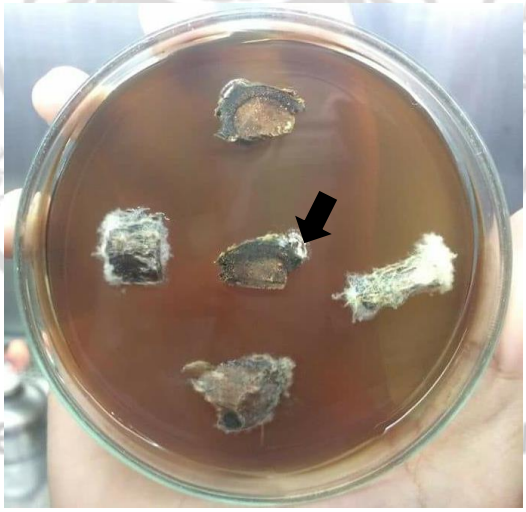
บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากใบ กิ่ง และรากของทุเรียนทั้งสามสายพันธุ์โดยวิธี Surface sterile

จากการทดลองแยกแอคติโนมัยซีทจากราก กิ่ง และใบ ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ นกหยิบ พวงมณี และกระปุกทองดี ด้วยวิธี Surface sterile โดยใช้อาหาร Humic acid-vitamin agar ในการแยกเชื้อ พบว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจะเจริญออกจากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของทุเรียน ซึ่งมีลักษณะของสปอร์เป็นผงแป้งสีขาว เหลือง เทา หรือสีชมพู โดยสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยได้จากพันธุ์พวงมณีจำนวน 7 ไอโซเลท (รหัส PM-L01, PM-L02, PM-S01, PM-S02, PM-S03, PM-S04 และ PM-R01) และจากพันธุ์กระปุกทองดีจำนวน 3 ไอโซเลท (รหัส KP-L01, KP-S02 และ KP-R01) แต่ไม่สามารถแยกได้จากพันธุ์นกหยิบ โดยพันธุ์กระปุกทองดีแยกได้จากส่วนใบ 1 ไอโซเลท ส่วนลำต้น 1 ไอโซเลต และจากราก 1 ไอโซเลท ส่วนพันธุ์พวงมณีแยกได้จากส่วนใบ 2 ไอโซเลท ลำต้น 4 ไอโซเลท และราก 1 ไอโซเลท แสดงลักษณะของสปอร์ของเชื้อเป็นผงแป้งสีขาวดังในภาพที่ 4.1 รายละเอียดของจำนวนไอโซเลตของเชื้อแสดงในตารางที่ 4.1 และลักษณะของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทมี Aerial hyphae เป็นสีขาวและสีเทา Substrate hyphae ทั้งหมดมีสีเหลือง สปอร์มีทั้งสีขาว เทา และดำ ส่วนโคโลนีมีสีขาวและเหลือง แสดงในตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อทุเรียนพันธุ์พวงมณี เจริญบนอาหาร Humic acid-vitamin agar อายุ 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ข ...รรณี

ตารางที่ 4.1 ผลการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากราก กิ่ง และใบ ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ นกหยิบ พวงมณี และกระปุกทองดี โดยวิธี Surface sterile

ทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง	ส่วนต่างๆ ของพืช			รวม
	ใบ	กิ่ง	ราก	
กระปุกทองดี	KP- L01	KP-S02	KP-R01	3
พวงมณี	PM-L01 PM-L02	PM-S01 PM-S02 PM-S03 PM-S04	PM-R01	7
นกหยิบ	-	-	-	0
รวม	3	5	2	10

หมายเหตุ : ตัวอักษรลำดับที่ 1 และ 2 คือ ตัวอย่างพันธุ์ทุเรียน KP คือ กระปุกทองดี, PM คือ พวงมณี และ NY คือ นกหยิบ
ตัวอักษรลำดับที่ 3 คือ ส่วนต่าง ๆ ของทุเรียน L คือ ใบ, S คือ กิ่ง และ R คือ ราก
และตัวเลขลำดับที่ 4 และ 5 คือ ลำดับของเชื้อที่แยกได้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากราก ลำต้น และใบ ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (กระปุกทองดี และพวงมณี)

แอคติโนมัยซีท	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore	Color of colony
KP- L01	ขาว	เหลือง	เทา	เหลือง
KP-S02	ขาว	เหลือง	ขาว	เหลือง
KP-R01	ขาว	เหลือง	เทา	เหลือง
PM-L01	เทา	เหลือง	ดำ	เหลือง
PM-L02	เทา	เหลือง	เทา	เหลือง
PM-S01	ขาว	เหลือง	เทา	ขาว
PM-S02	เทา	เหลือง	ดำ	ขาว
PM-S03	ขาว	เหลือง	เทา	ขาว
PM-S04	ขาว	เหลือง	ดำ	เหลือง
PM-R01	ขาว	เหลือง	เทา	เหลือง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Cross streak

เชื้อแอคติโนมัยซีทจากราก ลำต้น และใบ ของทุเรียนพันธุ์พวงมณีและกระปุกทองดี ที่แยกให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาทดสอบความสามารถในการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีขีดขวาง

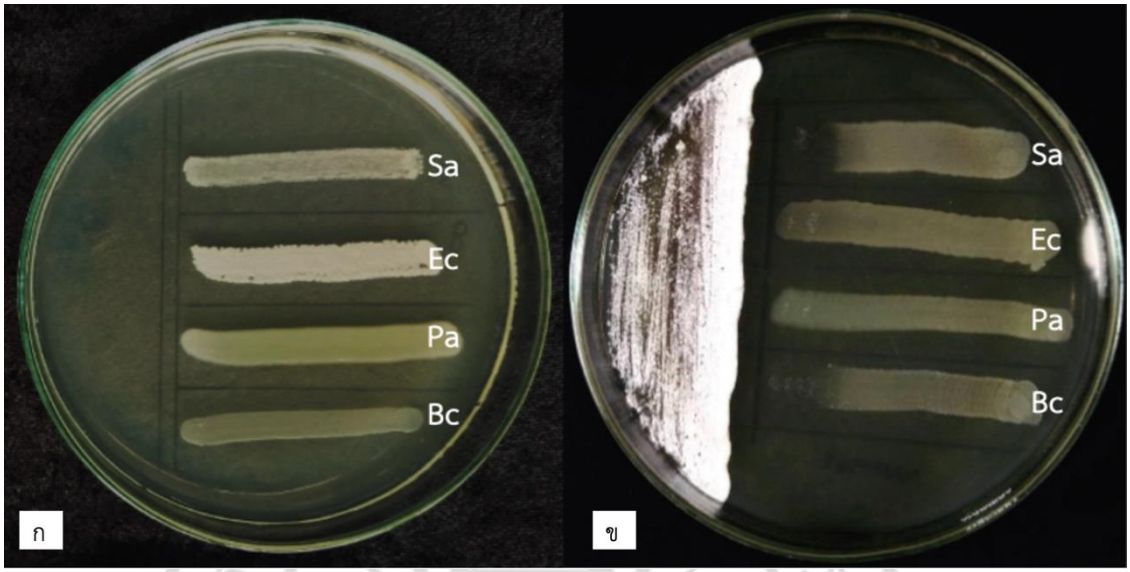
(Cross streak) จากการทดลองพบว่ามีเชื้อเพียงไอโซเลทเดียว คือ PM-R01 ที่มีฤทธิ์ยับยังเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (กลุ่มแบคทีเรีย) ได้ โดยให้ระยะการยับยั้งต่อเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 อยู่ในช่วง 13.00 – 16.00 mm โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 14.33 ± 2.33 mm และให้ระยะการยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ในช่วง 12.00 – 14.00 mm โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 13.00 ± 1.00 mm แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (กลุ่มแบคทีเรีย) โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทจากราก ลำต้น และใบ ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (พวงมณี และกระปุกทองดี)

แอคติโนมัยซีทที่แยกได้	**ระยะการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mm)**			
	E. coli ATCC 25922	*S. aureus* ATCC 25923	*P. aeruginosa* ATCC 28753	*B. cereus* TISTR 2372
PM-R01	0.00 ± 0.00	13.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00	14.33 ± 2.33
KP- L01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
KP-S02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
KP-R01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-L01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-L02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ซึ่งแยกได้จากรากของทุเรียนพันธุ์พวงมณี สามารถยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* TISTR 2372 ได้ แสดงในภาพที่ 4.2 ดังนั้นจึงเลือกมาศึกษาในหัวข้อต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.2 แสดงการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 (Sa) *B. cereus* TISTR 2372 (Bc) *P. aeruginosa* ATCC 28753 (Pa) และ *E. coli* ATCC 25922 (Ec) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 บนอาหาร MHA หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแอคติโนมัยซีทอายุ 7 วัน (ข) และชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีท (ก)

4.3 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรีย

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มาเลี้ยงในอาหาร ISP-2 agar จำนวน 200 เพลท เพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการสกัดสารสกัดหยาบโดยใช้ตัวทำละลายเป็น Ethyl acetate เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจนหมด พบว่าได้ปริมาณสารสกัดหยาบหนัก 0.8767 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.0175 ลักษณะของสารสกัดหยาบมีสีน้ำตาลเป็นของเหลวหนืด แสดงในภาพที่ 4.3

ลิขสิทธิ์ของมหาวิ ูรำไพพรรณี

ภาพที่ 4.3 สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01

4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Broth microdilution

เมื่อได้สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 แล้ว นำมาละลายให้สมบูรณ์ด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางต่อด้วยน้ำและตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2 – 2,048 µg/ml และนำสารสกัดหยาบที่เจือจางมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 (หลังเติมเชื้อจะมีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเป็น 1 – 1,024 µg/ml) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในช่วง 1 – 1,024 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ได้ จึงระบุค่า MIC ได้ว่ามากกว่า 1,024 µg/ml (MIC > 1,024 µg/ml) ส่วนยา Gentamicin ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.0156 – 16.0000 µg/ml พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.0625 µg/ml และหลังจากถ่ายสารแขวนลอยของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 µl ลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) แล้วทำการ Streak plate พบว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml พบเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 มีจำนวนโคโลนีเจริญอยู่ในช่วง 2 - 3 โคโลนี เฉลี่ย 2.67 ± 0.58 โคโลนี และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มีจำนวนโคโลนีที่เจริญอยู่ในช่วง 15 - 23 โคโลนี เฉลี่ย 21.00 ± 4.36 โคโลนี เมื่อนำจำนวนโคโลนีมาคำนวณหาค่าร้อยละของการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบ และสามารถสรุปได้ว่าค่า MBC ของสารสกัดหยาบ Ethyl acetate ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml มีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 98.20 ($MBC_{98.20}$ = 1,024 µg/ml) แสดงในตารางที่ 4.4 ส่วนในสารแขวนลอยของยา Gentamicin พบว่าที่ความเข้มข้น 0.0625 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus*, และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ที่ร้อยละ 100

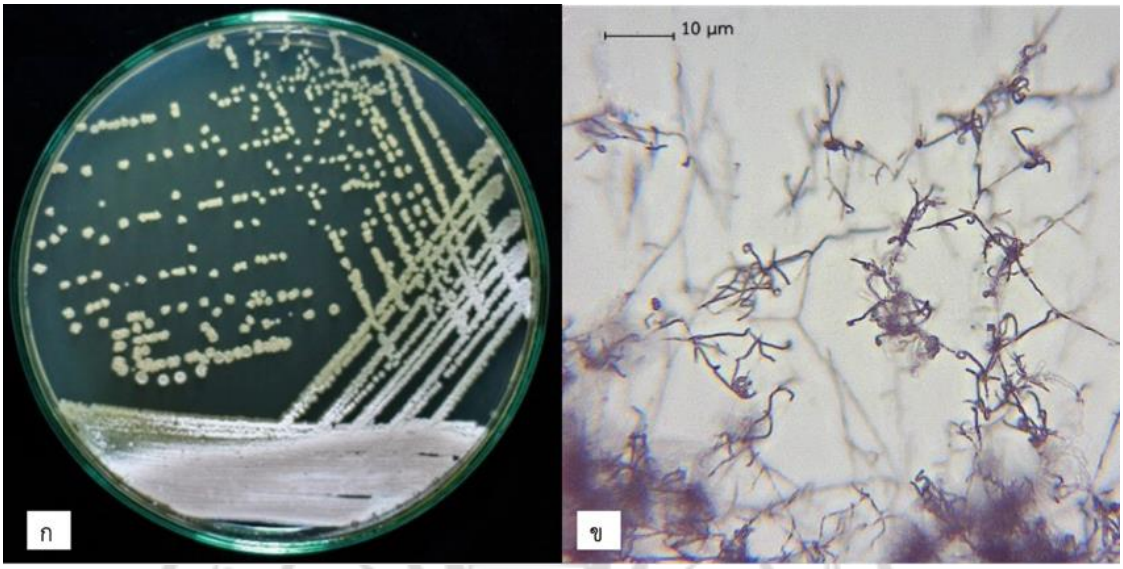
ตารางที่ 4.4 จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตและผลการคำนวณหาค่าร้อยละของความสามารถของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml ที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้

ซ้ำที่	จำนวนโคโลนี (ในปริมาตร 10 µl)					ร้อยละที่ฆ่าเชื้อได้จากการคำนวณจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD	
B. cereus TISTR 2372	2	3	3	2.67	0.58	99.73
S. aureus ATCC 25923	15	16	23	18.00	4.36	98.20

หมายเหตุ : ก่อนบ่ม เชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้นเป็น 1×10^5 CFU/ml และปริมาตรที่ใช้ Streak plate หลังการบ่มเชื้อเท่ากับ 10 µl

4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 โดยสังเกตลักษณะโคโลนีและวิธี Slide culture

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 พบว่าโคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลือง มีการสร้าง Substrate mycelium เป็นสีเหลืองและขาว และ Aerial mycelium เป็นสีเทา ดังภาพที่ 4.4 (ก)

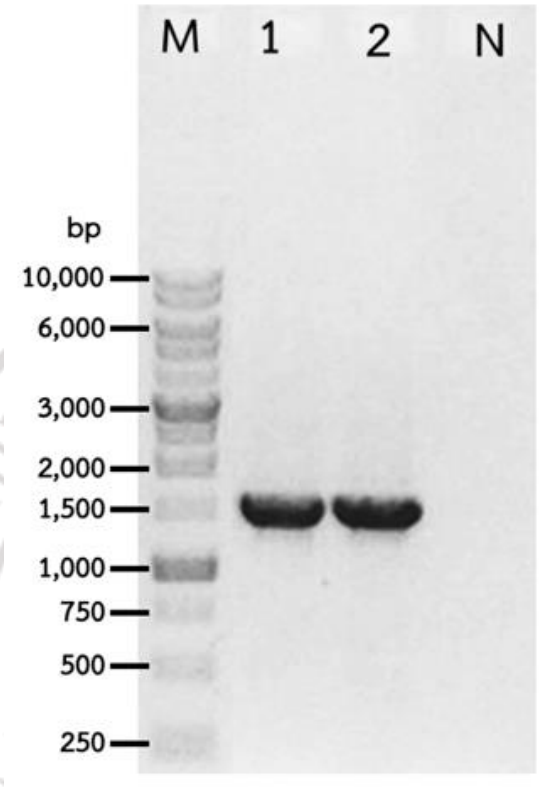


ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนี และการสร้างสปอร์ (ก) ลักษณะเส้นใยและสายสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ข) ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 บนอาหาร ISP-2 agar เชื้ออายุ 7 วัน

เมื่อสังเกตลักษณะเส้นใยของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นสายสปอร์เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels ที่เรียกว่า Verticillati คล้ายกับเชื้อในสกุล *Streptomyces* ดังภาพที่ 4.4 (ข)

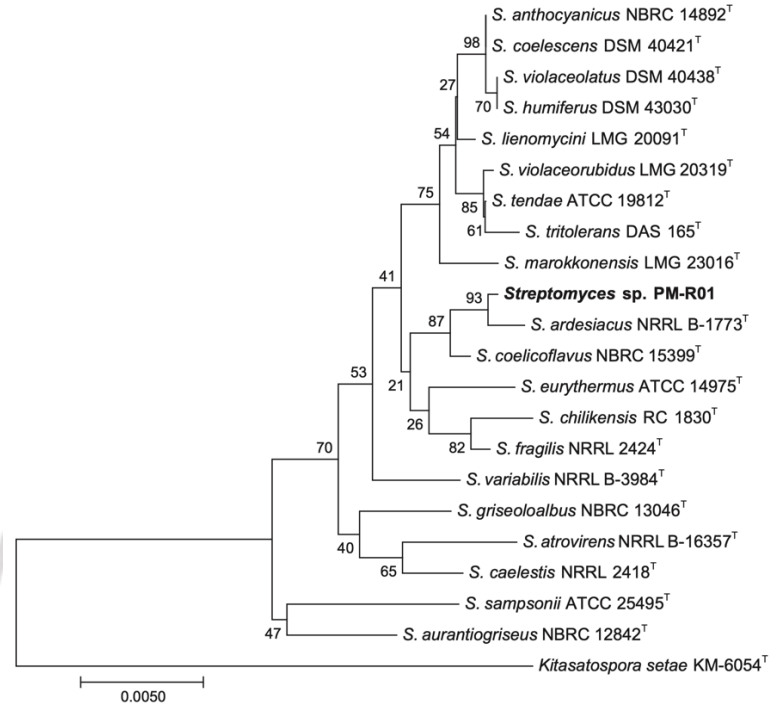
4.6 การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และสร้าง Phylogenetic tree

เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์พวงมณี ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียได้ คือ ไอโซเลท PM-R01 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยการทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker (ภาพที่ 4.5) และเมื่อส่งผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,522 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปฝากไว้ในฐานข้อมูล Genbank ได้ Accession number คือ LC381944 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC381944) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank และ EzBioCloud พบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* หรือ *S. ardesiacus* NRRL B-1773 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.65 และจากการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA และใช้เชื้อ *Kitasatospora seate* KM 6054 (Type strain) เป็น Outgroup ได้ผลดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.5 แสดง PCR product ของยีน 16S rRNA ในเชื้อไอโซเลท PM-R01 และ KP-R01 ขนาดประมาณ 1,500 bp; Lane 1 = เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01, Lane 2 = เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01, Lane M = 1 kb DNA Ladder และ Lane N = Negative control

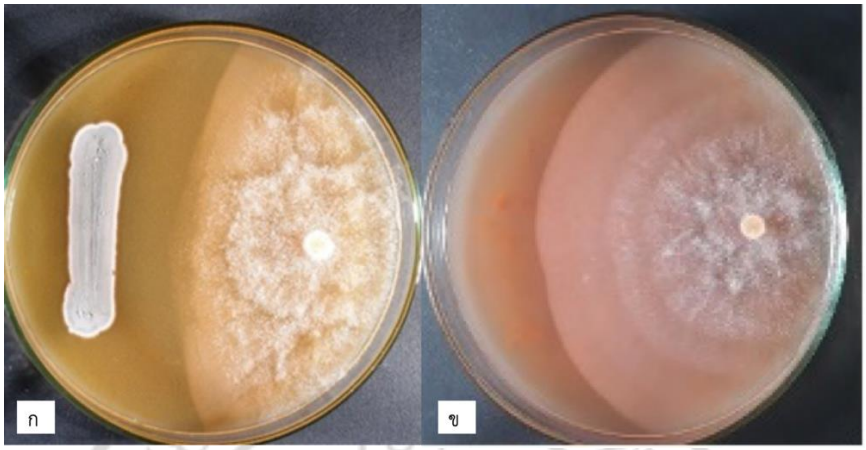
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.6 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 (1,522 nucleotides) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในสกุล *Streptomyces* ที่ใกล้เคียงไอโซเลท PM-R01 ที่สุด โดยใช้วิธี Neighbor–joining และใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราที่ก่อโรคในทุเรียนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมในจานเพาะเชื้อเดียวกัน (Dual culture) ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

เนื่องจากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Cross streak ให้ผลการยับยั้งไม่มากเท่าที่ควรผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มกับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มเชื้อราก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ คือ เชื้อราไฟทอปธอรา เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราที่ก่อโรคในทุเรียนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมในจานเพาะเชื้อเดียวกัน (Dual culture) พบว่ามีเชื้อหนึ่งไอโซเลท คือ KP-R01 ที่มีฤทธิ์ยับยังเชื้อราไฟทอปธอราได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราสายพันธุ์ R01, M01 และ L04 เป็น 58.9, 61.2 และ 66.7 ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราสายพันธุ์ L04 ได้ดีที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และในตารางที่ 4.5 โดยเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 แยกได้จากส่วนรากของทุเรียนพันธุ์กระปุกทองดี และใช้ในการทดลองหัวข้อต่อไป



ภาพที่ 4.7 การยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราสายพันธุ์ L04 ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 (ก) [SEP] เทียบกับชุดควบคุม (ข)

ตารางที่ 4.5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอราโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทจากราก ลำต้น และใบ ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองพวงมณี และกระปุกทองดี ด้วยวิธี Dual culture

แอคติโนมัยซีท ที่แยกได้	**ร้อยละการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอรา (*Phytophthora* sp.)**		
	L04	**M01**	**R01**
PM-R01	0.0	0.0	0.0
KP- L01	0.0	0.0	0.0
KP-S02	0.0	0.0	0.0
KP-R01	66.7	61.2	58.9
PM-L01	0.0	0.0	0.0
PM-S03	0.0	0.0	0.0
PM-S04	0.0	0.0	0.0
PM-S01	0.0	0.0	0.0
PM-S02	0.0	0.0	0.0
PM-L02	0.0	0.0	0.0

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.8 ผลการทดสอบการสร้างสารระเหยยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราด้วยกลไกการสร้างสารระเหยด้วยวิธีการประกบจานเพาะเชื้อทั้งของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทและเชื้อไฟทอปธอรา พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 สามารถยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์เท่ากับ 33.3 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

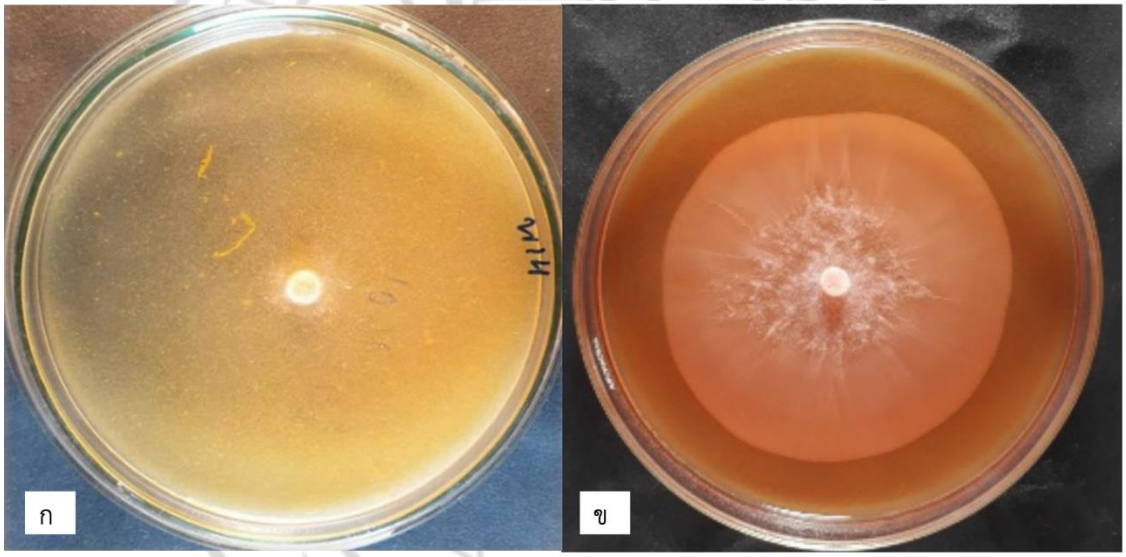
ตารางที่ 4.6 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอราโดยการสร้างสารระเหยของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยวิธีการประกบจานเพาะเชื้อ

แอคติโนมัยซีทที่แยกได้	**ร้อยละการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอรา (*Phytophthora* sp.)**		
	L04	**M01**	**R01**
PM-R01	0.0	0.0	0.0
KP- L01	0.0	0.0	0.0
KP-S02	0.0	0.0	0.0
KP-R01	33.3	33.3	33.3
PM-L01	0.0	0.0	0.0
PM-S03	0.0	0.0	0.0
PM-S04	0.0	0.0	0.0
PM-S01	0.0	0.0	0.0
PM-S02	0.0	0.0	0.0
PM-L02	0.0	0.0	0.0

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.9 ผลการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 โดยผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ CA พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ R01, M01 และ L04 เป็น 98.0, 98.0 และ 98.3 ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 4.8 (ก) และในตารางที่ 4.7 ในขณะที่สปอร์ที่ไม่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีทยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ได้เพียงร้อยละ 4.4 เท่านั้น แต่การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราด้วยสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่สร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวของเชื้อแอคติโนมัยซีทนี้ด้วยวิธีการแพร่ออกจากหลุมที่อยู่รอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้



ภาพที่ 4.8 การยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราสายพันธุ์ L04 ด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 (ก) เทียบกับชุดควบคุม (ข) อายุ 4 วัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

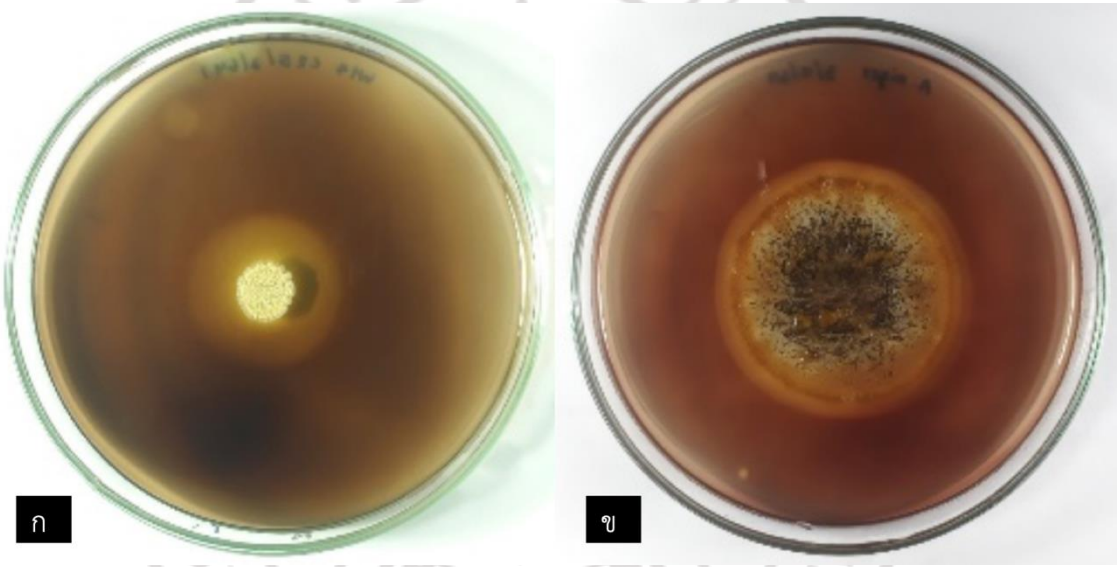
ตารางที่ 4.7 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอราด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท ที่แยกได้	ร้อยละการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอรา (*Phytophthora* sp.)		
	L04	M01	R01
PM-R01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
KP- L01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
KP-S02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
KP-R01	98.30 ± 0.47	98.00 ± 0.0	98.00 ± 0.0
PM-L01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-S02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PM-L02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.10 ผลการผลิตเอนไซม์ Cellulase ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ไฟทอปธอรา

คุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ Cellulase ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 โดยสังเกตกิจกรรมการย่อยสาร Carboxy methyl cellulose ในอาหาร CMC พบว่ามีบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทนี้ซึ่งมีความกว้างของระยะจากขอบโคโลนีโดยรอบเฉลี่ยเท่ากับ 4 ± 0.06 มิลลิเมตร แสดงในภาพที่ 4.6 (ก)

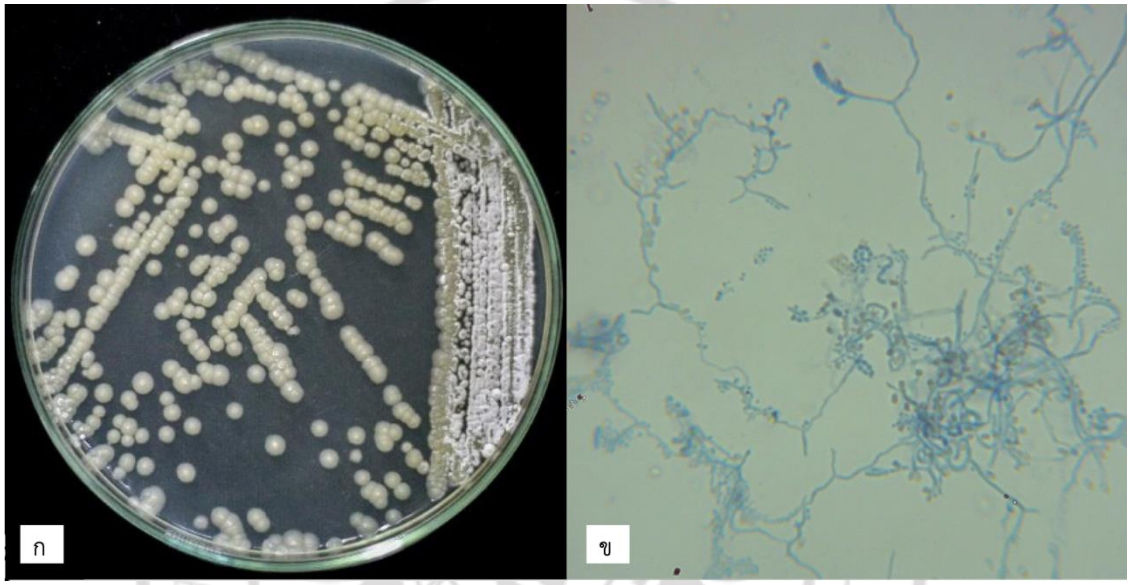


ภาพที่ 4.9 การผลิตเอนไซม์ Cellulase ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 (ก) และเชื้อรา *Aspergillus niger* (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar อายุ 5 วัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 โดยสังเกตลักษณะโคโลนีและวิธี Slide culture

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 พบว่าโคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลืองอ่อน มีการสร้าง Substrate mycelium เป็นสีเหลืองอ่อน และ Aerial mycelium เป็นสีขาว ดังภาพที่ 4.10 (ก)



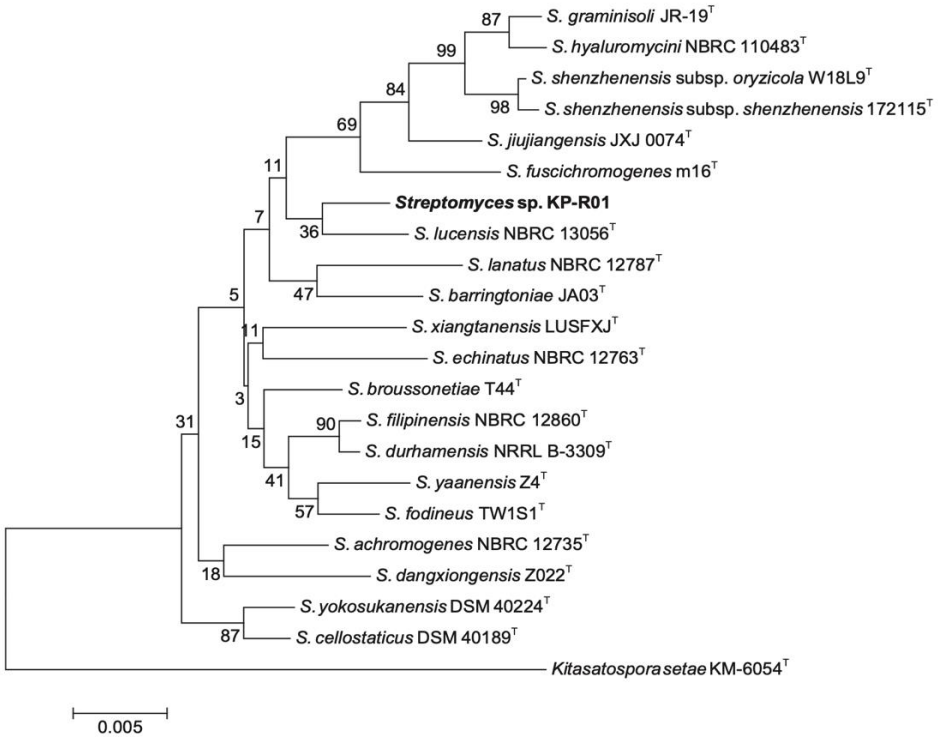
ภาพที่ 4.10 ลักษณะโคโลนี และการสร้างสปอร์ (ก) ลักษณะเส้นใยและสายสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ข) ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 บนอาหาร ISP-2 agar เชื้ออายุ 7 วัน

เมื่อสังเกตลักษณะเส้นใยของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติมัยซีทไอโซเลท KP-R01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีเส้นใยหงิกงอ เส้นสายสปอร์เรียงตัวเป็นสายที่มีส่วนปลายม้วนงอ คล้ายกับเชื้อในสกุล *Streptomyces* ดังภาพที่ 4.10 (ข)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.6 การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์กระปุกทองดี ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอราได้ คือ ไอโซเลท KP-R01 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยการทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker (ภาพที่ 4.5) และเมื่อส่งผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,461 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank และ EzBioCloud พบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces lucensis* JCM 4490 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.20 และจากการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA ใช้เชื้อ *Kitasatospora seate* KM 6054 (Type strain) เป็น Outgroup ได้ผลดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 (1,461 nucleotides) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในสกุล *Streptomyces* ที่ใกล้เคียงไอโซเลท KP-R01 ที่สุด โดยใช้วิธี Neighbor–joining และใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
G+C	กัวนีน+ไวโตซีน
℃	องศาเซลเซียล
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µm	ไมโครเมตร
ml	มิลลิลิตร
cm	เซนติเมตร
mm	มิลลิเมตร
nm	นาโนเมตร
CFU	โคโลนีต่อยูนิต
µg	ไมโครกรัม
g	กรัม

คำย่อ

et.al	และคนอื่น ๆ (and others)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี