ที่ตัดโมเลกุลของสายไคตินทางด้านปลายสายที่เป็น non-reducing end เข้ามา ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโมโนเมอร์ของ *N*-acetylglucosamine และไดเมอร์ *N*-acetylglucasamine

จากความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสในการย่อยสลายไคตินทำให้ De Boer *et al.* (1998) ทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณเนินทรายของฝั่งทะเลของประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราทดสอบเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้นั้นมีเปอร์เซ็นต์การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสูงกว่า นอกจากนี้ ยังมีแนวคิดนำเอาเอนไซม์ไคติเนสไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น การใช้เอนไซม์ไคติเนสที่มีอยู่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* sp. ไปใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคก้านและฝักเน่าในถั่วลิสง (El-Katatny *et al.*, 2001)

การใช้เอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ

Mahadevan and Crawford (1997) ได้แยกเอนไซม์ไคติเนสในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 นำมาทดสอบการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *Pythium* sp. พบว่า เมื่อทำการแยกเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีการตกตะกอนเอนไซม์ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ และการทำ electrophoresis ได้เอนไซม์ไคติเนสที่มีค่ามวลโมเลกุล 32 และ 37 kDa เอนไซม์ทั้งสองสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยเอนไซม์ไคติเนสในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NK1057 ของ Nawani and Kapadnis (2004) ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. NK1057 สามารถสร้าง extracellular chitinase ทั้งแบบ endochitinase (35 และ 28 kDa) และ chitobiosidase (62 และ 48 kDa) เมื่อนำเอนไซม์ไคติเนสทั้งหมดมาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุ คือ *Micrococcus lysodeikticus* และ *Fusarium oxysporum* พบว่า chitobiosidase (48 kda) สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อ *M. lysodeikticus* และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด ในขณะที่การศึกษาของ Gomes *et al.* (2001) พบว่า endochitinase ที่เชื้อ *Streptomyces* sp. RC1071 ผลิตขึ้น

มีค่ามวลโมเลกุล 70 kDa สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ 7 ชนิด คือ *Fusarium* sp., *F. solani*, *F. graminearum*, *Aspergillus parasiticus*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* และ *Magnaporthe grisea* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Actinoplanes missouriensis* นอกจากจะย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุแล้ว ยังสามารถลดความยาว germ tube ของเชื้อสาเหตุได้อีกด้วย และเมื่อนำเชื้อ *A. missouriensis* มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อไม่ให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ พบว่าเชื้อ *A. missouriensis* นั้นไม่สามารถย่อยสลายเส้นใยของเชื้อสาเหตุได้ (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006)

นอกจากการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสแล้ว เอนไซม์ในกลุ่ม glucanolytic enzyme เป็นเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างขึ้นได้ และมีผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุได้เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะเชื้อสาเหตุ *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. ซึ่งพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราเหล่านี้ประกอบด้วย β-1,3 และ β-1,6 glucan เป็นส่วนใหญ่ (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006) ดังเช่นงานวิจัยของ Valois *et al.* (1996) พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินจำนวน 13 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าในราสเบอรี่ โดยเชื้อจะผลิต glucanolytic enzyme ซึ่งสามารถย่อยสลาย glucan substrate ที่ผลิตโดยเชื้อราสาเหตุของโรคได้

การแยกและทำเอนไซม์ไคติเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

เอนไซม์ไคติเนสที่ต้องการศึกษา จัดเป็นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นและจะปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular chitinase) ทำให้ปะปนอยู่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนอกจากจะมีเอนไซม์ไคติเนสแล้วยังอาจมีสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิอื่นๆ ที่เชื้อสร้างขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องแยกและทำเอนไซม์ไคติเนสให้บริสุทธิ์ก่อน วิธีการแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถกระทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธี Ultrafiltration จัดเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ง่ายในการทำสารให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น

วิธี Ultrafiltration เป็นวิธีที่ใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกัน ทำให้สารที่ออกมามีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยสารที่ผ่านเมมเบรนออกมาได้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าขนาดรูพรุนของเมมเบรน โดยจะถูกแยกออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ถูกกักอยู่บนแผ่นเมมเบรน ทำให้สารที่ต้องการมีความเข้มข้นหรือบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น Ultrafiltration membrane จะแบ่งตามขนาดของ NMWL (Norminal Molecular Weight Limits) เช่น 10,000 NMWL หมายถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 จะถูกกักอยู่บนแผ่นกรองในขณะที่สารที่มีขนาดเล็กกว่าจะผ่านแผ่นกรองออกมาได้ (วิมล, 2552) ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาคุณสมบัติของเอนไซม์นั้น พบว่า วิธี Ultrafiltration เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อขจัดโมเลกุลของสารอื่นๆ ที่มีขนาดเล็ก ออกจากเอนไซม์ที่ต้องการศึกษา