

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การแยกและจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

##### 1.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จากชิ้นพืชสมุนไพร 10 ชนิดบนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 1 เดือน พบโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเส้นใยบริเวณผิวหน้าของชิ้นพืช (ภาพที่ 7) โดยสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ได้รวม 179 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่เกิดจากส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร พบว่า ส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนใบ พบเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ทั้งหมด 111 ไอโซเลท ส่วนของลำต้นและส่วนหัวมี 21 ไอโซเลท และ 47 ไอโซเลทตามลำดับ และเมื่อแยกตามชนิดของพืชพบว่าแยกได้จากผักชีฝรั่งมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ตะไคร้ คิดเป็น 27.37 และ 11.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เจริญจากใบสะเดา หลังเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 นาน 1 เดือน

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรแต่ละชนิด หลังการเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 นาน 1 เดือน

พืชสมุนไพร	จำนวนไอโซเลทที่ตรวจพบ			CR <sup>1</sup> (%)
	หัว	ลำต้น	ใบ	
กระชาย	18.00	- <sup>3</sup>	-	10.06
ตะไคร้	-	21.00	-	11.73
สะเดา	-	-	16.00	8.94
ขมิ้น	12.00	-	-	6.73
ข่า	8.00	-	-	4.47
สระระแห่	-	-	15.00	8.38
กะเพรา	-	-	13.00	7.26
พลูคาว	-	-	18.00	10.06
เปราะหอม	9.00	-	-	5.03
ผักชีฝรั่ง	-	-	49.00	27.37
CR <sup>2</sup> (%)	26.26	11.73	62.01	100.00

หมายเหตุ

CR<sup>1</sup> (Colonization rate) : เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ

CR<sup>2</sup> (Colonization rate) : เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของพืชสมุนไพร

<sup>3</sup> : ไม่ได้ศึกษา

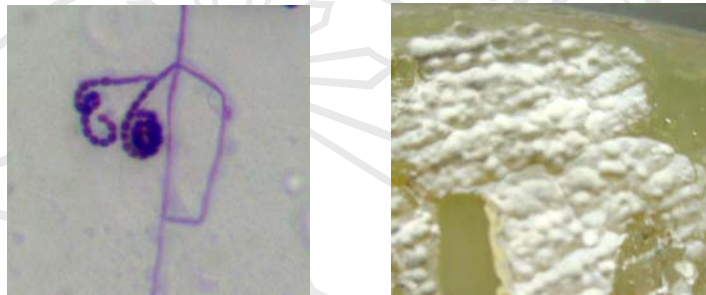
## 1.2 การจำแนกสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ทั้งหมด 179 ไอโซเลทโดยบันทึกสีของโคโลนี ลักษณะเส้นใย การแตกแขนงของเส้นใย และรูปร่างของเซลล์ (อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name, 1987) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกได้เป็น 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Nocardioepsi*, *Nocardioide* และ *Nocardia* โดยแต่ละสกุลมีจำนวนไอโซเลทที่มีรายละเอียดการเรียงเส้นสายของสปอร์แตกต่างกัน โดยให้ชื่อไอโซเลทในแต่ละสกุลตามอักษรภาษาอังกฤษ 3 ตัวของชื่อสามัญ หรือ ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชอาศัย คือ

### 1.2.1 สกุล *Streptomyces*

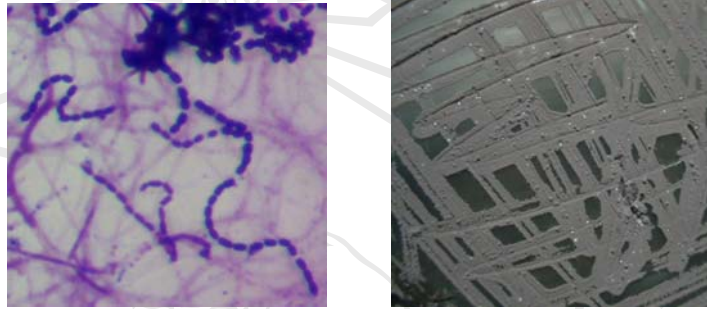
แยกได้ 13 ไอโซเลท จากผักชีฝรั่ง (Fit weed) จำนวน 6 ไอโซเลท ให้ชื่อ FIT1 FIT3 FIT4 FIT5 FIT6 และ FIT7 จากสะเดา (Neem) 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ NEE1 จากสะระแหน่ (Kitchen mint) 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ KMI1 จากกะเพรา (Sacred basil) 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ SAC1 จากกระชาย (Galangale) 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ GLI1 จากขมิ้น (Turmaric) 1 ไอโซเลทให้ชื่อ TUR1 จากข่า (Galanga) 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ GLA1 และจากเปราะหอม 1 ไอโซเลท ให้ชื่อ KAE1 ซึ่งแต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนี สี ที่เจริญบนอาหารแข็ง การย้อมสีเพื่อตรวจดูลักษณะการเรียงเส้นสายสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ (Williams *et al.*, 1989) ดังนี้

FIT1 โคลนีนีมีสี medium gray (406) และ light yellow (133) ขอบโคลนีนีมีสี beige gray (401) ผิวโคลนีนีเย่น เกาะยึดติดกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสี vivid reddish yellow (140) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Retinaculiaperti type (ภาพที่ 8)



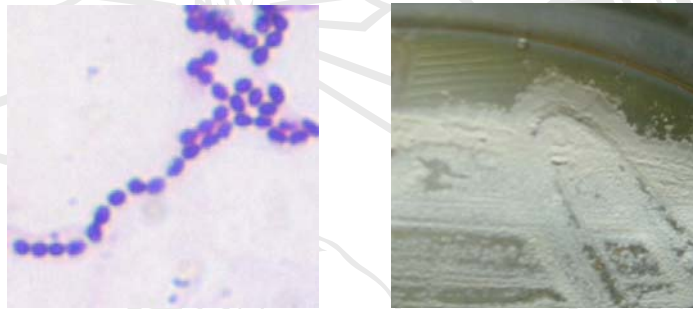
ภาพที่ 8 ลักษณะการเรียงตัวของลักษณะเส้นสายสปอร์แบบ Retinaculiaperti type ของเชื้อ FIT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลนีนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

FIT3 โคลิโคนีมีสี dark reddish gray (418) เจริญสม่่าเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ฝิวโคลิโคนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขอบโคลิโคนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี light yellowish brown (92) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Retinaculiaperti type และ Rectiflexibles type (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Retinaculiaperti type และแบบ Rectiflexibles ของเชื้อ FIT3 ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของ โคลิโคนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

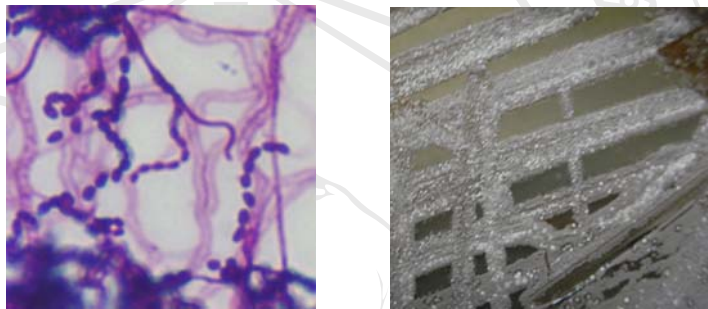
FIT 4 โคลิโคนีมีสี yellowish white (393) เจริญสม่่าเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ฝิวโคลิโคนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขอบโคลิโคนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี dull yellow (150) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์ แบบ Rectiflexibiles ของเชื้อ FIT 4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลิโคนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

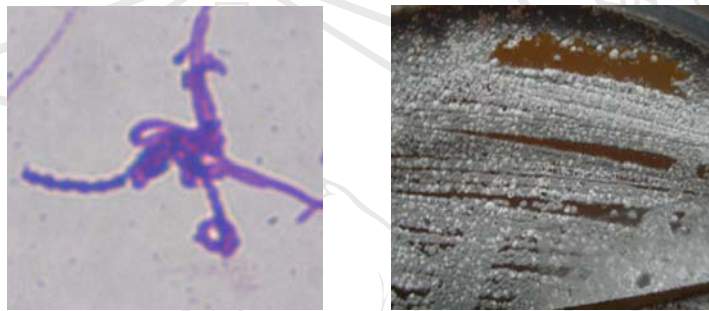
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

FIT 5 โคลิโคนีมีสี brownish gray (406) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ผิวโคลิโคนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เมื่อเวลาผ่านไปจะสร้างสปอร์สี beige gray (401) บนเส้นใยเหนือผิวอาหาร ขอบโคลิโคนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี light yellowish brown (92) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ท่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type และแบบ Spirales type (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์ แบบ Rectiflexibiles type และแบบ Spirales type ของเชื้อ FIT 5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของ โคลิโคนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

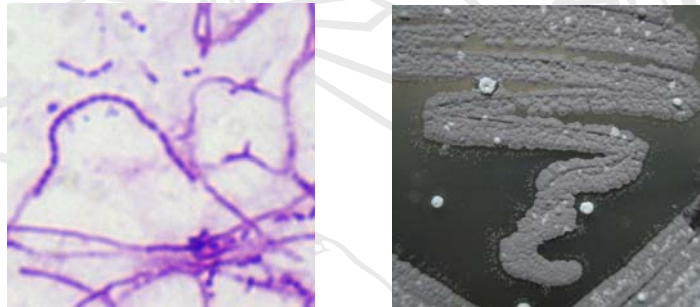
FIT 6 โคลินีมีสี beige gray (401) เจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ streak เชื้อ อย่างสม่ำเสมอ ขอบโคลินีมีสี light gray (398) ผิวโคลินีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขอบโคลินีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี soft yellow (147) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Retinaculiaperti type แบบ Rectiflexibles type และแบบ Spirales (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Retinaculiaperti type และแบบ Rectiflexibles type ของเชื้อ FIT 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลินีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

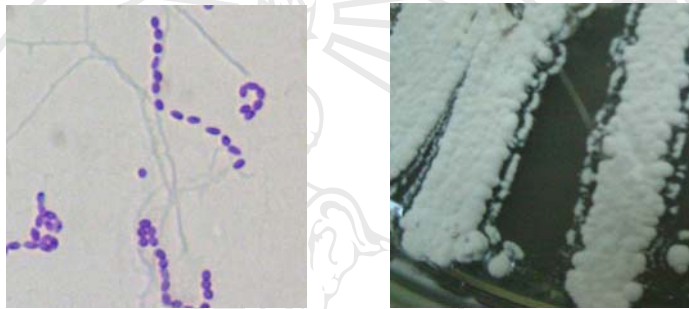


FIT 7 โคลินีมีสี reddish gray (408)เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ฟิวโคโลินีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เมื่อเวลาผ่านไปจะสร้างสปอร์สี white (389) บนเส้นใยหนือผิวอาหาร ขอบโคโลินีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี light yellowish brown (92) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 13)



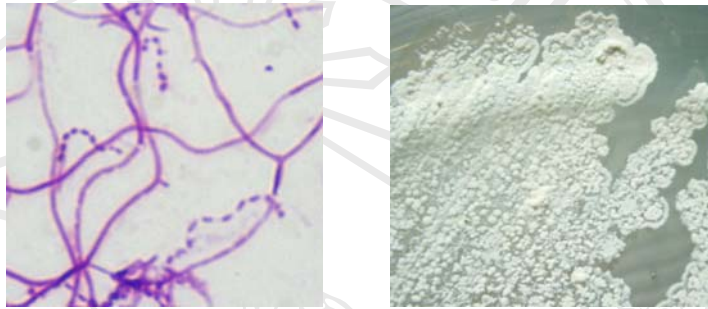
ภาพที่ 13 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อ FIT7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลินีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

NEE1 โคลิโคนีมีสี yellowish white (393) เจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ streak เชื้อ อย่างสม่ำเสมอ ผิวโคโลนิมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขอบโคโลนิมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี light yellow (134) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อย่างอื่น นอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ท่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 14)



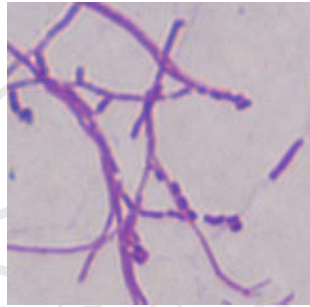
ภาพที่ 14 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อ NEE1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนิบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

KMI1 โคลินี้มีสี white (388) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคลินี้เจริญเป็นหย่อมๆ ตามรอยที่ streak เชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อราเจริญเป็นวงซ้อนกัน ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ท่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 15)



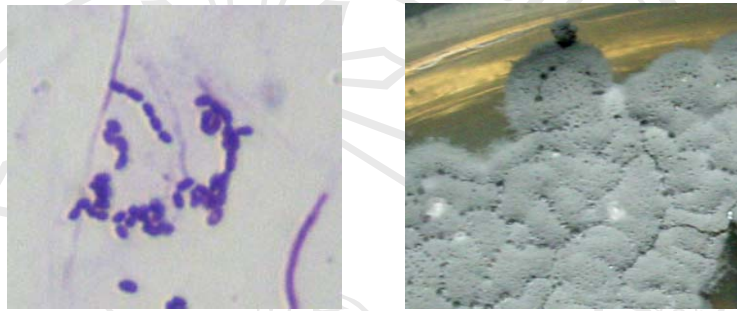
ภาพที่ 15 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อ KMI1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

SAC1 โคลนีสมีสี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคลนีสเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ขอบโคโลนีสมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 16)



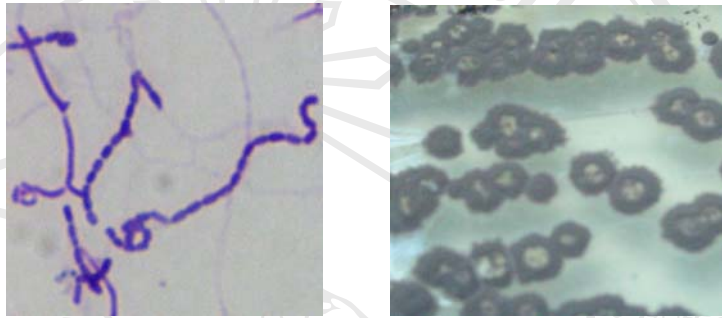
ภาพที่ 16 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อ SAC1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนีสที่ปรากฏบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

GLII โคลินีมีสี greenish gray (412) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคลินีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ streak เชื้อ อย่างสม่ำเสมอ ขอบโคลินีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ท่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Spirales type และแบบ Rectiflexibiles type (ภาพที่ 17)



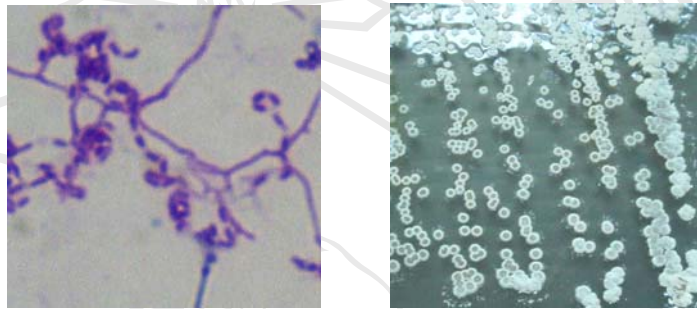
ภาพที่ 17 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์แบบ Spirales type และแบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อ GLII ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลินีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

TUR1 โคลินีมีสี reddish gray (408) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคลินีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ขอบโคลินีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อย่างอื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ *Retinaculiaperti* type และ *Rectiflexibiles* type (ภาพที่18)



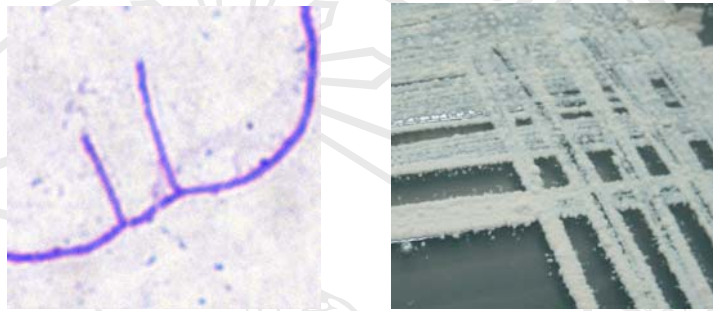
ภาพที่ 18 ลักษณะการเรียงตัวของลักษณะเส้นสายสปอร์แบบ *Retinaculiaperti* type และแบบ *Rectiflexibiles* type ของเชื้อ TUR1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลินีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

GLA1 โคลินีมีสี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง เจริญสุม่าเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ขอบโคโลนิมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี light greenish yellow (135) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อแอกคิโนมัยซีสเอนโดไฟท์สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Retinaculiaperti type แบบ Rectiflexibles type และแบบ Spirales type (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ลักษณะการเรียงตัวของลักษณะเส้นสายสปอร์แบบ Retinaculiaperti type และแบบ Rectiflexibles type ของเชื้อ GLA1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนิบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

KAE1 โคโลนีมีสี pale yellow (127) ลักษณะคล้ายผงแป้ง เจริญสม่าเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่น นอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ท่อกันเป็น สายยาวคล้ายลูกโซ่ ประมาณ 10 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์ (spore chain) เป็นแบบ Rectiflexibles type (ภาพที่ 20)

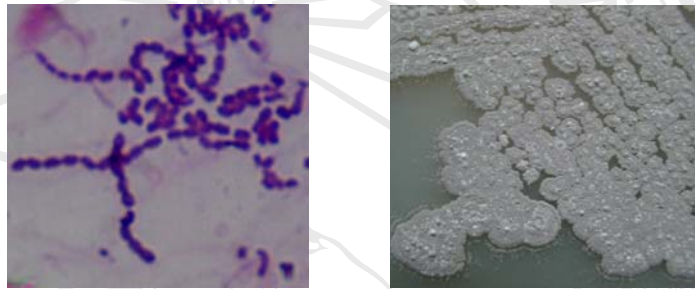


ภาพที่ 20 ลักษณะการเรียงตัวของลักษณะเส้นสายสปอร์แบบ Rectiflexibles type ของเชื้อ KAE1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)



### 1.2.2 สกุล *Nocardia*

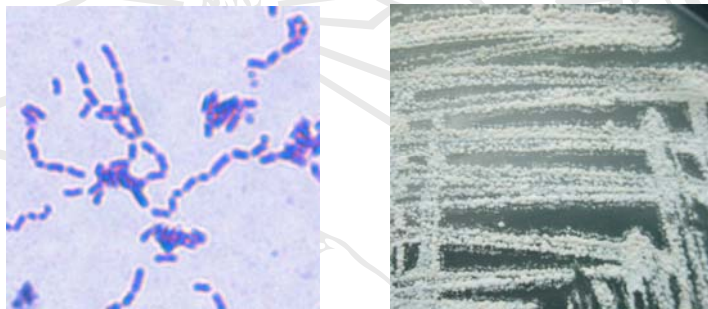
FIT 2 โคโลนีมีสี medium gray (407) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ฝิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี soft reddish yellow (146) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลักษณะของเส้นสายสปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium ของเชื้อ FIT 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

### 1.2.3 สกุล *Nocardioopsis*

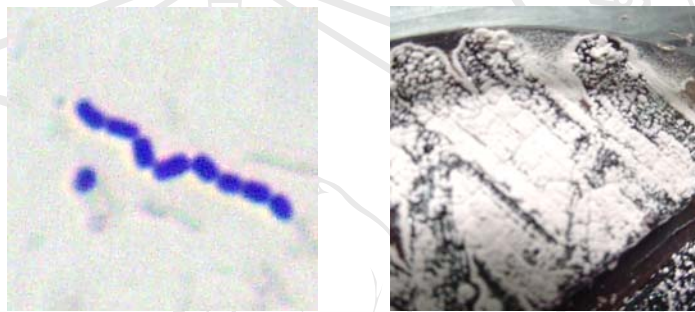
HOU1 โคโลนีมีสี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak เชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium การเรียงตัวเป็นแบบ irregularly zig-zagged (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ลักษณะของเส้นสายสปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium ของเชื้อ HOU1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคโลนีบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

#### 1.2.4 สกุล *Nocardioidea*

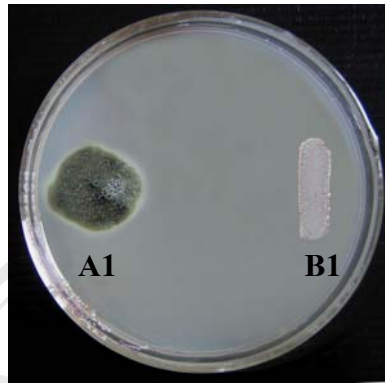
LEM1 โคลนีสี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคลนิจერიญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ streak เชื้ออย่างสม่ำเสมอ หนาแน่น ขอบโคลนีสีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยมีสี yellowish brown (99) ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นนอกจากสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตเอนโคไฟท์สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium จากลักษณะดังกล่าว จึงจัดอยู่ในสกุล *Nocardioidea* (ภาพที่ 23)



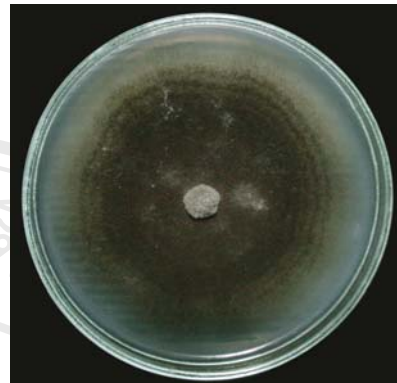
ภาพที่ 23 ลักษณะของเส้นสายสปอร์เกิดจากการแตกหักของ aerial mycelium ของเชื้อไอโซเลท FIT2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ซ้าย) และลักษณะของโคลนบนอาหาร IMA-2 (ขวา)

## 2. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่มีผลยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า

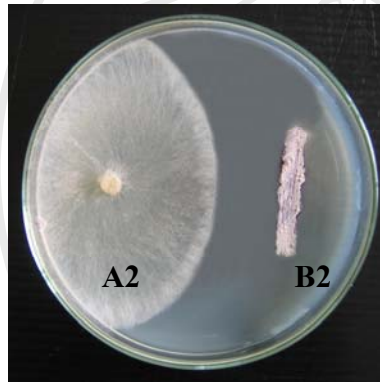
จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ทั้ง 4 สกุล 16 ไอโซเลท สามารถยับยั้งและให้ผลการวัดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ต่อการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด ได้แตกต่างกัน และแตกต่างจากชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* สูงที่สุด คือ FIT2, LEM1 และ HOU1 ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 82.81, 83.57 และ 90.00 ตามลำดับ (ภาพที่ 24, ตารางที่ 2)



ชุดทดสอบ



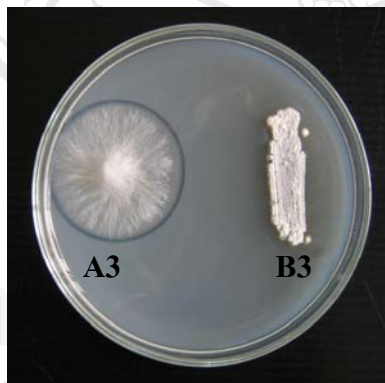
ชุดควบคุม



ชุดทดสอบ



ชุดควบคุม



ชุดทดสอบ



ชุดควบคุม

ภาพที่ 24 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ แอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ โดยวิธี dual culture

A1: *Alternaria brassicicola*

B1: FIT2

A2: *Rhizoctonia solani*

B2: LEM1

A3: *Sclerotium rolfsii*

B3: HOU1

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคของคะน้า โดยเชื้อแอคติโนมัยซีตเอนโดไฟท์ 16 ไอโซเลท

สกุล	เชื้อแอคติโนมัยซีต เอนโดไฟท์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1</sup> (%)		
		<i>A. brassicicola</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
<i>Nocardia</i>	FIT 2	82.81 <sup>a/2</sup>	60.72 <sup>de</sup>	78.89 <sup>de</sup>
<i>Nocardioides</i>	LEM1	56.25 <sup>g</sup>	83.57 <sup>a</sup>	77.23 <sup>ef</sup>
<i>Nocardiopsis</i>	HOU1	70.31 <sup>cde</sup>	43.57 <sup>ijk</sup>	90.00 <sup>a</sup>
<i>Streptomyces</i>	FIT 1	73.44 <sup>bc</sup>	71.43 <sup>b</sup>	76.11 <sup>f</sup>
	FIT 3	75.00 <sup>b</sup>	52.14 <sup>g</sup>	71.67 <sup>g</sup>
	FIT 4	75.00 <sup>b</sup>	49.29 <sup>gh</sup>	66.67 <sup>jk</sup>
	FIT 5	67.19 <sup>ef</sup>	62.86 <sup>d</sup>	67.78 <sup>ij</sup>
	FIT 6	68.75 <sup>def</sup>	59.29 <sup>c</sup>	65.56 <sup>k</sup>
	FIT 7	71.88 <sup>bcd</sup>	66.43 <sup>c</sup>	68.34 <sup>ij</sup>
	NEE1	54.69 <sup>g</sup>	46.43 <sup>hi</sup>	80.56 <sup>cd</sup>
	KMI1	70.31 <sup>cde</sup>	41.43 <sup>k</sup>	82.22 <sup>c</sup>
	SAC1	71.88 <sup>bcd</sup>	60.00 <sup>de</sup>	86.11 <sup>b</sup>
	GLI1	50.00 <sup>h</sup>	70.72 <sup>b</sup>	67.78 <sup>ij</sup>
	TUR1	65.63 <sup>f</sup>	55.72 <sup>f</sup>	68.89 <sup>hi</sup>
	GLA1	56.25 <sup>g</sup>	45.71 <sup>ij</sup>	70.56 <sup>gh</sup>
	KAE1	57.81 <sup>g</sup>	42.86 <sup>jk</sup>	80.56 <sup>cd</sup>
LSD <sub>0.05</sub>		4.10	2.91	1.99
CV (%)		4.33	3.60	1.87

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่แยกได้ทั้ง 16 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าแต่ละเชื้อสาเหตุนั้น มีระดับของการยับยั้งที่แตกต่างกัน (เกษม, 2532) ดังนี้

#### การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคโนบจุด

FIT2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดคือ 82.81 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ FIT3 และ FIT4 ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 75 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ซึ่งถือได้ว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งในระดับสูงมาก สำหรับ FIT1 สามารถยับยั้งได้ 73.44 เปอร์เซ็นต์และ SAC1 และ FIT7 สามารถยับยั้งได้ 71.88 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ ถือว่าสามารถยับยั้งได้ในระดับสูง ส่วนไอโซเลทอื่นๆ ถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ในระดับปานกลางถึงสูง (ภาพที่ 25)

#### การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโนก้านใบและต้นเน่า

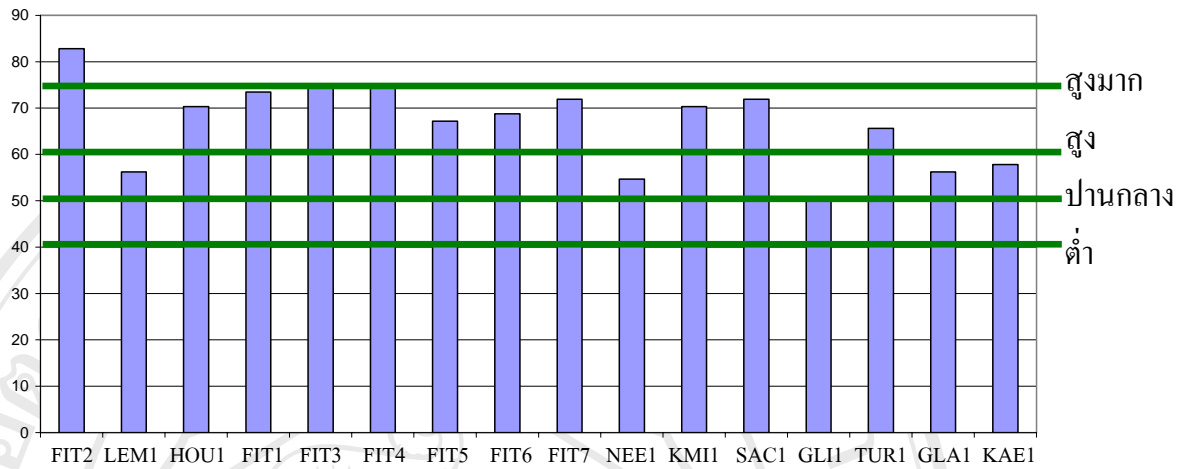
LEM1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดคือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ FIT1 และ BOE1 ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 71.43 และ 70.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถือว่าสามารถยับยั้งได้ในระดับสูง ส่วนไอโซเลทอื่นๆถือว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งในระดับปานกลางถึงสูง นอกจากนี้ไอโซเลท FIT4 NEE1 GAL1 HOU1 KAE1 และ KMI1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ คือ 49.29 46.43 45.71 43.57 42.86 และ 41.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 26)

#### การยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่า

HOU1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุดคือ 90.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไอโซเลท SAC1 KMI1 NEE1 KAE1 FIT2 และ FIT1 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อได้ในระดับสูงมากเช่นกันคือ 86.11 82.22 80.56 (ทั้งไอโซเลท NEE1 และ KAE1) 78.89 และ 76.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทอื่นๆถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ในระดับสูง (ภาพที่ 27)

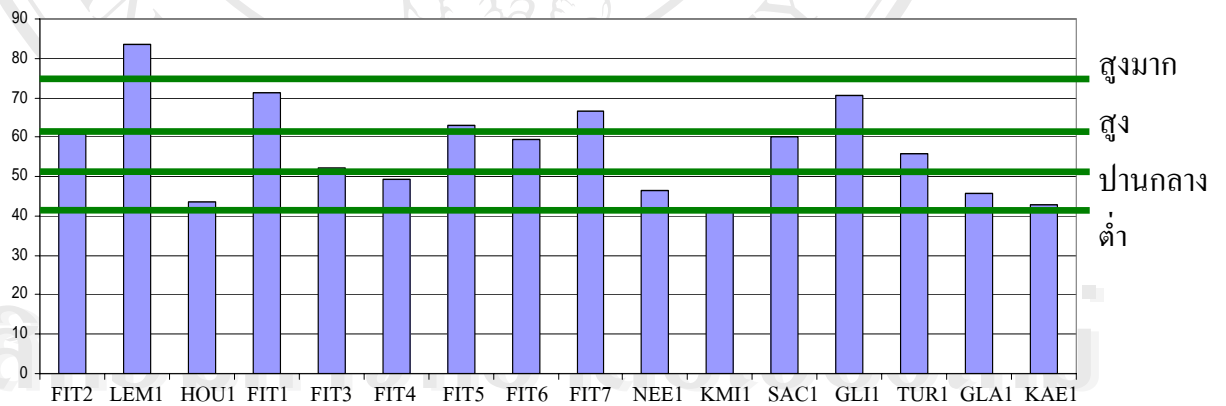
จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจึงได้คัดเลือกเชื้อ FIT2 LEM1 และ HOU1 มาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าในส่วนของของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ และความสามารถการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคของกล้าคะน้าในสภาพโรงเรือน พร้อมทั้ง ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นข้อมูลช่วยในการเพิ่มปริมาณเชื้อเมื่อต้องการนำไปใช้ รวมทั้ง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวิเคราะห์หา diaminopimelic acid isomer และ whole cell sugar ของเชื้อ ซึ่งหากได้ข้อมูลเหล่านี้ครบถ้วนจึงจะสามารถจัดจำแนกชนิด (species) ของแอกติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ เหล่านี้ได้ในอนาคต (Pilunthana, 2003)

## เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



ภาพที่ 25 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้าโดยเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต 16 ไอโซเลต

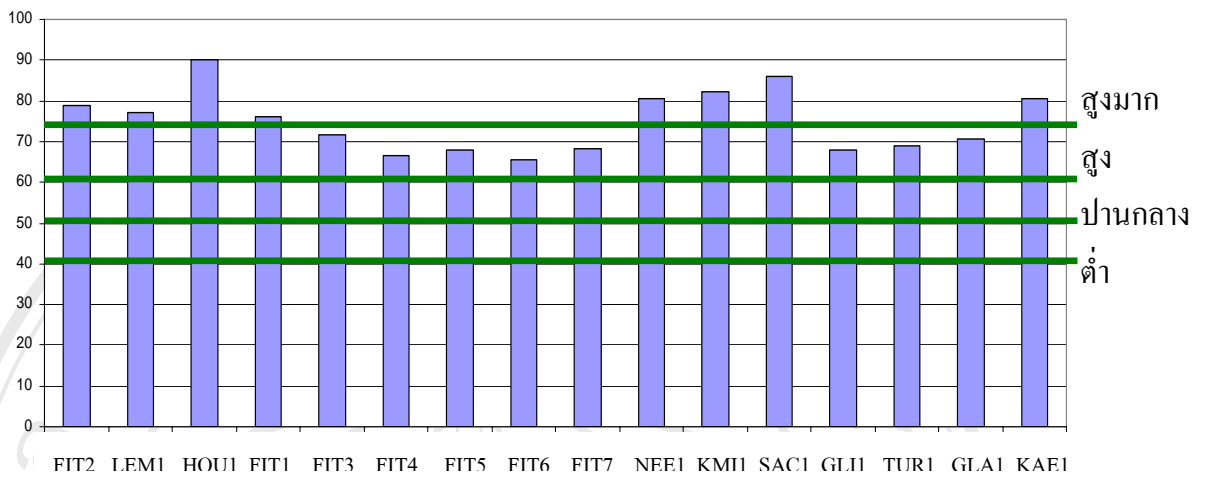
## เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



ภาพที่ 26 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่าของคะน้าโดยเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต 16 ไอโซเลต



## เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

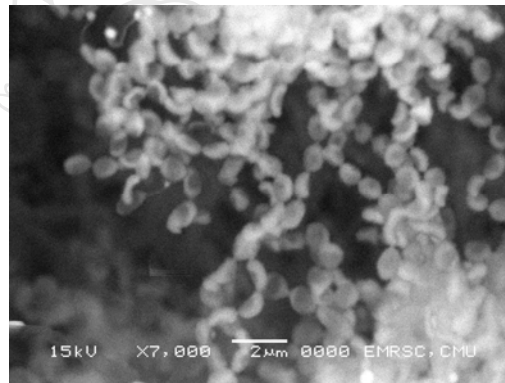


ภาพที่ 27 ประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อแอสคิโนมัซีสเอนโดไฟท์ 16 ไอโซเลตต่อเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าของกะน้า

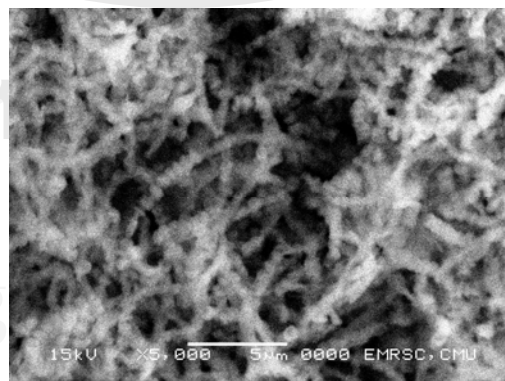
### 3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด สามารถอธิบายลักษณะของเชื้อได้ดังนี้

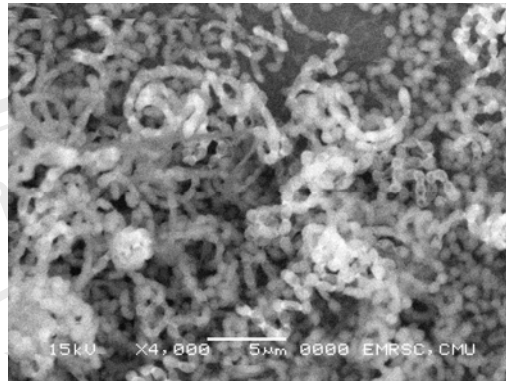
FIT2 มีสปอร์ทั้งลักษณะเป็นท่อนสั้นถึงกลม และ โต้่งงอเล็กน้อย ผิวของสปอร์เรียบ เรียงต่อกันเป็นสายสั้นถึงยาว (ภาพที่ 28) LEM1 สปอร์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นถึงกลม ผิวของสปอร์เรียบ เรียงต่อกันเป็นสายยาว (ภาพที่ 29) ส่วน HOU1 สปอร์มีทั้งลักษณะเป็นรูปไข่ (oval) จนถึงเป็นท่อนสปอร์ผิวเรียบ เรียงต่อกันเป็นสายยาว (ภาพที่ 30) จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่ต่างชนิด (species) กัน แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้



ภาพที่ 28 เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ FIT2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด กำลังขยาย 7000 เท่า



ภาพที่ 29 เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ LEM1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด กำลังขยาย 5000 เท่า



ภาพที่ 30 เชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ HOU1 ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด กำลังขยาย 4000 เท่า

#### 4. การศึกษาคุณสมบัติการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

จากการนำเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ FIT 2 LEM1 และ HOU1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของกะน้าได้ดีที่สุดมาศึกษาการเจริญในอาหาร ISP 2-5 (ภาพที่ 31) ตามวิธีของ Shirling and Gottlieb (1966) ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

##### 4.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

FIT2 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2-5 โดยโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง สีเทา (ภาพที่ 31) แต่เกิดความแตกต่างของสีเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนมากโคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา พบว่าในอาหาร ISP 2 โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อ และไม่พบการแพร่ของรงควัตถุ (ตารางที่ 3)

LEM1 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2-5 โดยโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีมีสีขาว (ภาพที่ 31) แต่เกิดความแตกต่างของสีเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนมากโคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร ISP 4 โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อ การแพร่ของรงควัตถุขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร บนอาหาร ISP 2 และ ISP 4 ไม่เกิดการแพร่ของรงควัตถุ แต่เกิดการแพร่บนอาหาร ISP 3 และ ISP 5 โดยจะให้รงควัตถุสีน้ำตาล สีของรงควัตถุเกิดความแตกต่างเล็กน้อย ขึ้นกับชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 4)

HOU1 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2-5 โดยโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีมีสีขาว (ภาพที่ 31) แต่เกิดความแตกต่างของสีเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนมากโคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา พบว่าในอาหาร ISP 2 โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อและไม่พบการแพร่ของรงควัตถุ (ตารางที่ 5)



ISP 2



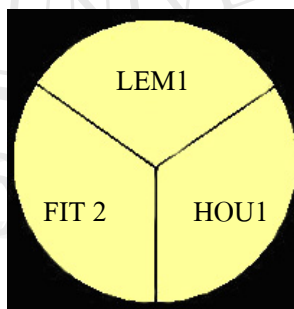
ISP 3



ISP 4



ISP 5



A.

ภาพที่ 31 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้หลังเลี้ยงบนอาหาร ISP2-5 นาน 4 สัปดาห์ โดย A แสดงตำแหน่งการวางเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญของเชื้อ FIT 2 หลังเลี้ยงบนอาหาร ISP2-5 นาน 4 สัปดาห์

ชนิดของอาหาร	คุณสมบัติ	ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี
Yeast-malt extract agar (ISP-2 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี medium gray<sup>1</sup> (407) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี medium gray (407) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อสม่ำเสมอ หนาแน่น ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Oatmeal agar (ISP-3 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี light gray (398) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี dark olive gray (420) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Inorganic salts-starch agar (ISP-4 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี light gray (397) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบเป็นเส้นซ้อนกัน</li> <li>- สี light gray (397) ขอบโคโลนีสี grayish white (390) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญหนาแน่นสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Glycerol asparagines agar (ISP-5 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี medium gray (406) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี medium gray (406) ลักษณะแข็งและขุ่น โคโลนีเจริญหนาแน่นสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>

<sup>1</sup>(อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name, 1987)

ตารางที่ 4 ลักษณะการเจริญของเชื้อ LEM1 หลังเลี้ยงบนอาหาร ISP2-5 นาน 4 สัปดาห์

ชนิดของอาหาร	คุณสมบัติ	ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี
Yeast-malt extract agar (ISP-2 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนียวผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี dark red purple<sup>1</sup> (387) เจริญเป็นหย่อมๆ ตามรอยที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Oatmeal agar (ISP-3 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนียวผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี dark red purple (387) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา</li> <li>- สี brown (100)</li> </ul>
Inorganic salts-starch agar (ISP-4 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนียวผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี dark red purple (387) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อ สม่ำเสมอ หนาแน่น ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Glycerol asparagines agar (ISP-5 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนียวผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี dark red purple (387) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี yellowish white (393) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา</li> <li>- สี yellowish brown (97)</li> </ul>

<sup>1</sup>(อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name, 1987)

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อ HOU1 หลังเลี้ยงบนอาหาร ISP2-5 นาน 4 สัปดาห์

ชนิดของอาหาร	คุณสมบัติ	ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี
Yeast-malt extract agar (ISP-2 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี pale greenish yellow<sup>1</sup> (129) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี pale yellow (128) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญแผ่ออกไปมากกว่าแนวที่ปลูกเชื้อ สม่ำเสมอ หนาแน่น ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Oatmeal agar (ISP-3 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี beige white (392) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี white (388) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Inorganic salts-starch agar (ISP-4 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี beige white (392) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี white (388) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกัน</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>
Glycerol asparagines agar (ISP-5 medium)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เส้นใยได้ผิวอาหาร</li> <li>- เส้นใยเหนือผิวอาหาร</li> <li>- การแพร่ของรงควัตถุ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สี yellowish white (393) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ</li> <li>- สี white (388) ลักษณะคล้ายผงแป้ง โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา เจริญเป็นวงซ้อนกันอย่างหนาแน่น</li> <li>- ไม่ปรากฏ</li> </ul>

<sup>1</sup>(อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name, 1987)

#### 4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

จากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้บนอาหาร IMA-2 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆกัน ที่ 10 20 25 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า FIT2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ปานกลาง ส่วนในช่วงอุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของเชื้อ LEM1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสมีการเจริญในระดับปานกลางและที่ 10 องศาเซลเซียส เชื้อมีเจริญได้เล็กน้อย และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของเชื้อ HOU1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสมีการเจริญในระดับปานกลาง และในช่วงอุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเชื้อเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 32

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซิสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ บนอาหาร IMA นาน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิต่างๆ

เชื้อแอกติโนมัยซิส เอนโคไฟท์	ระดับอุณหภูมิ (°C)				
	10	20	25	30	40
FIT 2	—	—	++	++	+++
LEM1	+	++	+++	+++	—
HOU1	+	+	++	++	+++

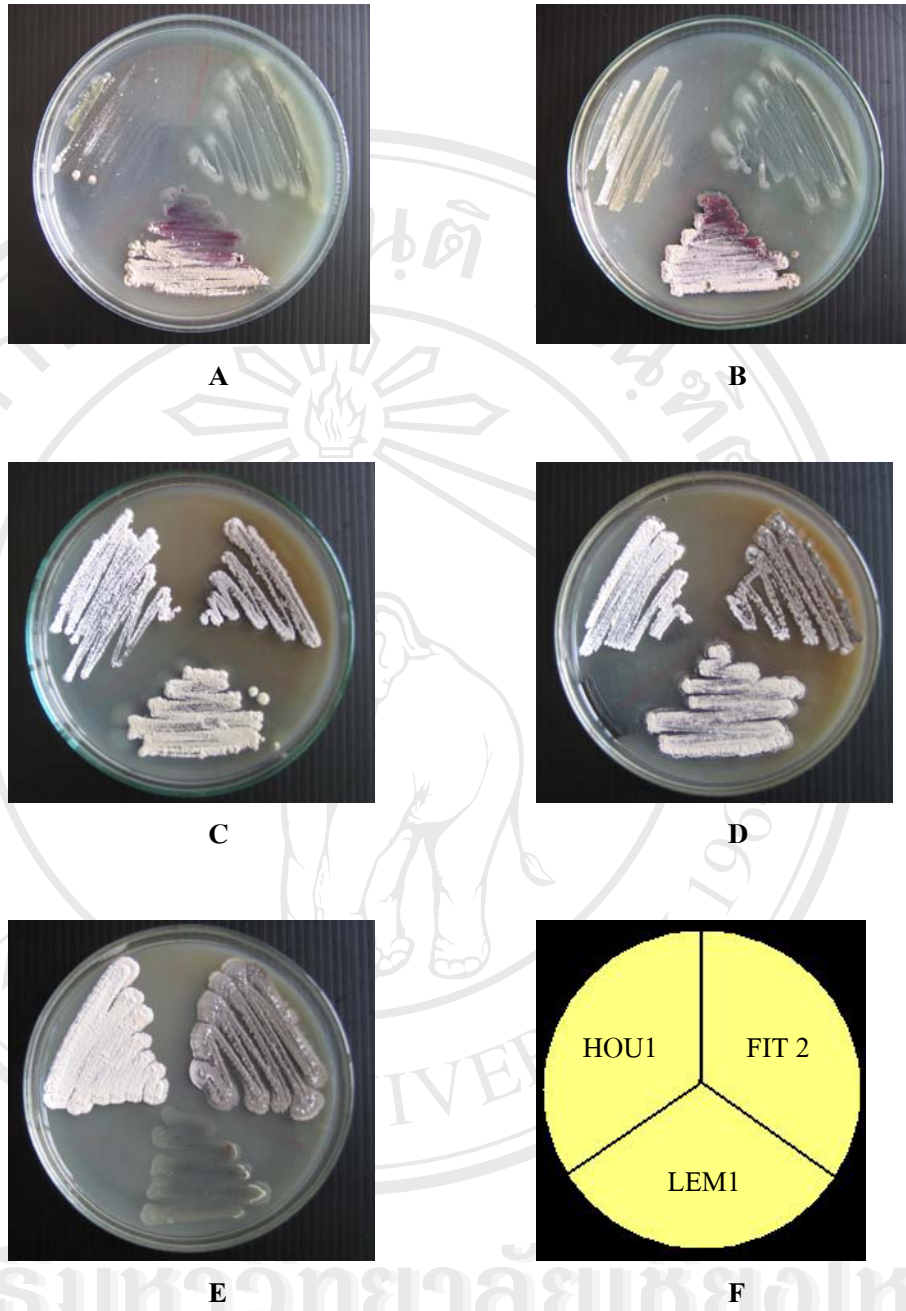
— หมายถึง ไม่มีการเจริญ

+ „ มีการเจริญน้อย

++ „ มีการเจริญปานกลาง

+++ „ มีการเจริญดีมาก





ภาพที่ 32 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสเพอริลลัส นิดูแลน โดไฟท์ที่คัดเลือกได้บนอาหาร IMA-2 (F) ที่อุณหภูมิต่างๆ (A-E) นาน 2 สัปดาห์

A : 10 องศาเซลเซียส

B : 20 องศาเซลเซียส

C : 25 องศาเซลเซียส

D : 30 องศาเซลเซียส

E : 40 องศาเซลเซียส

F : ตำแหน่งการวางเชื้อ

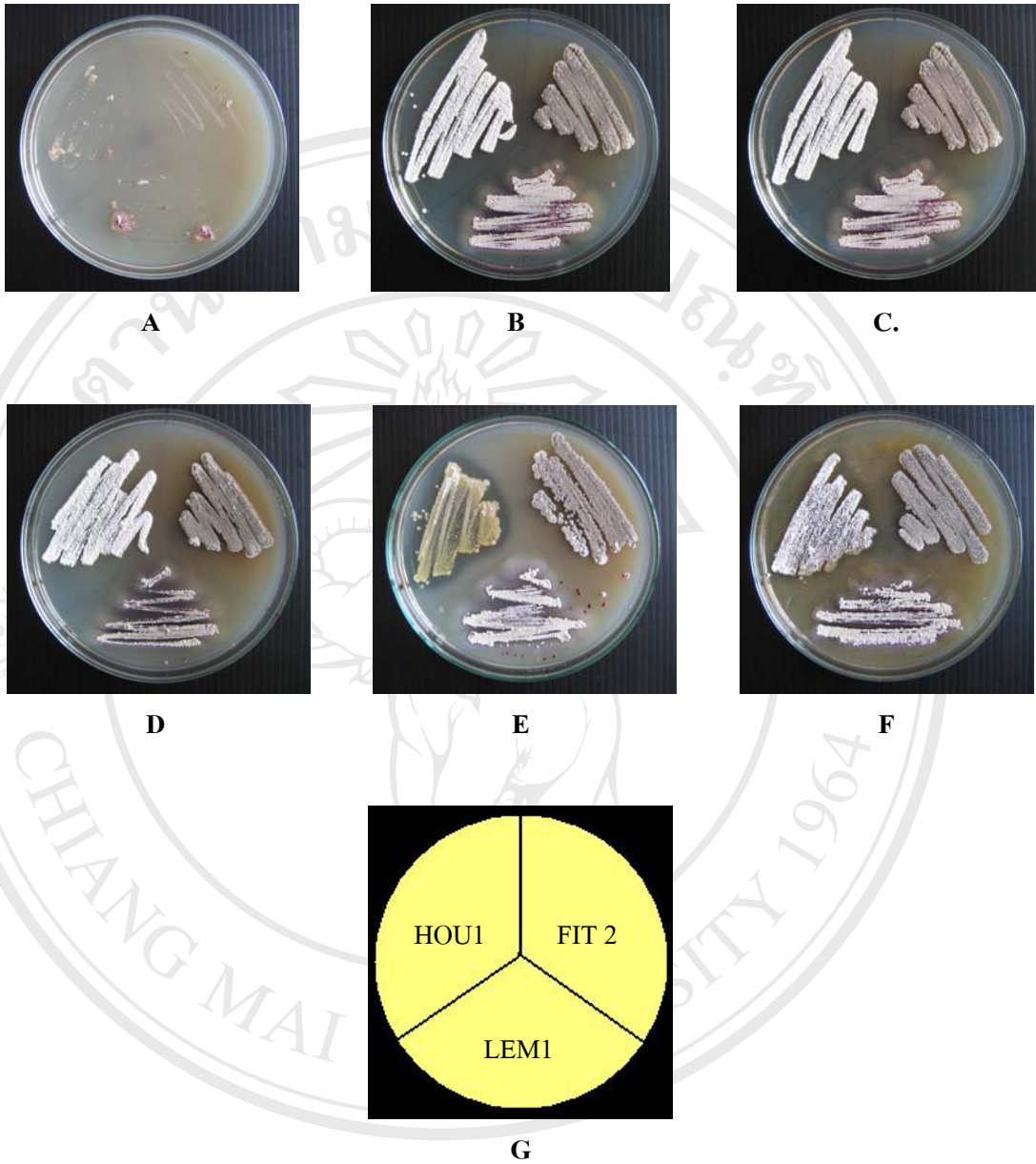
#### 4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ FIT 2 LEM1 และ HOU1 บนอาหาร IMA-2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันตั้งแต่ 4 ถึง 9 พบว่า FIT 2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 LEM1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8-9 และในระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5-7 พบว่าสามารถเจริญได้ปานกลาง ส่วน HOU1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 เท่านั้น และในระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5-6 พบว่าสามารถเจริญได้ปานกลาง ส่วนระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8-9 พบว่าเชื้อเจริญได้น้อย นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ไม่มีการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 33

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร IMA-2 ที่ปรับระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง จาก 4 ถึง 9 นาน 5 วัน

เชื้อแอกติโนมัยซีส เอนโดไฟท์	ระดับ pH ของอาหาร					
	4	5	6	7	8	9
FIT 2	—	+++	+++	+++	+++	+++
LEM1	—	++	++	++	+++	+++
HOU1	—	++	++	+++	+	+

— หมายถึง ไม่มีการเจริญ  
 + „ มีการเจริญน้อย  
 ++ „ มีการเจริญปานกลาง  
 +++ „ มีการเจริญดีมาก



ภาพที่ 33 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซิสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ (G) บนอาหาร IMA-2 ที่ปรับระดับค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) จาก 4 ถึง 9 (A-F) นาน 5 วัน

A : pH 4

B : pH 5

C : pH 6

D : pH 7

E : pH 8

F : pH 9

#### 4.4 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ

การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัซซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยเลือกใช้อาหาร ISP 9 เป็นอาหารพื้นฐานในการศึกษาและใช้น้ำตาล *D*-glucose, *L*-arabinose, sucrose, *D*-xylose, inositol, *D*-mannose, *D*-fructose, *L*-rhamnose และ raffinose โดยมีอาหาร ISP 9 ที่มีและไม่มี *D*-glucose เป็นชุดควบคุม ผลการศึกษาพบว่า เชื้อไอโซเลท LEM1 สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมน้ำตาลได้ทุกชนิด ไอโซเลท FIT2 สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้ ยกเว้นอาหารที่ผสมน้ำตาล Raffinose ส่วนไอโซเลท HOU1 สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมน้ำตาล *D*-glucose และ *D*-mannose เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัซซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP9 ที่ผสมน้ำตาลชนิดต่างๆ นาน 15 วัน

แหล่งคาร์บอน	เชื้อแอสคิโนมัซซีสเอนโคไฟท์		
	FIT 2	LEM1	HOU1
<i>D</i> -Glucose	+	+	+
<i>L</i> -Arabinose	+	+	-
Sucrose	+	+	-
<i>D</i> -Xylose	+	+	-
Inositol	+	+	-
<i>D</i> -Mannose	+	+	+
<i>D</i> -Fructose	+	+	-
<i>L</i> -Rhamnose	+	+	-
Raffinose	-	+	-
No sugar	+	+	-

+ หมายถึง มีการเจริญ

- ไม่มีการเจริญ

#### 4.5 การผลิตเมลานินของเชื้อ

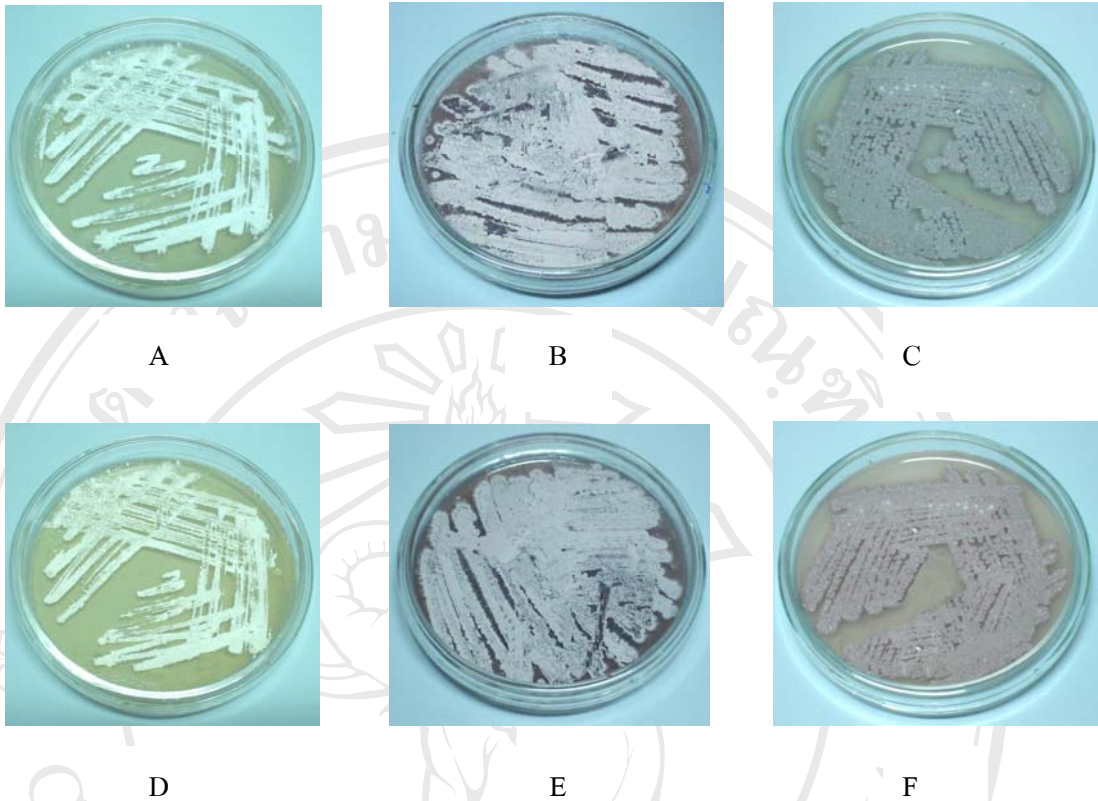
ศึกษาการผลิตเมลานินของเชื้อ FIT2 LEM1 และ HOU1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP 6 และ ISP 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-4 วัน พบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร ทั้ง 2 ชนิด แสดงว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทไม่มีการผลิตเมลานิน ดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 34

ตารางที่ 9 การผลิตเมลานินของเชื้อแอกติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ หลังเลี้ยงบนอาหาร ISP6-7 นาน 4 วัน

แอกติโนมัยซีส เอนโดไฟท์	ชนิดของอาหาร	การเกิดสีของเมลานิน
FIT2	ISP 6: Peptone-yeast extract-iron agar medium	—
	ISP 7: Tyrosine agar medium	—
LEM1	ISP 6: Peptone-yeast extract-iron agar medium	—
	ISP 7: Tyrosine agar medium	—
HOU1	ISP 6: Peptone-yeast extract-iron agar medium	—
	ISP 7: Tyrosine agar medium	—

— หมายถึง ไม่มีการผลิตเมลานิน

+ „ มีการผลิตเมลานิน



ภาพที่ 34 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้บนอาหาร ISP 6 และ ISP 7 ที่ไม่สามารถผลิตเมลานินได้โดยไม่ทำให้สีของอาหารทั้ง 2 ชนิดเปลี่ยนแปลง

A-D : HOU1 เจริญบนอาหาร ISP 6- ISP 7 ตามลำดับ

B-E : LEM1 เจริญบนอาหาร ISP 6- ISP 7 ตามลำดับ

C-F : FIT2 เจริญบนอาหาร ISP 6- ISP 7 ตามลำดับ

#### 4.6 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีรงควัตถุ

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีรงควัตถุของเชื้อ FIT2 LEM1 และ HOU1 โดยเลี้ยงในอาหาร ISP 2-5 ที่ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า เมื่อหยดสารละลาย 1N HCl ลงบริเวณใกล้กับโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีเพียง LEM1 ที่เจริญบนอาหาร ISP-3 เท่านั้นที่เกิดการเปลี่ยนสีจากสี dark red purple (387) เป็นสี dark violet (344) เช่นเดียวกับเมื่อหยดสารละลาย 1N NaOH มีเพียง LEM1 ที่เจริญบนอาหาร ISP-3 เท่านั้นที่เกิดการเปลี่ยนสีจากสี dark red purple (387) เป็นสี deep yellowish red (52) ส่วนไอโซเลทอื่นไม่พบการเปลี่ยนสีรงควัตถุบนอาหาร ISP 2-5 ดังแสดงในตารางที่ 10 และ ภาพที่ 35

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนสีของรงควัตถุของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ที่เจริญบนอาหาร ISP 2-5 ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ต่างกัน นาน 3 สัปดาห์

แอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์	ชนิดของอาหาร							
	ISP-2		ISP-3		ISP-4		ISP-5	
	1N HCl	1N NaOH	1N HCl	1N NaOH	1N HCl	1N NaOH	1N HCl	1N NaOH
FIT2	— <sup>1</sup>	—	—	—	—	—	—	—
LEM1	—	—	dark violet <sup>2</sup> (344)	deep yellowish red <sup>2</sup> (52)	—	—	—	—
HOU1	—	—	—	—	—	—	—	—

<sup>1</sup> ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

<sup>2</sup> อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name, 1987



A



B



C

ภาพที่ 35 การเปลี่ยนสีของรงควัตถุของเชื้อ LEM1 ที่เจริญบนอาหาร ISP3 ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ต่างกัน นาน 3 สัปดาห์

A. ลักษณะของเชื้อ ก่อนทดสอบ

B. เมื่อหยด 1N HCl เกิดการเปลี่ยนสีจาก dark red purple (387) เป็นสี dark violet (344)

C. เมื่อหยด 1N NaOH เกิดการเปลี่ยนสีจาก dark red purple (387) เป็นสี deep yellowish red (52)



#### 4.7 การย่อยสลายแป้ง

เมื่อหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร ISP-4 บริเวณใกล้โคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีส เอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ พบว่าบริเวณรอบโคโลนีของ FIT2 LEM1 และ HOU1 ใสไม่มีสี เช่นเดียวกับการทดสอบในอาหารเหลว เมื่อหยดสารละลายไอโอดีนลงไปบนหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าอาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้และไม่เหลือแป้งที่จะทำปฏิกิริยากับไอโอดีน (ตารางที่ 11) ซึ่งต่างจากชุดควบคุมที่ปรากฏสีน้ำตาลของปฏิกิริยาระหว่างไอโอดีนกับแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 36)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีสเอนโคไฟท์หลังเลี้ยงในอาหาร ISP4 ชนิดแข็งและเหลว นาน 1 สัปดาห์ ตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีน

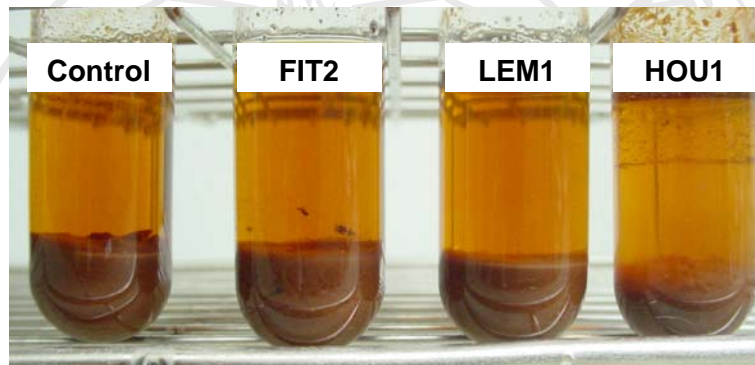
เชื้อแอสคิโนมัยซีส เอนโคไฟท์	ปฏิกิริยาหลังหยดไอโอดีน	
	อาหารแข็ง	อาหารเหลว
FIT2	บริเวณรอบโคโลนีใส	ไม่เปลี่ยนสี
LEM1	บริเวณรอบโคโลนีใส	ไม่เปลี่ยนสี
HOU1	บริเวณรอบโคโลนีใส	ไม่เปลี่ยนสี
ชุดควบคุม (ไม่เลี้ยงเชื้อ)	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล



ภาพที่ 36 ความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีสเอนโคไฟท์หลังเลี้ยงในอาหาร ISP4 ชนิดเหลว นาน 1 สัปดาห์ ตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีน

#### 4.8 การเปลี่ยนนมให้เป็นเพปโทน

จากการศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนนมเป็นเพปโทนของเชื้อแอสคิโนมัยซีสเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยการเลี้ยงเชื้อใน 10% litmus milk medium นาน 10 วัน พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ เช่นเดียวกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีสเอนโดไฟท์ไม่สามารถย่อย casein ในนมให้เป็นกรดอะมิโนได้ หรือกระบวนการ peptonization ไม่เกิดขึ้นใน litmus milk medium ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจึงไม่ใส (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 เชื้อแอสคิโนมัยซีสเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่เลี้ยงเชื้อใน 10% litmus milk medium นาน 10 วัน ไม่สามารถย่อยสลายนมได้

## 5. การทดสอบความสามารถการควบคุมโรคของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้

### 5.1 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท ไปเลี้ยงในอาหารเหลว และนำมากรองให้ได้ culture filtrate เพื่อนำไปทดสอบผลของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหารเหลวและมีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อ *A. brassicicola* R. solani สาเหตุโรคใบจุดคะน้า บนอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท นาน 7 วัน พบว่า culture filtrate ของ FIT2 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 68.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ LEM1 และ HOU1 ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 32.99 และ 32.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้ สารเคมี iprodione ที่ให้ผลยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ และ ชุดควบคุมที่เลี้ยงเชื้อในอาหาร IMA-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

สำหรับผลการยับยั้งเชื้อ *R. solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่าของคะน้า บนอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท นาน 7 วัน พบว่า culture filtrate ของ LEM1 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 49.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ FIT2 และ HOU1 ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 39.34 และ 23.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้ สารเคมี carboxin ที่ให้ผลยับยั้ง 80.46 เปอร์เซ็นต์ และ ชุดควบคุมที่เลี้ยงเชื้อในอาหาร IMA-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

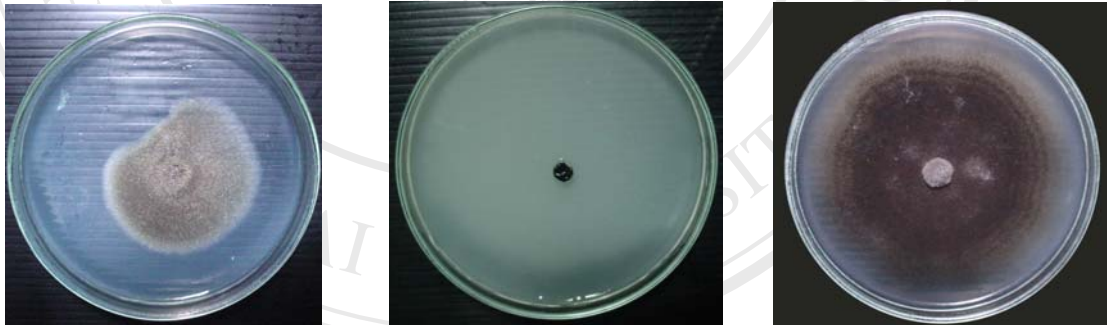
สำหรับผลการยับยั้งเชื้อ *S. rolfisii* สาเหตุโรครากเน่าของคะน้า บนอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท นาน 7 วัน พบว่า culture filtrate ของ HOU1 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 59.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ FIT2 และ HOU1 ให้ผลการยับยั้งเท่ากับ 43.89 และ 37.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้ สารเคมี carboxin ที่ให้ผลยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ และ ชุดควบคุมที่เลี้ยงเชื้อในอาหาร IMA-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

Culture Filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1</sup> (%)
FIT2	68.92 <sup>b 2</sup>
LEM1	32.38 <sup>c</sup>
HOU1	32.99 <sup>c</sup>
สารเคมี iprodione	100.00 <sup>a</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	2.49
CV (%)	2.76

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



A

B

C

ภาพที่ 38 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

A : IMA-2 ผสม culture filtrate ของเชื้อ FIT2

B : IMA-2 ผสม iprodione

C : IMA-2 (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

ชนิดของสารทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1</sup> (%)
FIT2	39.34 <sup>c 2</sup>
LEM1	49.45 <sup>b</sup>
HOU1	23.15 <sup>d</sup>
สารเคมี carboxin	80.46 <sup>a</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	3.05
CV (%)	4.12

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 39 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่าของกะน้า ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

D : IMA-2 ผสม culture filtrate ของเชื้อ LEM1

E : IMA-2 ผสม carboxin

F : IMA-2 (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

ชนิดของสารทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1</sup> (%)
FIT2	43.89 <sup>c 2</sup>
LEM1	37.86 <sup>d</sup>
HOU1	59.93 <sup>b</sup>
สารเคมี carboxin	100 <sup>a</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	3.59
CV (%)	3.86

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



G



H



I

ภาพที่ 40 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุรากเน่าของคะน้า ที่เลี้ยงในอาหาร IMA-2 ที่ผสม culture filtrate ของแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ นาน 7 วัน

G : IMA-2 ผสม culture filtrate ของเชื้อ HOU1

H : IMA-2 ผสม carboxin

I : IMA-2 (ชุดควบคุม)

## 5.2 ประสิทธิภาพการควบคุมโรค และการส่งเสริมการเจริญของคะน้ำในระยะกล้า

จากการหยุด suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ลงบนเมล็ดคะน้ำ หลังเพาะ 1 วัน เมื่อต้นกล้ามีอายุ 7 วัน จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงไป จากการบันทึกค่าความรุนแรงของโรคของกล้าคะน้ำที่อายุ 14 วัน ให้ผลดังนี้

การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า FIT2 LEM1 และ HOU1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคลงมาที่ระดับ 3 (ตารางที่ 15 ภาพที่ 41)

การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* พบว่า LEM1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค รองลงมาคือ HOU1 และ FIT2 ซึ่งต้นกล้าแสดงอาการของโรคที่ระดับ 1 คือเป็นแผลเล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคลงมาที่ระดับ 5 คือ ต้นตาย และรากสั้นมาก (ตารางที่ 16 ภาพที่ 42)

การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfisii* พบว่า HOU1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค รองลงมาคือ FIT2 และ LEM1 ซึ่งต้นกล้าแสดงอาการของโรคที่ระดับ 1 คือเป็นแผลเล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคลงมาที่ระดับ 5 คือ ต้นตาย และรากสั้นมาก (ตารางที่ 17 ภาพที่ 43)

จากการวัดค่าความสูงจากปลายราก ถึงปลายยอด ความสมบูรณ์ของลำต้นและรากของกล้าคะน้ำที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้ำ พบว่า FIT2 ส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 11.39 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ LEM1 และ HOU1 ที่ 8.09 และ 7.42 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดควบคุมที่เกิดโรคลงมาในระดับปานกลาง (ตารางที่ 18 ภาพที่ 44) ค่าความสูงจากปลายราก ถึงปลายยอด ความสมบูรณ์ของลำต้นและรากของกล้าคะน้ำที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่าของคะน้ำ พบว่า LEM1 ส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 11.44 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ HOU1 และ FIT2 ที่ 7.80 และ 7.31 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดควบคุมที่เกิดโรคลงมาในระดับรุนแรง (ตารางที่ 18 ภาพที่ 45) ส่วนค่าความสูงจากปลายราก ถึงปลายยอด ความสมบูรณ์ของลำต้นและรากของกล้าคะน้ำที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *S. rolfisii* สาเหตุโรครากเน่าของคะน้ำ พบว่า HOU1 ส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 12.14 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ FIT2 และ LEM1 ที่ 8.64 และ

8.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดควบคุมที่เกิดโรคในระดับรุนแรง (ตารางที่ 18 ภาพที่ 46)

ตารางที่ 15 ความรุนแรงของโรค ความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้า อายุ 14 วันหลังปลูก เชื้อรา *Alternaria brassicicola* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้

ลักษณะที่ปรากฏ	<i>A. brassicicola</i>			
	ชุดควบคุม	LEM1	HOU1	FIT2
ความรุนแรงของโรค <sup>1</sup>	3	0	0	0
ความสมบูรณ์ของต้น <sup>2</sup>	+	+++	++	++++
ความสมบูรณ์ของราก <sup>3</sup>	+	+++	++	++++

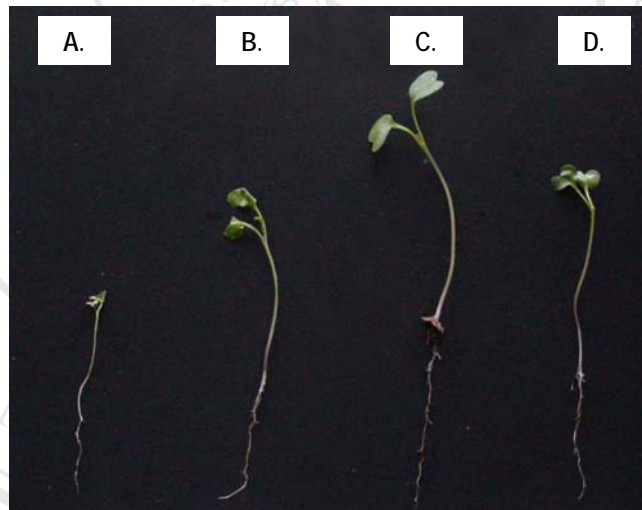


ภาพที่ 41 ความรุนแรงของโรค ความสูง และความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้าอายุ 14 วันที่มีการปลูกเชื้อด้วยเชื้อ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ FIT2 (B) LEM1 (C) HOU1 (D) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)



ตารางที่ 16 ความรุนแรงของโรค ความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้า อายุ 14 วันหลังปลูก เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้

ลักษณะที่ปรากฏ	<i>Rhizoctonia solani</i>			
	Control	LEM1	HOU1	FIT2
ความรุนแรงของโรค <sup>1</sup>	5	0	1	1
ความสมบูรณ์ของต้น <sup>2</sup>	—	++++	+	+
ความสมบูรณ์ของราก <sup>3</sup>	—	++++	++	++



ภาพที่ 42 ความรุนแรงของโรค ความสูง และความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้าอายุ 14 วันที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Rhizoctonia solani* สาเหตุโคนก้านใบและต้นเน่าร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกได้ FIT2 (B) LEM1 (C) HOU1(D) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตารางที่ 17 ความรุนแรงของโรค ความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้า อายุ 14 วันหลังปลูก เชื้อรา *Sclerotium rolfii* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

ลักษณะที่ปรากฏ	<i>S. rolfii</i>			
	Control	LEM1	HOU1	FIT2
ความรุนแรงของโรค <sup>1</sup>	5	1	0	1
ความสมบูรณ์ของต้น <sup>2</sup>	—	+	++++	++
ความสมบูรณ์ของราก <sup>3</sup>	—	+	++++	++



ภาพที่ 43 ความรุนแรงของโรค ความสูง และความสมบูรณ์ของต้นและรากของกล้าคะน้าอายุ 14 วันที่มีการปลูกเชื้อด้วย *Sclerotium rolfii* สาเหตุนำร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ FIT2 (B) LEM1 (C) HOU1(D) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)

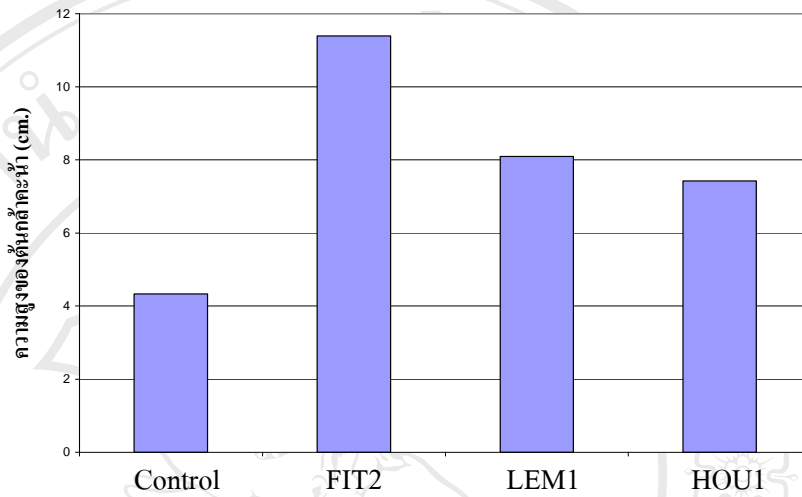
ตารางที่ 18 ความสูงจากปลายรากถึงปลายยอดของกล้าคะน้า อายุ 14วันที่ปลูกด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรครคะน้า *Alternaria brassicicola*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*

เชื้อแอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์	ความสูงของต้นกล้าคะน้า <sup>1</sup> (cm.)		
	<i>A. brassicicola</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)	4.33 <sup>d 2</sup>	5.33 <sup>c</sup>	5.81 <sup>c</sup>
FIT2	11.39 <sup>a</sup>	8.64 <sup>b</sup>	7.31 <sup>b</sup>
LEM1	8.09 <sup>b</sup>	8.02 <sup>b</sup>	11.44 <sup>a</sup>
HOU1	7.42 <sup>c</sup>	12.14 <sup>a</sup>	7.08 <sup>b</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	0.65	1.20	1.46
CV (%)	8.72	15.66	17.61

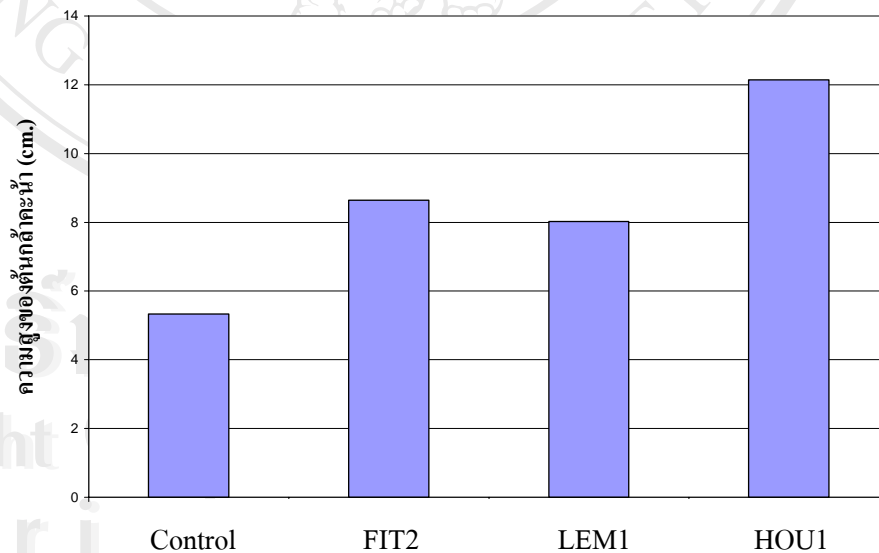
<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 9 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

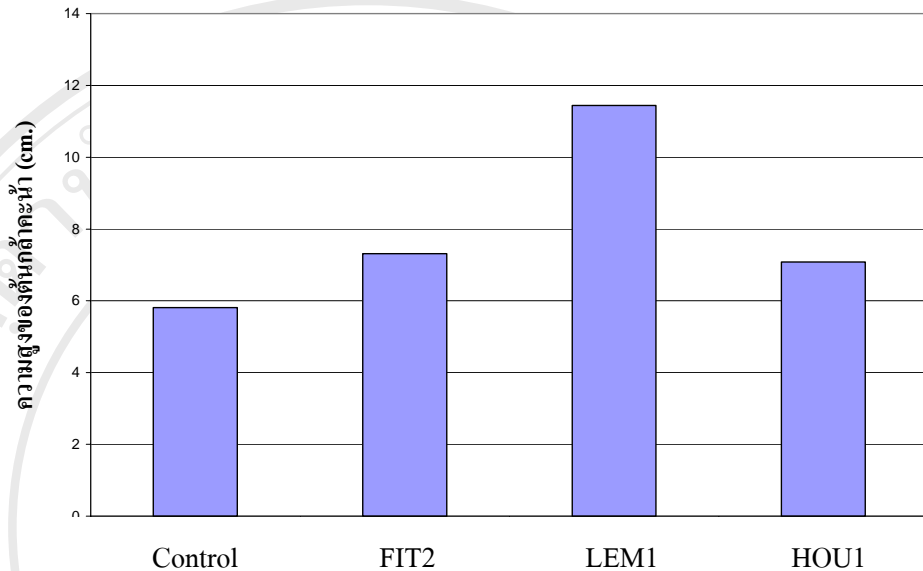
ภาพที่ 44 ความสูงจากปลายรากถึงปลายยอดของต้นกล้าคะน้า อายุ 14 วัน ที่ได้รับการปลูกเชื้อ  
แอกติโนมัยซีส์ร่วมกับเชื้อรา *Alternaria brassicicola*



ภาพที่ 45 ความสูงจากปลายรากถึงปลายยอดของต้นกล้าคะน้า อายุ 14 วัน ที่ได้รับการปลูกเชื้อ  
แอกติโนมัยซีส์ร่วมกับเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

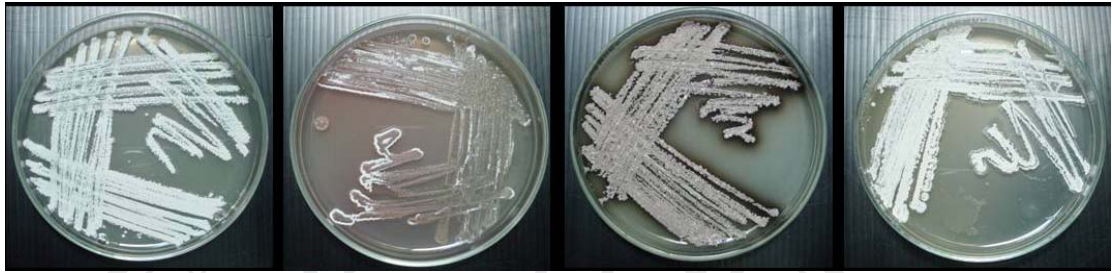


ภาพที่ 46 ความสูงจากปลายรากถึงปลายยอดของต้นกล้าคะน้า อายุ 14 วัน ที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสร่วมกับเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*



#### 6. การตรวจสอบความสามารถในการอยู่อาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ภายในเนื้อเยื่อของคะน้า

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ปลูกเชื้อลงบนกล้าคะน้าโดยวิธีการหยด suspension ของเชื้อลงไปขณะเพาะกล้า และปล่อยให้กล้าเจริญนาน 1 เดือนในสภาพเพาะกล้าที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์อีกครั้ง พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อ แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ทั้ง FIT2 LEM1 และ HOU1 จากภายในเนื้อเยื่อของคะน้า แต่จะพบเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่ต่างออกไปได้จำนวน 48 ไอโซเลท โดยแยกได้จากใบ เป็นจำนวน 46 ไอโซเลท จากราก 2 ไอโซเลท และไม่พบจากลำต้น เมื่อจัดจำแนกโดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี (Manual of color name, 1987; Williams *et al.*, 1989) และลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ที่แตกต่างกัน 8 ไอโซเลท ให้ชื่อ KAL1 ถึง KAL7 ซึ่งแยกได้จากส่วนใบ และไอโซเลท KAL8 แยกได้จากส่วนราก ดังแสดงในภาพที่ 47



KAL1

KAL2

KAL3

KAL4



KAL5

KAL6

KAL7

KAL8

ภาพที่ 47 เชื้อ *Streptomyces* KAL1-7 ซึ่งแยกได้จากใบ และ KAL8 ซึ่งแยกได้จากรากของคะน้า  
บนอาหาร IMA-2 นาน 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved