

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

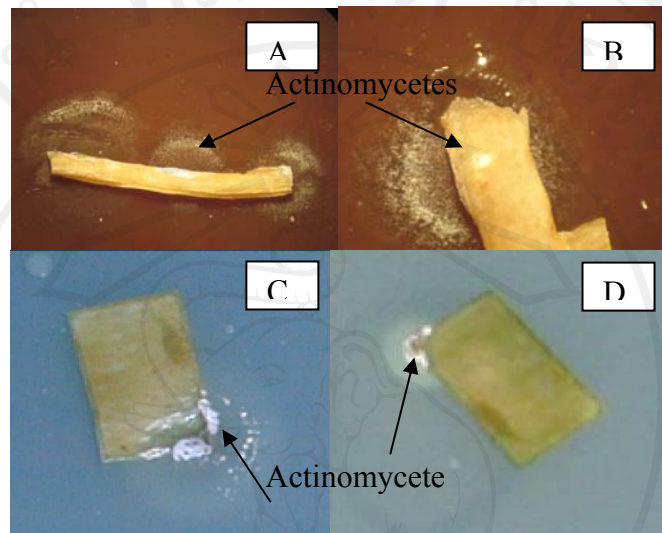
4.1 การแยกและจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

4.1.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

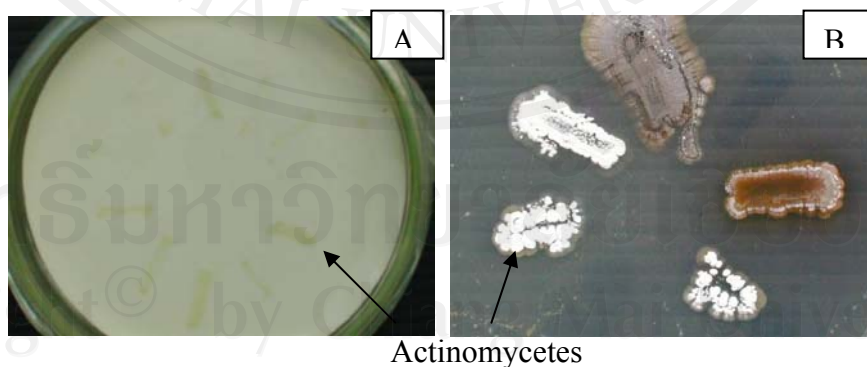
จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในลำต้นน้ำฝิ่งในพื้นที่ที่กำลังปรับเปลี่ยนเป็นระบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 3 พื้นที่ และทำการฆ่าเชื้อที่ผิวและแยกเชื้อโดยดัดแปลงจากวิธีของ Shimizu (2000) และบ่มชิ้นส่วนของพืช ในอาหาร IMA-2 และ Humic acid vitamin agar ที่ผสมสาร antibiotic ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช (ภาพที่ 10) และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้แผ่นกรองเซลลูโลส (ภาพที่ 11) สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 101 ไอโซเลท ดังนี้ คือ พื้นที่ศูนย์เกษตรยั่งยืน อำเภอ ฝาง พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจากใบ 4 ไอโซเลท กิ่ง 9 ไอโซเลท และราก 16 ไอโซเลท รวม 29 ไอโซเลท ในพื้นที่คุณสุเทพ พบเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ จากใบ 7 ไอโซเลท กิ่ง 6 ไอโซเลท ราก 21 ไอโซเลท รวม 33 ไอโซเลท และสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในพื้นที่คุณไมตรี ได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท จากใบ กิ่ง และราก จำนวน 14, 19 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับ Shimizu และ คณะ (2000) ที่ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากต้น Rhododendron ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท คือจากใบ กิ่ง และราก จำนวน 1, 5 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ Janete และคณะ (1999) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากข้าวโพดได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลท พบจากใบ 31 ไอโซเลท และจากราก 22 ไอโซเลท เช่นเดียวกับ ปิยะธิดา (2549) พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากใบมากที่สุด 111 ไอโซเลท จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 179 ไอโซเลท ส่วนของลำต้นและหัวพบ 21 ไอโซเลท และ 47 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าจำนวนไอโซเลทของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละชิ้นส่วนของพืชนั้นจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้ในการทดลอง และความชำนาญการของผู้ทดลอง อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น ขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวพืช ซึ่งผู้ที่ทำการทดลองต้องแน่ใจว่า ได้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวพืชได้หมดเพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการเจริญปกคลุมผิวพืช ทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เราต้องการไม่สามารถเจริญออกมาได้ (Shimizu *et al.*, 2000) นอกจากนี้ชนิดของพืชและแหล่งของพื้นที่ปลูกพืชก็มีผลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีทเช่นเดียวกัน (Sardi *et al.*, 1992) และนอกจากนี้

สภาพแวดล้อม ภูมิอากาศ อายุของพืช ระยะการเจริญเติบโต ชนิดของดินที่ปลูก และ ฤดูกาล ก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อแอกติโนมัยซีทเช่นเดียวกัน (วันวิสาข์, 2546)

โดยให้ชื่อไอโซเลตดังนี้ TG = Tangerine; s = sustainable farming; L = leave; S = stem; R = root; 01-01 = สวนที่ 1 ตัวอย่างที่ 1



ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากชิ้นส่วนของสัสมายน้ำผึ้ง
 A, B : เชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากรากสัสมายน้ำผึ้ง
 C, D : เชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากใบสัสมายน้ำผึ้ง



ภาพที่ 11 วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้แผ่นเซลลูโลส
 A : การจีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ลงบนอาหาร IMA-2 ที่ผิวหน้าของอาหารวางด้วยแผ่นเซลลูโลส
 B : ลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญลอดผ่านแผ่นกรองเซลลูโลส

ตารางที่ 3 จำนวนไอโซเลทแอกติโนมัยซีทเอนไฟท์ที่เจริญจากชิ้นส่วนต่างๆ ของสั้มสายน้ำผึ้ง ในแต่ละพื้นที่

พื้นที่	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้			รวม
	ใบ	กิ่ง	ราก	
ศูนย์เกษตรยั่งยืน	4	9	16	29
คุณสุเทพ	7	6	21	33
คุณไมตรี	14	19	6	39
รวม	25	33	43	101

4.1.2 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์โดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ทั้งหมด 101 ไอโซเลท โดยการนำเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast-malt extract agar (ISP-2), oatmeal agar (ISP-3) และ starch agar with mineral salts (ISP-4) โดยบันทึกลักษณะสีของ aerial mycelium, การแพร่ของรงควัตถุ (อ้างอิงหมายเลขสีจาก Manual of color name, 1987) และ ลักษณะเส้นสายของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.1.2.1 ลักษณะสีของ aerial mycelium

จากการตรวจสอบลักษณะสีของ aerial mycelium ของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนไฟท์ที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลในอาหาร ISP3 เป็นหลัก (เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารชนิดนี้) พบว่า สีของ aerial mycelium และ spore มีความหลากหลายของสีมาก และสามารถแบ่งสีออกได้ 8 กลุ่มสี คือ gray, white, yellow, blue, beige, olive, black, orange พบ 62, 28, 2, 1, 1, 1, 3, 1 และไม่สามารถระบุสีได้ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ ในกลุ่มสี gray มีจำนวนไอโซเลทและความหลากหลายมากที่สุด แบ่งระดับความเข้มของสีได้ 3 ระดับ คือ light gray 10 ไอโซเลท, gray 45 ไอโซเลท และ dark gray 7 ไอโซเลท นอกจากนี้ในกลุ่มสี white มีความหลากหลายเช่นเดียวกันแบ่งได้ 4 ระดับ คือ white 22 ไอโซเลท, grayish white 2 ไอโซเลท, yellowish white 3 ไอโซเลท และ beige white 1 ไอโซเลท ในกลุ่มสี yellow มี 2 ระดับสี คือ pale greenish yellow และ grayish yellow อย่างละ 1 ไอโซเลท สำหรับในกลุ่มสี blue, beige,

olive, black, orange มีเพียงระดับสีเดียว (ตารางที่ 4) เช่นเดียวกับ Cao และ คณะ (2005) ที่แยกเชื้อแอสโคไมซีตจากไฟท์มาจากรากของกล้วย และเชื้อ *Streptomyces* จากรากมะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004) ต่างก็พบว่าสีของเส้นใยเหนือผิวอาหารอยู่ในกลุ่มสี gray มากที่สุดเหมือนกันคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ลักษณะสี aerial mycelium และ spore ของเชื้อแอสโคไมซีตที่แยกได้

color of aerial mycelium/spore	level of color		No. of isolate	% of isolate
	color	isolate		
1. gray	a. light gray (397-405)	10	62	61.39
	b. gray (406-414)	45		
	c. dark gray (415-417)	7		
2. white	a. white (388)	22	28	27.72
	b. grayish white (390)	2		
	c. yellowish white (392)	3		
	d. beige white (392)	1		
3. yellow	a. pale greenish yellow (129)	1	2	1.98
	b. grayish yellow (157)	1		
4. blue	a. grayish blue (320)	1	1	0.99
5. beige	a. pale beige (85)	1	1	0.99
6. olive	a. grayish olive (168)	1	1	0.99
7. black	a. bluish black (431)	3	3	2.97
8. orange	a. soft orange (83)	1	1	0.99
9. unidentified			2	1.98

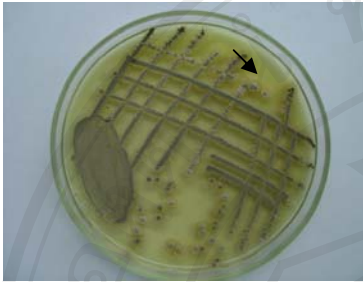
อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name (1987)

4.1.2.2 การผลิตรงควัตถุ (diffusible pigment)

ศึกษาการแพร่ของรงควัตถุ พบว่าเชื้อแอสโคไมซีตเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 101 ไอโซเลต สามารถสร้างรงควัตถุได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต (26.73%) สร้างในอาหาร ISP-2 9 ไอโซเลต, ISP-3 19 ไอโซเลต และ ISP-4 6 ไอโซเลต เชื้อที่สร้างรงควัตถุได้นั้น ส่วนมากจะแยกได้มาจากชิ้นส่วนของราก (85.19%) และเมื่อหยดกรด HCl และด่าง NaOH ที่ความเข้มข้น 1 N เพื่อดูการเปลี่ยนสีของรงควัตถุ พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสีของรงควัตถุมากที่สุด เมื่อหยดกรด HCl ลงในเชื้อที่เจริญบนอาหาร ISP-3 ส่วนเชื้อที่เจริญบน ISP-2 และ ISP-4 ไม่มีการ

เปลี่ยนแปลงสีของรงควัตถุ และเมื่อหยดต่าง NaOH ลงไป จะเกิดการเปลี่ยนสีรงควัตถุและทำให้
รงควัตถุหายไป (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 12)

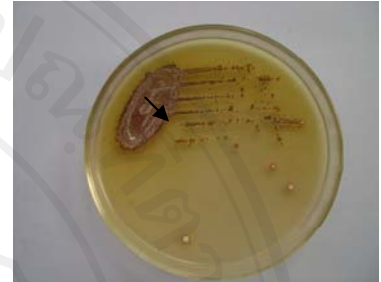
การสร้างรงควัตถุ



TGR-01-07 (ISP3)

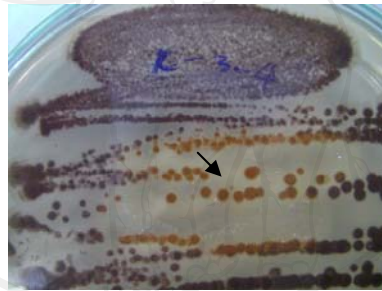


TGR-01-17 (ISP3)



TGR-02-15 (ISP3)

การเปลี่ยนแปลงสีของรงควัตถุเมื่อหยดกรด HCl 1 N

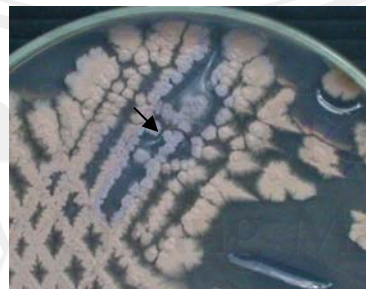


TGR-03-04 (ISP4)

การเปลี่ยนแปลงสีของรงควัตถุเมื่อหยดต่าง NaOH 1 N



TGR-01-07 (ISP4)



TGR-03-04 (ISP4)



TGR-01-14 (ISP4)

ภาพที่ 12 การสร้างรงควัตถุ และการเปลี่ยนแปลงสีของรงควัตถุเมื่อหยดกรด HCl และต่าง NaOH

ตารางที่ 5 การผลิตและการแพร่ของรงควัตถุของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ ในอาหาร ISP-2, ISP-3, ISP-4

พื้นที่	ชั้นส่วนของส้ม	ไอโซเลท	สีของรงควัตถุ			การเปลี่ยนสีของรงควัตถุเมื่อหยด HCl 1 N			การเปลี่ยนสีของรงควัตถุเมื่อหยด NaOH 1 N			
			ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-2	ISP-3	ISP-4	
1. ศูนย์เกษตรยั่งยืน	ใบ	TGsL-01-04	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	238	
	กิ่ง	TGsS-01-09	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	238	
	ราก	TGsR-01-01	146	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-01-04	143	135	134	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	สีหายไป	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-01-06	ไม่สร้าง	135	138	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	สีหายไป	สีหายไป
		TGsR-01-07	143	129	138	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	262	สีหายไป
		TGsR-01-09	ไม่สร้าง	18	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	75	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-01-10	ไม่สร้าง	18	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	75	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-01-14	ไม่สร้าง	109	400	ไม่เปลี่ยน	30	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	349
TGsR-01-17	ไม่สร้าง	6	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	สีหายไป	ไม่เปลี่ยน		
2. คุณสุเทพ	ใบ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	กิ่ง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ราก	TGsR-02-02	ไม่สร้าง	129	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-03	420	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-04	ไม่สร้าง	133	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-05	ไม่สร้าง	133	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-08	ไม่สร้าง	129	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-09	ไม่สร้าง	133	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	314	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-10	ไม่สร้าง	128	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-01-11	ไม่สร้าง	129	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	5	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	301	ไม่เปลี่ยน

ตารางที่ 5 การผลิตและการแพร่ของรงควัตถุของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ ในอาหาร ISP2, ISP3, ISP4 (ต่อ)

พื้นที่	ชั้นส่วนของสั้ม	ไอโซเลข	สีของรงควัตถุ			การเปลี่ยนสีของรงควัตถุเมื่อหยด HCl 1 N			การเปลี่ยนสีของรงควัตถุเมื่อหยด NaOH 1 N		
			ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-2	ISP-3	ISP-4
2. คุณสุเทพ	ราก	TGsR-02-15	ไม่สร้าง	133	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	313	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-19	ไม่สร้าง	133	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	314	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-21	ไม่สร้าง	128	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	372	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-02-22	ไม่สร้าง	131	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	392	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	314	ไม่เปลี่ยน
3. คุณไมตรี	ใบ	TGsL-03-14	161	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
	กิ่ง	TGsS-03-17	152	ไม่สร้าง	130	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	348
	ราก	TGsR-03-01	161	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-03-02	161	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน
		TGsR-03-04	97	24	85	ไม่เปลี่ยน	7	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	277	269
สรุปผล	ใบ	2	1	0	0	0	0	0	0	1	
สร้างรงควัตถุ และเปลี่ยนสีรงควัตถุ	กิ่ง	2	1	0	1	0	0	0	0	2	
	ราก	23	7	19	5	0	13	0	17	5	
	รวม	27	9	19	6	0	13	0	17	8	

อ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name (1987)

5; pale pink, 6; pale yellowish pink, 7; pale yellowish pink, 18; deep purplish pink, 30; grayish pink, 75; strong orange, 97; yellowish brown, 129; pale greenish yellow, 133; light yellow, 134; light yellow, 135; light greenish yellow, 138; bright yellow, 143; strong reddish yellow, 146; soft reddish yellow, 161; gold, 238; grayish green, 269; pale blue, 301; deep blue, 313; dark greenish blue, 314; dark blue, 349; light purple, 392; beige white, 400; beige gray, 420; dark olive gray

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2.3 ลักษณะของเส้นสายสปอร์และการจัดกลุ่มในระดับจีโนม

การศึกษาลักษณะเส้นสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนเอนโดไฟท์ลงบนอาหาร ISP-2, ISP-3 และ ISP-4 แล้วตรวจสอบลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มีลักษณะสปอร์แบบ Spira type จำนวน 66 ไอโซเลท และพบสปอร์แบบ Verticillati, Rectiflexibiles และ Retinaculiaperti จำนวน 5, 3, 2 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งเชื้อที่มีลักษณะของสปอร์ดังกล่าวนี้จะจัดอยู่ในกลุ่มจีโนม *Streptomyces* พบสปอร์แบบ Fragmenting branched 9 ไอโซเลท ลักษณะสปอร์แบบนี้สามารถจำแนกได้ 3 จีโนม คือ *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis* (ใช้ลักษณะของโคโลนีและทางเคมีประกอบในการจัดจำแนก) นอกจากนี้ยังพบสปอร์แบบ Spirillospora 5 ไอโซเลท, Microbispora 4 ไอโซเลท และ Micromonospora 8 ไอโซเลท ลักษณะของสปอร์แบบที่กล่าวมาข้างต้นนี้จัดอยู่ในจีโนม *Spirillospora*, *Microbispora* และ *Micromonospora* และยังพบเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่ไม่สามารถตรวจสอบการสร้างสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ได้นั้นอาจเกิดจากสปอร์มีขนาดเล็กเกินไป ไม่สามารถเห็นสปอร์ได้อย่างชัดเจนมีทั้งหมด 9 ไอโซเลท จัดให้อยู่ในกลุ่ม unidentified และคาดว่าจะทำการทดสอบต่อไป

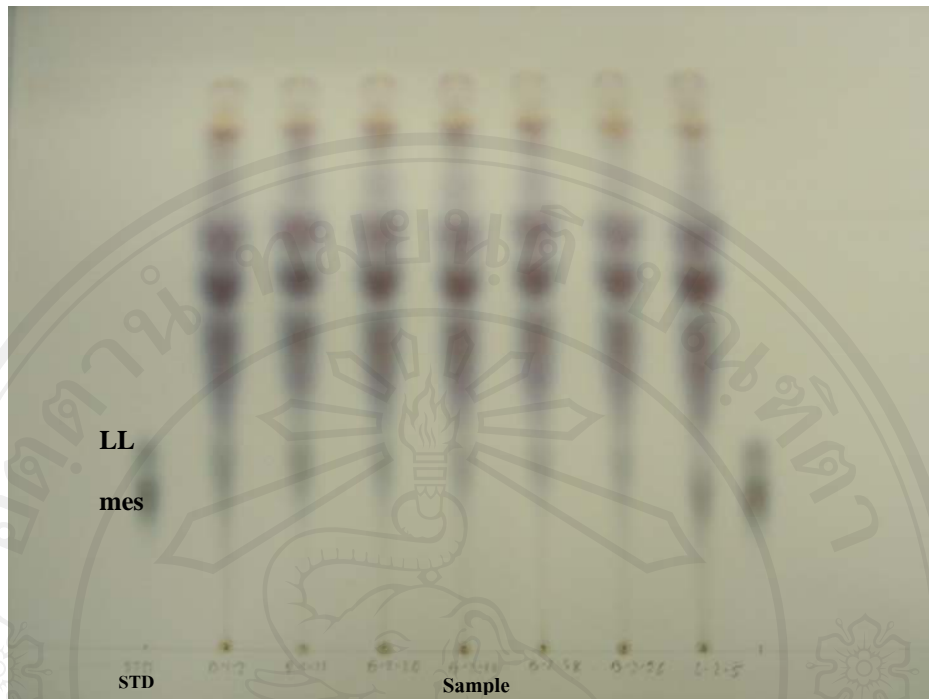
ตารางที่ 6 ลักษณะของเส้นสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

spore chain morphology	isolate				Genus
	leaves	branches	root	total	
Spira (Sp)	19	29	8	56	<i>Streptomyces</i> sp.
Verticillati (Vt)	-	-	5	5	
Rectiflexibiles (Rf)	-	-	3	3	
Retinaculiaperti (Ra)	-	-	2	2	
Fragmenting branched (F)	4	-	5	9	<i>Nocardia</i> sp.
					<i>Nocardioides</i> sp.
					<i>Nocardiopsis</i> sp.
Spirillospora (Sr)	-	2	3	5	<i>Spirillospora</i> sp.
Microbispora (Mb)	-	-	4	4	<i>Microbispora</i> sp.
Micromonospora (Mm)	-	-	8	8	<i>Micromonospora</i> sp.
Unidentified	-	2	7	9	-

ได้ทำการแบ่งกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากสัมพันธู์สายน้ำผึ้งทั้งหมด 101 ไอโซเลท โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ในอาหาร ISP-3 (เนื่องจากเชื้อทุกตัวสามารถเจริญบนอาหารนี้ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่นๆ) คือ ลักษณะสีเส้นใยเนื้อผิวอาหาร การแพร่ของรงควัตถุ และลักษณะของสปอร์ สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 56 กลุ่มจาก 101 ไอโซเลท (ภาคผนวก ก) วิธีนี้จะเป็นที่ยอมรับ สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* และเลือกตัวแทนเชื้อในแต่ละกลุ่มทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (เนื่องจากมีจำนวนไอโซเลทที่แยกได้มีจำนวนมากจึงไม่สามารถทำทุกไอโซเลทได้ เพราะต้องใช้ระยะเวลาในการทำการทดลองและปริมาณสารที่มากผู้ทำการทดลองไม่สามารถทำได้ทั้งหมด)

4.1.2.4 การวิเคราะห์ **Diaminopimelic acid (DAP)** ในผนังเซลล์

ทำการเลือกตัวแทนของเชื้อทั้งหมด 56 ไอโซเลท มาทำการศึกษาหา Diaminopimelic acid (DAP) ภายในผนังเซลล์ โดยใช้วิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิคโครโมโตกราฟี (Thin Layer Chromatography (TLC)) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน LL and meso – A₂pm 0.01 M พบว่าเชื้อที่มีลักษณะสปอร์แบบ แบบ Verticillati, Rectiflexibiles และ Retinaculiaperti จัดอยู่ในกลุ่มจีส *Streptomyces* สร้าง DAP ชนิด LL-DAP ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับข้อมูลอ้างอิง (Lechevalier และ Lechevalier, 1970) ตรงตามลักษณะของ DAP ของเชื้อ ในจีส *Streptomyces* ที่ได้อ้างอิงไว้ และลักษณะสปอร์แบบ Fragmenting branched ไอโซเลท TGsR-01-16 สร้าง DAP ชนิดเดียวกับจีส *Streptomyces* และลักษณะสปอร์แบบ Fragmenting branched, Spirillospora, Microbispora และ Micromonospora สร้าง DAP ชนิด meso-DAP และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับข้อมูลอ้างอิง (Lechevalier และ Lechevalier, 1970) ซึ่งจะตรงตามลักษณะของจีส *Nocardia, Nocardioides, Nocardiosis Spirillospora, Microbispora* และ *Micromonospora* (ตารางที่ 7) และยังมีอีกบางกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุชนิดของสปอร์ได้นั้น จะมีลักษณะของ DAP ดังนี้คือ LL-DAP และ meso-DAP จึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

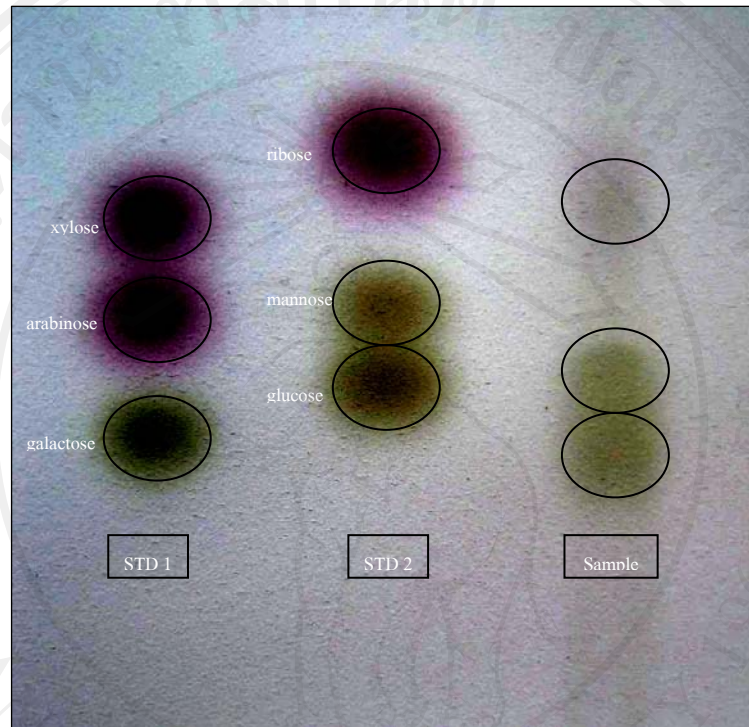


ภาพที่ 13 สารประกอบของน้ำตาลในผนังเซลล์ Diaminopimelic acid ของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิค Thin Layer Chromatography

4.1.2.5 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในผนังเซลล์

นำเชื้อทั้งหมด 56 ไอโซเลท (เหมือนกับการวิเคราะห์หา DAP) มาศึกษาหาสารประกอบของน้ำตาลในผนังเซลล์ (Whole cell hydrolysate) โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิคโครโมโตกราฟี Thin Layer Chromatography (TLC) และใช้สารละลายมาตรฐาน 2 ชุด ดังนี้คือ ชุดที่ 1 ประกอบไปด้วยน้ำตาล xylose, arabinose และ galactose ชุดที่ 2 ประกอบไปด้วยน้ำตาล mannose, glucose และ ribose ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ารูปแบบของ whole-cell sugar pattern จะมีความแตกต่างกันในแต่ไป ลักษณะสปอร์แบบ Spira, Verticillati, Rectiflexibiles จีโนม *Streptomyces* และสปอร์แบบ Fragmenting branched (TGsR-01-16) จีโนม *Nocardioides* พบ whole-cell sugar pattern แบบ N.C. (มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน) ลักษณะสปอร์แบบ spirillospora จีโนม *Spirillospora* และสปอร์แบบ microbispora จีโนม *Microbispora* พบ whole-cell sugar pattern แบบ B (madurose, no arabinose or xylose) สปอร์แบบ Fragmenting branched จีโนม *Nocardia* พบ whole-cell sugar pattern แบบ A (galactose, arabinose) สปอร์แบบ Fragmenting branched จีโนม *Nocardiosis* พบ whole-cell sugar pattern แบบ C (none) สปอร์แบบ microbispora จีโนม *Micromonospora* พบ whole-cell sugar pattern แบบ D (xylose, arabinose) และในกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนก

ได้ (unidentified) องค์ประกอบของน้ำตาลในเซลล์ คือ galactose, xylose, glucose, mannose และ ribose (ตารางที่ 7) (ภาพที่ 14) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น อ้างอิงจาก Lechevalier และ Lechevalier (1970), Hasegawa *et al.*, (1983)



ภาพที่ 14 สารประกอบของน้ำตาลในผนังเซลล์ (Whole cell hydrolysate) ของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิค Thin Layer Chromatography

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากชนิดของ DAP และ Whole cell sugar pattern

isolate	spore chain	DAP	Whole cell hydrolysate	Genus		
TGsS-01-01	spira	LL-DAP	N.C.	<i>Streptomyces</i> sp.		
TGsS-03-02		LL-DAP				
TGsS-01-06		LL-DAP				
TGsL-01-01		LL-DAP				
TGsS-01-09		LL-DAP				
TGsL-02-01		LL-DAP				
TGsR-01-01		LL-DAP				
TGsS-02-02		LL-DAP				
TGsS-02-04		LL-DAP				
TGsL-02-02		LL-DAP				
TGsS-03-07		LL-DAP				
TGsS-03-18		LL-DAP				
TGsS-03-15		LL-DAP				
TGsS-03-16		LL-DAP				
TGsS-03-17		LL-DAP				
TGsL-03-01		LL-DAP				
TGsL-03-05		LL-DAP				
TGsL-03-14		LL-DAP				
TGsR-03-01		LL-DAP				
TGsR-03-02		LL-DAP				
TGsR-01-15	verticillati	LL-DAP	A	<i>Nocardia</i> sp.		
TGsR-01-09		LL-DAP				
TGsR-01-10		LL-DAP				
TGsR-01-17		LL-DAP				
TGsR-01-04	rectiflexibiles	LL-DAP				
TGsR-01-07		LL-DAP				
TGsR-01-12	fragmenting branched	meso-DAP			C	<i>Nocardiopsis</i> sp.
TGsR-02-09		meso-DAP				
TGsR-02-15		meso-DAP				
TGsR-02-22		meso-DAP				
TGsR-01-16		LL-DAP				
TGsL-02-04	meso-DAP	meso-DAP			C	<i>Nocardiopsis</i> sp.
TGsL-02-05						

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มแอสโคดีโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากชนิดของ DAP และ Whole cell sugar pattern (ต่อ)

isolate	spore chain	DAP	Sugar Whole cell	Genus
TGsR-01-05	spirillospora	meso-DAP	B	<i>Spirillospora</i> sp.
TGsR-01-11		meso-DAP		
TGsR-01-14		meso-DAP		
TGsS-03-11		meso-DAP		
TGsR-01-08	microbispora	meso-DAP	B	<i>Microbispora</i> sp.
TGsR-02-05		meso-DAP		
TGsR-02-11		meso-DAP		
TGsR-02-01	micromonospora	meso-DAP	D	<i>Micromonospora</i> sp.
TGsR-02-03		meso-DAP		
TGsR-02-07		meso-DAP		
TGsR-02-17		meso-DAP		
TGsR-02-18		meso-DAP		
TGsR-02-20		meso-DAP		
TGsR-02-21		meso-DAP		
TGsR-03-06		meso-DAP		
TGsR-02-02	unidentified	meso-DAP	gal, xyl, glu, man, rib	-
TGsR-02-06		LL-DAP		
TGsR-02-08		meso-DAP		
TGsR-02-10		meso-DAP		
TGsR-02-12		LL-DAP		
TGsR-02-16		meso-DAP		
TGsS-03-04		-		
TGsS-03-09		LL-DAP		
TGsR-03-04		LL-DAP		

อ้างอิงจาก Lechevalier *et al.*, 1970

N.C. = No characteristic sugar pattern

A = galactose, arabinose

B = madurose, no arabinose or xylose

C = none

D = xylose, arabinose

จากการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากสัสมพันธุ์สายน้ำผึ้ง ทั้งหมด 101 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้เป็น 7 จินัส ได้แก่ *Streptomyces* (65.35), *Spirillospora* (4.95), *Nocardia* (3.96), *Nocardioides* (0.99), *Nocardiopsis* (43.96), *Microbispora* (3.96), *Micromonospora* (7.92) และ unidentified (8.91) (ตารางที่ 8) จากการแยกเชื้อดังกล่าวจะสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (Sardi *et al.*, 1992; Takao *et al.*, 1995; Coombs *et al.*, 2003; Okazaki *et al.*, 2003) ที่ได้แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากพืชทั่วไป พบว่าส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* และสามารถพบเชื้อในกลุ่ม *Non-Streptomyces* เช่น *Microbispora*, *Nocardia*, *Micromonospora* เป็นต้น

ตารางที่ 8 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์

Genus	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้			
	1. ศูนย์เกษตรยั่งยืน	2. คุณสุเทพ	3. คุณไมตรี	รวม (%)
<i>Streptomyces</i>	23	10	33	65.35
<i>Spirillospora</i>	3	-	2	4.95
<i>Nocardia</i>	1	3	-	3.96
<i>Nocardioides</i>	1	-	-	0.99
<i>Nocardiopsis</i>	-	4	-	3.96
<i>Microbispora</i>	1	3	-	3.96
<i>Micromonospora</i>	-	7	1	7.92
Unidentified	-	6	3	8.91
รวม	29	33	39	101

4.1.3 ลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ในแต่ละจินัสที่แยกได้จากสัสม

4.1.3.1 จินัส *Streptomyces*

จากการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากสัสม พบเชื้อที่อยู่ในจินัส *Streptomyces* ทั้งหมด 65.37 เปอร์เซ็นต์ แยกได้จากใบ 24 ไอโซเลท กิ่ง 31 ไอโซเลท และจากราก 14 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีท มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) โค้งนูน (convex) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย (undulate) และเป็นเส้นสายยาว (filamentous) สร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium สปอร์มีลักษณะเป็นสายเกลียว (spira type) 63 ไอโซเลท และสายโซ่ของสปอร์เป็นแบบเส้นตรง (rectiflexibles type) 3 ไอโซเลท สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีเทา สีขาว สีฟ้า และ สีเหลือง สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สีชมพู 3 ไอโซเลท และสีเหลือง 3 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) มีผนังชนิด LL-Diaminopimelic acid (LL-DAP) และพบองค์ประกอบของน้ำตาลในเซลล์ แบบ N.C. (No characteristic sugar pattern) (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

4.1.3.2 จีโนส *Spirillospora*

เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากส้ม ที่จัดอยู่ในจีโนส *Spirillospora* มี 4.95 เปอร์เซ็นต์ แยกได้จากกิ่ง 2 ไอโซเลท และจากราก 3 ไอโซเลท รูปร่างโคโลนีเป็นแบบไม่แน่นอน และแบนราบติดกับอาหาร (flat) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย (undulate) สร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium มีลักษณะสปอร์เป็นแบบ spirillospora สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีเทา 1 ไอโซเลท สีขาว 3 ไอโซเลท และสีโอโรส 1 ไอโซเลท สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สีน้ำตาล 1 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP และ พบ whole-cell sugar pattern B (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

4.1.3.3 จีโนส *Nocardia*

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากส้ม พบเชื้อที่อยู่ในจีโนส *Nocardia* ทั้งหมด 3.96 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากรากทั้งหมด ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท ประกอบด้วยเส้นใยพันกันแน่น และมีรูปร่างไม่แน่นอน และผิวหน้าขรุขระ (rough) มีขอบโคโลนีแบบเส้นสายยาวไม่แน่นอน หรือ เป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก (lobate) และบางกลุ่มมีขอบโคโลนีแบบขยับ (wrinkled) สร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium มีการสร้างสปอร์แบบ Fragmenting branched สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีขาว 3 ไอโซเลท สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สีเหลือง 3 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP พบ whole-cell sugar pattern A (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

4.1.3.4 จีโนส *Nocardioides*

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากส้ม พบเชื้อที่อยู่ในจีโนส *Nocardioides* ทั้งหมด 0.99 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากราก ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท มีรูปร่างโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) และผิวหน้าขรุขระ (rough) มีขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก (lobate) และสามารถสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium มีการสร้างสปอร์แบบ Fragmenting branched สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีขาว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด LL-Diaminopimelic acid และพบ whole-cell sugar pattern N.C. (No characteristic sugar pattern) (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

4.1.3.5 จีนิส *Nocardiosis*

จากการแยกเชื้อแอกคิโนมัซซีทเอนโคไฟท์จากส้ม พบเชื้อที่อยู่ในจีนิส *Nocardiosis* ทั้งหมด 3.96 เปอร์เซ็นต์โดยแยกได้จากใบทั้งหมด ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกคิโนมัซซีทนี้ ประกอบด้วยเส้นใยพันกันแน่น และมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) มีขอบโคโลนีแบบเส้นสายยาวไม่แน่นอน สร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium มีการสร้างสปอร์แบบ Fragmenting branched สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีขาว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP และพบ whole-cell sugar pattern C (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

4.1.3.6 จีนิส *Microbispora*

จากการแยกเชื้อแอกคิโนมัซซีทเอนโคไฟท์จากส้ม พบเชื้อที่อยู่ในจีนิส *Microbispora* ทั้งหมด 3.96 เปอร์เซ็นต์โดยแยกได้จากรากทั้งหมด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มนี้จะมีการสร้างสปอร์คู่บนปลายของก้านชูสปอร์บน aerial mycelium ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลม (circular) และมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ผิวหน้าขรุขระ (rough) และมีความโค้งนูนเล็กน้อย (convex) มีขอบโคโลนีเรียบ (entire) และบางกลุ่มมีขอบโคโลนีแบบขยับ (wrinkled) สร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium มีสปอร์แบบ microbispora สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีขาว 3 ไอโซเลท และ สีอิฐ 1 ไอโซเลท ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP และพบ whole-cell sugar pattern B (Lechevalier and Lechevalier, 1970)



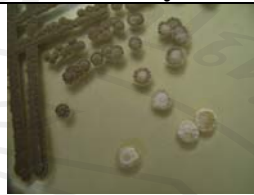






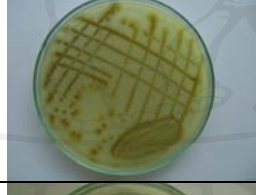










4.1.3.7 จีนิส *Micromonospora*

จากการแยกเชื้อแอกคิโนมัซซีท พบเชื้อที่อยู่ในจีนิส *Micromonospora* ทั้งหมด 7.92 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากรากทั้งหมด ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกคิโนมัซซีทบางกลุ่มมีผิวเยิ้มคล้ายน้ำมัน ไม่สร้าง aerial mycelium แต่สร้าง substrate mycelium มีการสร้างสปอร์แบบสปอร์เดี่ยวๆ บนเส้นใยเหนือผิวอาหารโดยตรง สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีเทา 4 ไอโซเลท และ สีดำ 3 ไอโซเลท สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สีเหลือง 1 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP และพบ whole-cell sugar pattern D (Lechevalier and Lechevalier, 1970)



















4.1.3.8 ไม่สามารถระบุจีโนส (unidentified)

จากการแยกเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากสั้ม พบเชื้อที่ไม่สามารถจัดจำแนกระดับจีโนสได้มีทั้งหมด 8.91 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากกิ่ง 2 ไอโซเลท และจากรากทั้งหมด 8 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลม (circular) และมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) มีผิวหน้าขรุขระ (rough) และมีความโค้งนูนเล็กน้อย (convex) มีขอบโคโลนีเรียบ (entire) และเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก (lobate) บางกลุ่มสร้างและไม่สร้าง aerial mycelium และสร้าง substrate mycelium ไม่สามารถตรวจสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่มนี้ได้เนื่องจากสปอร์อาจมีขนาดเล็กมาก สีของโคโลนีเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เป็นสีขาว 3 ไอโซเลท สีเทา 5 ไอโซเลท สีส้ม 1 ไอโซเลท และไม่สามารถระบุได้ 1 ไอโซเลท สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สีเหลือง 1 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) มีผนังเซลล์ชนิด meso-DAP หรือ LL-DAP แล้วพบองค์ประกอบของน้ำตาลในเซลล์ (whole-cell sugars) galactose, xylose, glucose, mannose และ ribose

ตารางที่ 9 ลักษณะทางทางฟิโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในอาหาร ISP-3

Genus	isolate/group	up plate	down plate	colony	spore chain
<i>Streptomyces</i> (Sp)	TGsS-01-01 (1)				
<i>Streptomyces</i> (Vt)	TGsR-01-17 (18)				
<i>Streptomyces</i> (Rf)	TGsR-01-07 (11)				
<i>Nocardia</i> (F)	TGsR-01-12 (15)				
<i>Nocardioides</i>	TGsR-01-16 (17)				

ตารางที่ 9 ลักษณะทางทางฟิโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในอาหาร ISP-3 (ต่อ)

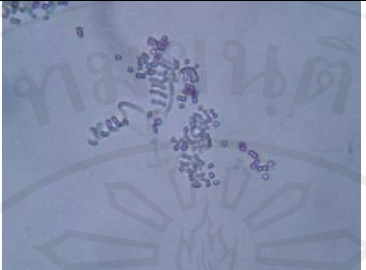
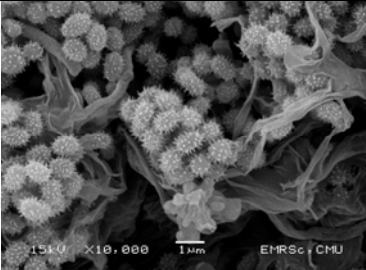


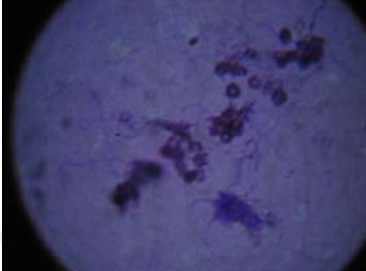
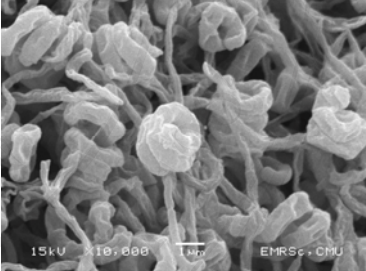

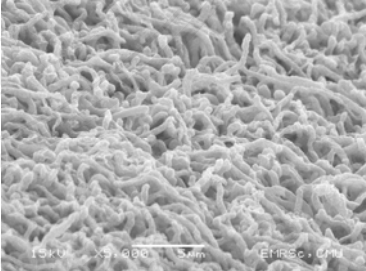

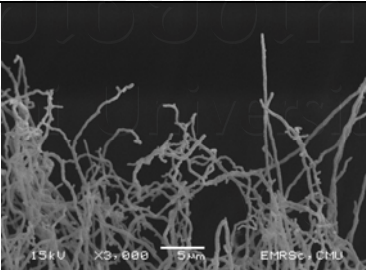
Genus	isolate/group	up plate	down plate	colony	spore chain
<i>Nocardiopsis</i>	TGsL-02-05 (23)				
<i>Spirillospora</i>	TGsR-01-14 (15)				
<i>Microbispora</i>	TGsR-02-11 (33)				
<i>Micromonospora</i>	TGsR-02-07 (29)				
unidentifiend	TGsR-2-16 (36)				

4.1.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope)


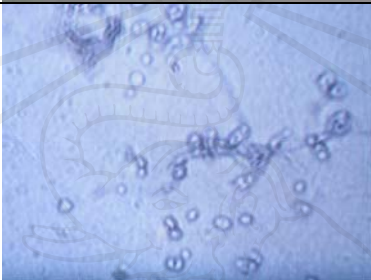
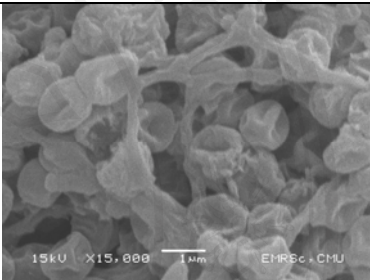
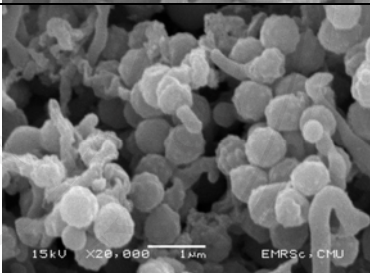
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ ที่จัดจำแนกได้ 7 จินัส นำตัวแทนของเชื้อในแต่ละจินัส มาตรวจสอบลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope) เพื่อตรวจสอบลักษณะของสปอร์อีกครั้ง เนื่องจากว่าลักษณะของสปอร์บางกลุ่มมีขนาดเล็กมาก เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาไม่สามารถเห็นลักษณะของสปอร์ได้อย่างชัดเจน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ภายใต้กล้อง SEM และเปรียบเทียบกับลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง microscope ทั้งหมด 7 จินัส (ตารางที่ 10) พบว่าในจินัส *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์เป็นแบบ spira มีรูปร่างแบบ doliform ผิวสปอร์เป็นแบบ spiny ต่อกันเป็นสายโซ่ม้วนบิดเป็นเกลียว และสร้างสปอร์แบบ rectiflexibiles มีรูปร่างแบบ rod-shaped ผิวสปอร์เรียบ ต่อกันเป็นสายโซ่ยาว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Miyadoh (1997) และ Stanley *et al.* (1989) ที่พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สร้างเส้นใยยึดเกาะติดกับชั้นอาหารและแตกกิ่งก้านได้ดี มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือผิวอาหาร สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว จินัส *Spirillospora* ลักษณะสปอร์ม้วนเป็นวงกลม มีผิวสปอร์แบบ parallel rugose ในจินัส *Nocardia* และ *Nocardioides* มีลักษณะสปอร์เป็นแบบ Fragmenting branch เหมือนกัน คือลักษณะสปอร์จะแตกออกเป็นกิ่งก้าน ส่วนในจินัส *Nocardioopsis* ลักษณะสปอร์จะเป็นสายยาวคล้ายกับ rectiflexibiles แต่ในบางสปีชีส์จะมีสร้างสปอร์สายสั้นๆ เช่นเดียวกับในจินัส *Microbispora* จะมีการสร้างสปอร์อยู่บนปลายของก้านชูสปอร์บนเส้นใยเหนือผิวอาหารผิวของสปอร์เป็นแบบ irregular rugose และ จินัส *Micromonospora* จะสร้างสปอร์เดี่ยวบน aerial mycelium ตรงบริเวณปลายของ sporophores ผิวสปอร์เรียบ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ภายใต้กล้อง SEM นั้นสามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ในระดับจินัสได้ แต่จะให้ได้ในระดับสปีชีส์นั้น จะต้องใช้ข้อมูลทางด้านเคมี และการวิเคราะห์ DNA hybridization ประกอบ

ตารางที่ 10 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ภายใต้กล้อง SEM ในแต่ละจีแนส

Genus	spore chain ¹	Microscope	SEM
<i>Streptomyces</i>	Sp		
	Rf		
<i>Spirillospora</i>	Sr		
<i>Nocardia</i>	F		
<i>Nocardioides</i>	F		

ตารางที่ 10 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ภายใต้กล้อง SEM ในแต่ละจีนัส

Genus	spore chain ¹	Microscope	SEM
<i>Nocardiopsis</i>	F		-
<i>Microbispora</i>	Mb		
<i>Micromonospora</i>	Mn	-	

¹ อ้างอิงมาจากตารางที่ 6

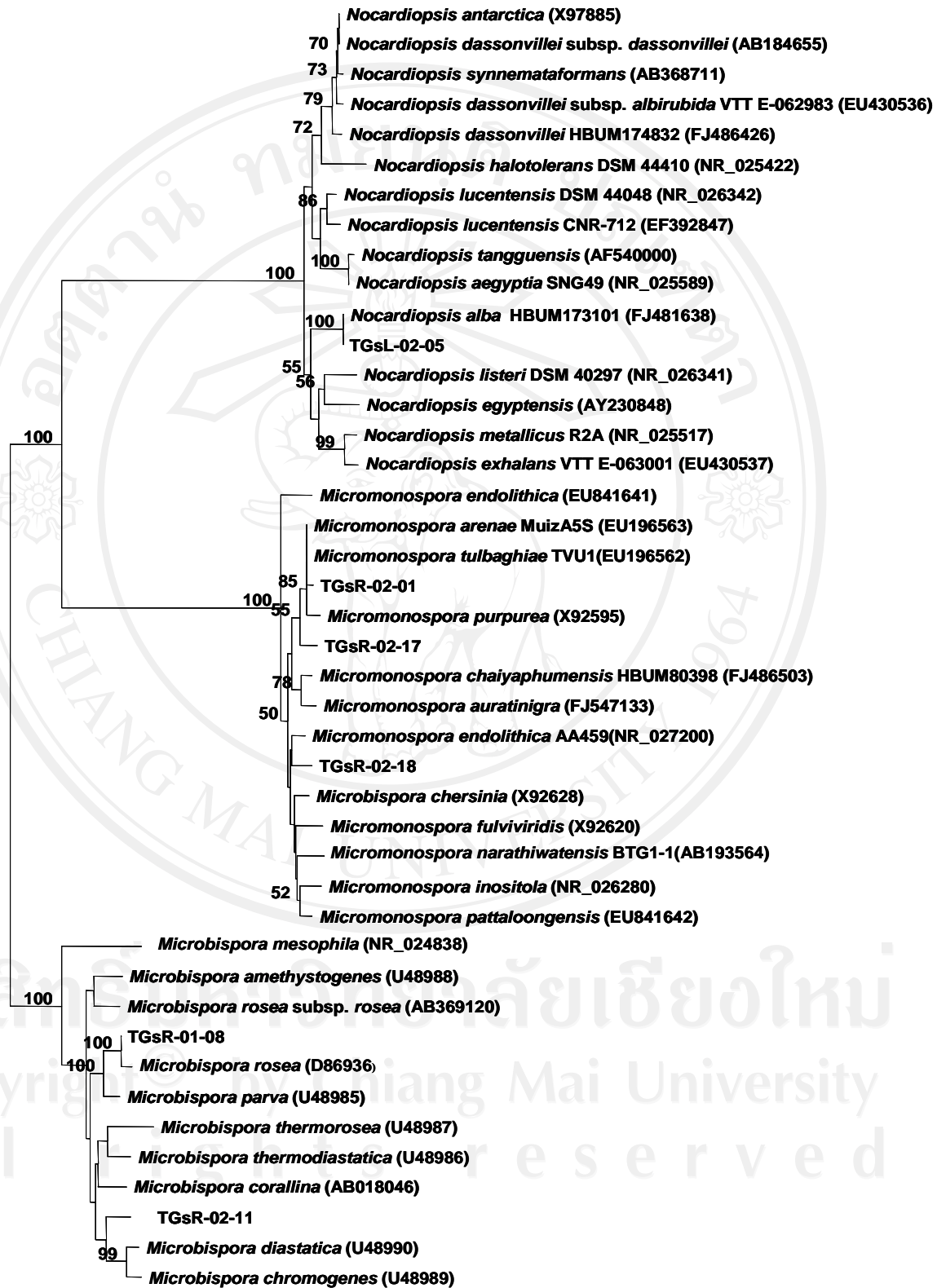
หมายเหตุ ภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Nocardiopsis* sp. ไม่ได้ทำการศึกษาและไม่มีของภาพเชื้อแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Micromonospora* sp. เนื่องจากมีขนาดของสปอร์เล็กมากจึงไม่สามารถเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

4.1.5 การจำแนกชนิดของแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยใช้เทคนิค

16S rDNA sequencing

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 6 ไอโซเลท คือ TGsL-02-05, TGsR-01-08, TGsR-02-01, TGsR-02-11, TGsR-02-17 และ TGsR-02-18 นำไปตรวจสอบและวิเคราะห์ นิวคลีโอไทด์และจำแนกชนิดด้วยเทคนิค 16S rDNA Sequencing PCR product มีขนาด 1500 เบส เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องในการจัดจำแนก เมื่อได้ลำดับเบสที่ต้องการ นำไปเข้าโปรแกรม Blast เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลใน Gene Bank พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ไอโซเลท TGsL-02-05 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 59 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Nocardiopsis alba* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (% similarity) ที่ 100 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เบอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) ไอโซเลท TGsR-01-08 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 59 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 99.78 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ 100 เบอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) เช่นเดียวกับ ไอโซเลท TGsR-02-11 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 59 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora diastatica* ด้วยระดับความคล้ายคลึง 98.81 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ 99 เบอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) และไอโซเลท TGsR-02-01 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 59 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora tulbaghiaie* และ *Micromonospora arenae* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 99.85 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ 85 เบอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) ไอโซเลท TGsR-02-17 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 60 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora endolithica*, *Micromonospora tulbaghiaie* และ *Micromonospora arenae* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 99.25 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ 85 เบอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) และไอโซเลท TGsR-02-18 มีปริมาณของเบส G และ C ในดีเอ็นเอ 60 เบอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora endolithica* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 98.88 เบอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ ร้อยละ 85 (ภาพที่ 15)

0.1 substitutions/site



ภาพที่ 15 แสดงตำแหน่งเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ ไอโซเลท TGsL-02-05, TGsR-02-01, TGsR-02-17, TGsR-02-18, TGsR-01-08 และ TGsR-02-11 บน Phylogenetic tree

4.1.6 การผลิตเมลานินของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

ศึกษาความสามารถในการผลิตเมลานินของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 56 ไอโซเลท โดยเลี้ยงบนอาหาร peptone-yeast extract iron agar (ISP-6) พบเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิตเมลานินซึ่งสามารถสังเกตการณ์แพร่ของรงควัตถุจะมีสีน้ำตาลดำ ขึ้นบนอาหาร (Dastager *et al.*, 1996) เพียง 6 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทแยกได้จากราก คือ TGsR-01-01, TGsR-01-04, TGsR-01-07, TGsR-03-01, TGsR-03-02 และ TGsR-03-04 (ภาพที่ 16) จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* เกือบทั้งหมด และเช่นเดียวกับ Dastager และ คณะ (2006) พบเชื้อ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลดำบนอาหารเหลว peptone-yeast extract และ synthetic tyrosine-agar 9 สายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 180 สายพันธุ์ ดังนั้นไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเมลานินควรที่จะทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากเราสามารถใช้ประโยชน์ของเมลานิน ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม และการผลิตเครื่องสำอาง (Dastager *et al.*, 2006) และน่าจะนำมาประยุกต์ใช้กับทางการเกษตรในด้านการควบคุมโรคหรือผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อไปในอนาคต



TGsR-01-01



TGsR-01-04



TGsR-01-07



TGsR-03-01



TGsR-03-02



TGsR-03-04

ภาพที่ 16 ความสามารถในการผลิตเมลานินของเชื้อแอกติโนมัยซีท

4.2 ศักยภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ต่อการผลิตสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของส้ม

4.2.1 การวิเคราะห์หาความสามารถในการสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA)

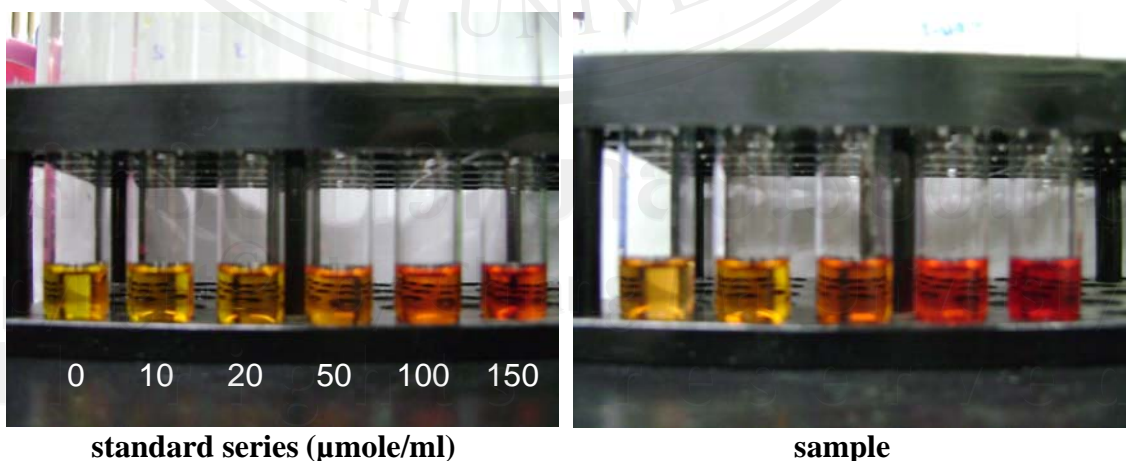
IAA เป็นฮอร์โมนธรรมชาติในกลุ่มออกซิน เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตและยืดยาวขึ้น พืชสังเคราะห์ออกซินเพื่อควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรีย เชื้อรา และ แอคติโนมัยซีท บางชนิดก็มีความสามารถในการผลิตสารออกซินได้ โดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแอคติโนมัยซีท Manulis (1994) ได้ศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. หลายชนิดที่แยกได้จากมันฝรั่ง ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) เมื่อมี L-tryptophan เป็นสารตั้งต้น

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ ในการสังเคราะห์ออกซิน เพื่อทดสอบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole ได้หรือไม่ โดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหาร NB ที่มี tryptophan เป็นส่วนประกอบ และตรวจสอบการพัฒนาคูด้วย salkovskii reagent โดยจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (ภาพที่ 17) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ทั้งหมด มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA 94.34 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณตั้งแต่ 0.32 - 145.33 mmole/ g of cell โดยมีปริมาณการสังเคราะห์จะมีความแปรผันต่างกันมาก และส่วนใหญ่มีปริมาณอยู่ในช่วง 10 -50 mmole/ g of cell และเมื่อเปรียบเทียบกับจีสแล้วพบว่าจีส *Nocardiopsis* มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA มากที่สุด โดยมีปริมาณตั้งแต่ 93.85 - 178.66 mmole/ g of cell จีส *Streptomyces* , *Nocardia* , *Nocardioides*, *Spirillospora*, *Microbispora* , *Micromonospora* และเชื้อในกลุ่มที่ไม่สามารถระบุจีสได้ มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ดังนี้คือ 2.65 - 163.57, 2.29 - 52.83, 51.88, 39.94 - 40.34, 0.32 - 76.54, 6.88 - 48.72 และ 12.40 - 76.03 mmole/ g of cell ตามลำดับ (ตารางที่ 11) และพบเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ 5.66 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA เช่นเดียวกับ Khamna และ คณะ (2008) พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากบริเวณรากพืชสมุนไพร ทั้งหมด 16 ชนิด มีสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ ทั้งหมด 8.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะอยู่ในช่วง 5.5 - 144 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งส่วนมากจะอยู่ในจีส *Streptomyces* Igarashi (2002) อ้างโดย Hasegawa (2006) แยกสาร pteridic acid A และ B จากอาหารเหลว fermentation broth ที่ใช้เลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Streptomyces hygrosopicus* TP-A045 ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีฤทธิ์คล้ายสารในกลุ่มออกซิน คือมีผลทำให้เกิดราก adventitious root บริเวณ hypocotyls กับถั่ว kidney beans มีปริมาณรากที่มาก แม้ได้รับเพียง

1 nmole ของ IAA เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอิทธิพลของ phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) ในเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดต่างๆ จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 21 สายพันธุ์ พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์สาร antibiotic 13 สายพันธุ์ และมีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA 12 สายพันธุ์ และยืนยันการกระตุ้นการสังเคราะห์ IAA ด้วยเชื้อ *S. purpurascens* NBRC 13077 โดยการสังเคราะห์สาร antibiotic และ rhodomycin โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อการแสดงผลของยีน *rdmA*, *rdmB*, *rdmC*, *rdmD* และ *rdmE* ซึ่งยีนเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการสร้าง rhodomycin และเป็นตัวกำหนดการผลิต IAA (Matsukawa *et al.*, 2007)

ปริมาณความเข้มข้นของ tryptophan มีผลต่อการสังเคราะห์ IAA โดยปริมาณความเข้มข้นของ tryptophan จะแปรผันตรงกับความสามารถในการสังเคราะห์ IAA เช่นเดียวกับ Ahmad และ คณะ (2006) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter*, *Pseudomonas* และ *Bacillus* ในอาหารที่ผสม tryptophan ที่ความเข้มข้น 50-500 $\mu\text{g/ml}$ และไม่มี tryptophan พบว่า เชื้อทั้งสามชนิดนี้มีความสามารถในการผลิต IAA เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ tryptophan

เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากสัมนั้นมีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ และเนื่องจากข้อมูลที่ทำกรทดลองในสัมนยังไม่มีผู้บันทึกไว้ จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบในที่นี้ อย่างไรก็ตามการที่เชื้อนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นจุดที่น่าสนใจที่จะทำการทดลองขั้นต่อไป เพื่อที่จะพัฒนาการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 17 การพัฒนาสีตัวอย่างที่มีการสร้างสาร IAA เมื่อเทียบกับตัวมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100, 150 $\mu\text{mole/ml}$ (ภาพด้านซ้าย) ด้านขวาเป็นภาพตัวอย่างที่นำมาตรวจวัด

ตารางที่ 11 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโคไฟท์

Genus	Spore chain	positive (mmole /g of cell)					negative isolate
		isolate	< 10	11 - 50	51 - 100	101 - 200	
<i>Streptomyces</i>	Sp	TGsL-01-01	-	-	83.08 ± 1.9	-	-
		TGsL-02-01	-	23.16 ± 1.8	-	-	-
		TGsL-02-02	2.65 ± 0.6	-	-	-	-
		TGsL-03-01	-	-	-	125.16 ± 20.7	-
		TGsL-03-05	-	19.65 ± 2.7	-	-	-
		TGsL-03-14	-	-	58.96 ± 4.8	-	-
	TGsS	TGsS-01-01	-	12.95 ± 3.3	-	-	TGsS-03-15
		TGsS-01-06	-	20.57 ± 4.5	-	-	TGsS-03-16
		TGsS-01-09	-	28.36 ± 2.9	-	-	TGsS-03-17
		TGsS-02-02	-	11.46 ± 2.1	-	-	-
		TGsS-02-04	-	24.08 ± 4.8	-	-	-
		TGsS-03-02	8.07 ± 2.7	-	-	-	-
		TGsS-03-07	10.54 ± 2.4	-	-	-	-
		TGsS-03-18	6.12 ± 1.4	-	-	-	-
		TGsR-01-01	-	-	-	125.54 ± 16	-
		TGsR-01-09	-	15.99 ± 6.4	-	-	-
		TGsR-01-15	-	48.61 ± 14.8	-	-	-
		TGsR-01-17	7.28 ± 2.9	-	-	-	-
		TGsR-03-01	-	13.19 ± 3.7	-	-	-
		TGsR-03-02	-	-	-	163.57 ± 11.1	-
		Rf	TGsR-01-04	-	-	-	116.27 ± 4.0
TGsR-01-07	-		-	60.26 ± 6.0	-	-	
<i>Nocardia</i>	F	TGsR-01-12	2.29 ± 1.4	-	-	-	-
		TGsR-02-15	-	-	52.83 ± 10.4	-	-
		TGsR-02-22	-	45.09 ± 2.1	-	-	-
<i>Nocardioides</i>	F	TGsR-01-16	-	-	51.88 ± 6.6	-	-
<i>Nocardopsis</i>	F	TGsL-02-04	-	-	93.85 ± 2.9	-	-
		TGsL-02-05	-	-	-	178.66 ± 1.2	-
<i>Spirillospora</i>	Sr	TGsR-01-05	-	34.94 ± 11.8	-	-	-
		TGsR-01-11	-	16.69 ± 10.5	-	-	-
		TGsR-01-14	-	40.34 ± 11.1	-	-	-

ตารางที่ 11 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ (ต่อ)

Genus	Spore chain	positive (mmole /g of cell)					negative
		isolate	< 10	11 - 50	51 - 100	101-200	isolate
<i>Microbispora</i>	Mb	TGsR-01-08	-	-	76.54 ± 13.4	-	-
		TGsR-02-05	0.32 ± 0.1	-	-	-	-
		TGsR-02-11	-	-	63.78 ± 1.0	-	-
<i>Micromonospora</i>	Mn	TGsR-02-01	6.88 ± 1.8	-	-	-	-
		TGsR-02-03	-	17.11 ± 10.6	-	-	-
		TGsR-02-07	-	48.72 ± 8.3	-	-	-
		TGsR-02-17	-	40.39 ± 8.6	-	-	-
		TGsR-02-18	-	12.59 ± 11.5	-	-	-
		TGsR-02-20	-	22.39 ± 0.4	-	-	-
		TGsR-02-21	-	43.64 ± 7.7	-	-	-
		TGsR-03-06	-	-	58.81 ± 7.5	-	-
unknown	-	TGsS-03-07	10.54 ± 2.4	-	-	-	-
		TGsS-03-09	-	20.91 ± 3.3	-	-	-
		TGsR-02-02	-	16.89 ± 1.0	-	-	-
		TGsR-02-06	-	23.72 ± 9.3	-	-	-
		TGsR-02-08	-	22.39 ± 1.4	-	-	-
		TGsR-02-10	-	12.40 ± 0.3	-	-	-
		TGsR-02-12	-	24.34 ± 6.3	-	-	-
		TGsR-02-16	-	37.78 ± 2.0	-	-	-
		TGsR-03-04	-	-	76.03 ± 4.1	-	-
% of total			16.98	54.72	18.87	9.43	5.66
produced		94.34%					
non produced		5.66%					
Mean		40.15					
F-test		*					
% CV		17.62					

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P_{0.05}

3.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยละลายฟอสฟอรัส

การทดสอบความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัส โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหาร Czapek's solution agar ที่ผสม congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 วัน โดยทดสอบความสามารถในการย่อยฟอสฟอรัสหากมีการย่อยละลายฟอสฟอรัสจะเกิดวงใส (Clear zone) รอบๆ โคลนินของเชื้อ (ภาพที่ 18) จากการทดสอบการย่อยละลายฟอสฟอรัสกับเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ พบเชื้อแอกติโนมัยซีทย่อยละลายฟอสฟอรัส ได้ทั้งหมด 80.36 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุดคือ TGsR-02-22 อยู่ในจีนัส *Nocardia* มีค่า clear zone : colony เท่ากับ 2.25 ส่วนจีนัสอื่นๆ คือ *Streptomyces*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nocardiosis*, *Spirillospora*, *Microbispora*, และ *Micromonospora* ให้ผลไม่แตกต่างกัน จะมีค่า clear zone : colony อยู่ในช่วงระหว่าง 1 - 2 และมีค่า clear zone : colony อยู่ในช่วง 1 - 1.5, 1.5 - 2 และมากกว่า 2 มีค่าเท่ากับ 57.41, 14.81 และ 5.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และพบเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ 19.64 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัสอยู่ในจีนัส *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microbispora* และ *Micromonospora* ดังนั้นเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์กลุ่มที่สามารถย่อยละลายฟอสฟอรัสออกมาในรูปแบบที่เป็นประโยชน์สามารถนำมาใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชได้



TGsS-03-07



TGsR-02-22

ภาพที่ 18 ลักษณะการข้อมสีเพื่อตรวจสอบเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยฟอสฟอรัส ลักษณะของเชื้อที่ไม่สามารถย่อยละลายฟอสฟอรัสได้ (ซ้าย) ลักษณะของเชื้อที่สามารถย่อยละลายฟอสฟอรัสได้ (ขวา) เกิดวงใสขึ้นรอบๆ โคลนิน

ตารางที่ 12 ความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโคไฟท์

Genus	Spore chain	Phosphorus solubilizing activity				
		isolate	clear zone ratio (positive)			(negative)
			1.0-1.5	1.5-2.0	>2.0	isolate
<i>Streptomyces</i>	Sp	TGsL-01-01	1.28 ± 0.02	-	-	
		TGsL-02-01	1.20 ± 0.03	-	-	
		TGsL-02-02	1.17 ± 0.08	-	-	
		TGsL-03-01	1.34 ± 0.05	-	-	
		TGsL-03-05	1.25 ± 0.06	-	-	
		TGsL-03-14	1.26 ± 0.11	-	-	
	-	TGsS-01-01	1.26 ± 0.03	-	-	TGsS-03-07
		TGsS-01-06	1.24 ± 0.05	-	-	TGsS-03-15
		TGsS-01-09	1.14 ± 0.01	-	-	TGsS-03-16
		TGsS-02-02	1.36 ± 0.17	-	-	-
		TGsS-02-04	1.11 ± 0.02	-	-	-
		TGsS-03-02	1.36 ± 0.05	-	-	-
		TGsS-03-17	-	1.91 ± 0.05	-	-
		TGsS-03-18	1.20 ± 0.14	-	-	-
		TGsR-01-01	-	1.52 ± 0.07	-	-
		TGsR-01-09	1.33 ± 0.08	-	-	-
		TGsR-01-15	1.23 ± 0.04	-	-	-
		TGsR-01-17	1.22 ± 0.05	-	-	-
	TGsR-03-01	1.38 ± 0.15	-	-	-	
	TGsR-03-02	1.236 ± 0.04	-	-	-	
	Rf	TGsR-01-04	1.23 ± 0.03	-	-	-
TGsR-01-07		1.34 ± 0.13	-	-	-	
<i>Nocardia</i>	F	TGsR-02-22	-	-	2.25 ± 0.00	TGsR-01-12
		-	-	-	-	TGsR-02-15
<i>Nocardioides</i>	F	TGsR-01-16	-	-	2.19 ± 0.01	-
<i>Nocardiopsis</i>	F	TGsL-02-04	1.36 ± 0.12	-	-	-
		TGsL-02-05	1.35 ± 0.12	-	-	-
<i>Spirillospora</i>	Sr	TGsR-01-05	1.33 ± 0.11	-	-	-
		TGsR-01-11	1.31 ± 0.04	-	-	-
		TGsR-01-14	-	1.52 ± 0.32	-	-
<i>Microbispora</i>	Mb	TGsR-01-08	-	1.94 ± 0.06	-	TGsR-02-05
		TGsR-02-11	-	-	2.21 ± 0.41	-

ตารางที่ 12 ความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโคไฟท์ (ต่อ)

Genus	Spore chain	Phosphorus solubilizing activity				
		isolate	clear zone ratio (positive)			(negative)
			1.0 - 1.5	1.5 - 2.0	>2.0	isolate
<i>Micromonospora</i>	Mn	TGsR-02-03	-	1.94 ± 0.22	-	TGsR-02-01
		TGsR-02-17	1.25 ± 0.00	-	-	TGsR-02-07
		TGsR-02-18	-	1.71 ± 0.10	-	-
		TGsR-02-20	-	1.94 ± 0.27	-	-
		TGsR-02-21	1.25 ± 0.06	-	-	-
		TGsR-03-06	1.29 ± 0.13	-	-	-
unidentified	-	TGsS-03-09	1.91 ± 0.00	-	-	TGsS-03-07
		TGsR-02-06	1.32 ± 0.06	-	-	TGsR-02-02
		TGsR-02-10	-	1.75 ± 0.06	-	TGsR-02-08
		TGsR-02-12	1.31 ± 0.06	-	-	TGsR-02-16
		TGsR-03-04	1.35 ± 0.13	-	-	
% of total		80.36	57.41	14.81	5.56	19.64
Mean		1.1484				
F-test		*				
% CV		9.92				

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

Spira (Sp), Rectiflexibiles (Rf), Fragmenting branched (F), Spirillospora (Sr), Microbispora (Mb), Micromonospora (Mn)

3.4.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

การทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยละลายเซลลูโลส นั้นทำได้โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ (CMC) แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลส โดยย้อมด้วย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ หากมีการย่อยละลายเซลลูโลส จะเกิดวงใส (clear zone) (ภาพที่ 19) จากการทดสอบการย่อยละลายเซลลูโลสกับเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ พบเชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 81.13 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุดอยู่ในจีส *Microbispora* มีค่า clear zone : colony เท่ากับ 6.13 ส่วนจีสอื่นๆ คือ *Streptomyces*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nocardopsis*, *Spirillospora*, *Microbispora* และ *Micromonospora* ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก มีค่า clear zone : colony อยู่ในช่วงระหว่าง 1.0 – 5.0 และมีค่า clear zone : colony อยู่ในช่วง 1.0-3.0, 3.0-4.0 และมากกว่า 4 มีค่าเท่ากับ 37.04, 29.63 และ 12.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 13) เช่นเดียวกับวันวิสาข์ (2546) พบเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท KMST 3 สามารถย่อยละลายเซลลูโลสได้ และพบเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ 18.87 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลสอยู่ในจีส *Streptomyces*, *Nocardia*, *Spirillospora* และเอนไซม์เซลลูเลสมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระจายตัวของเชื้อเอนโดไฟท์ เนื่องจากสามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืชทำให้เชื้อสามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อพืชส่วน intracellular และจากการทดลองนี้แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์มีความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลสได้จำนวนมาก ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในการที่เชื้อสามารถเข้าไปในพืชได้ง่ายกว่าวิธีการอื่นๆ เช่นทางปากใบหรือทางบาดแผลบนต้นพืช



TGsS-03-07

TGsR-01-08

ภาพที่ 19 ลักษณะการย้อมสีเพื่อตรวจสอบเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ลักษณะของเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ (ซ้าย) ลักษณะของเชื้อที่สามารถย่อยละลายเซลลูโลสได้ (ขวา) เกิดวงใสขึ้นรอบๆ โคลินี่

ตารางที่ 13 ความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลสของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์

Genus	Spore chain	Cellulase activity				
		isolate	clear zone ratio (positive)			(negative)
			>1.0-3.0<	>3.0-4.0<	>4.0	isolate
<i>Streptomyces</i>	Sp	TGsL-01-01	2.72 ± 0.1	-	-	TGsL-03-05
		TGsL-02-01	3.04 ± 0.2	-	-	TGsL-03-14
		TGsL-02-02	-	3.48 ± 0.1	-	-
		TGsL-03-01	2.32 ± 0.1	-	-	-
		TGsS-01-01	2.72 ± 0.3	-	-	TGsS-03-07
		TGsS-01-06	2.62 ± 0.1	-	-	TGsS-03-15
		TGsS-01-09	2.80 ± 0.1	-	-	TGsS-03-16
		TGsS-02-02	2.57 ± 0.1	-	-	TGsS-03-18
		TGsS-02-04	2.58 ± 0.1	-	-	-
		TGsS-03-02	2.68 ± 0.1	-	-	-
	TGsS-03-17	2.20 ± 0.1	-	-	-	
	TGsR-01-01	2.52 ± 0.2	-	-	-	
	TGsR-01-09	-	3.55 ± 0.2	-	-	
	TGsR-01-15	2.12 ± 0.1	-	-	-	
	TGsR-01-17	-	3.63 ± 0.1	-	-	
	TGsR-03-01	-	3.23 ± 0.1	-	-	
	TGsR-03-02	2.64 ± 0.2	-	-	-	
	TGsR-01-04	2.02 ± 0.0	-	-	-	
	TGsR-01-07	2.21 ± 0.3	-	-	-	
<i>Nocardia</i>	F	TGsR-02-15	2.45 ± 0.1	-	-	TGsR-01-12
		TGsR-02-22	-	3.59 ± 0.0	-	-
<i>Nocardioides</i>	F	TGsR-01-16	-	3.90 ± 0.4	-	-
<i>Nocardiopsis</i>	F	TGsL-02-04	-	3.35 ± 0.2	-	-
		TGsL-02-05	-	3.35 ± 0.2	-	-
<i>Spirillospora</i>	Sr	TGsR-01-05	2.51 ± 0.6	-	-	TGsR-01-11
		-	-	-	-	TGsR-01-14
<i>Microbispora</i>	Mb	TGsR-01-08	-	-	6.13 ± 0.3	-
		TGsR-02-05	2.76 ± 0.0	-	-	-
		TGsR-02-11	-	3.96 ± 0.7	-	-

ตารางที่ 13 ความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลสของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ (ต่อ)

Genus	Spore chain	Cellulase activity				
		isolate	clear zone ratio (positive)			(negative)
			>1.0-3.0<	>3.0-4.0<	>4.0	
<i>Micromonospora</i>	Mn	TGsR-02-01	-	3.27 ± 0.1	-	
		TGsR-02-03	-	3.92 ± 0.5	-	-
		TGsR-02-07	-	3.96 ± 0.1	-	-
		TGsR-02-17	-		4.43 ± 0.3	-
		TGsR-02-18	-	3.74 ± 0.3	-	-
		TGsR-02-20	-	3.62 ± 0.2	-	-
		TGsR-02-21	-		4.69 ± 0.1	-
		TGsR-03-06	-		4.62 ± 0.1	-
unidentified	-	TGsR-02-02	-	3.74 ± 0.1	-	TGsS-03-07
		TGsR-02-06	2.46 ± 0.2	-	-	TGsS-03-09
		TGsR-02-08	-	3.81 ± 0.1	-	-
		TGsR-02-10	-	-	4.63 ± 0.3	-
		TGsR-02-12	-	-	4.77 ± 0.3	-
		TGsR-02-16	-	-	4.19 ± 0.1	-
		TGsR-03-04	2.80 ± 0.3	-	-	-
% of total		79.63	37.04	29.63	12.96	20.37
Mean		2.69				
F-test		*				
% CV		8.12				

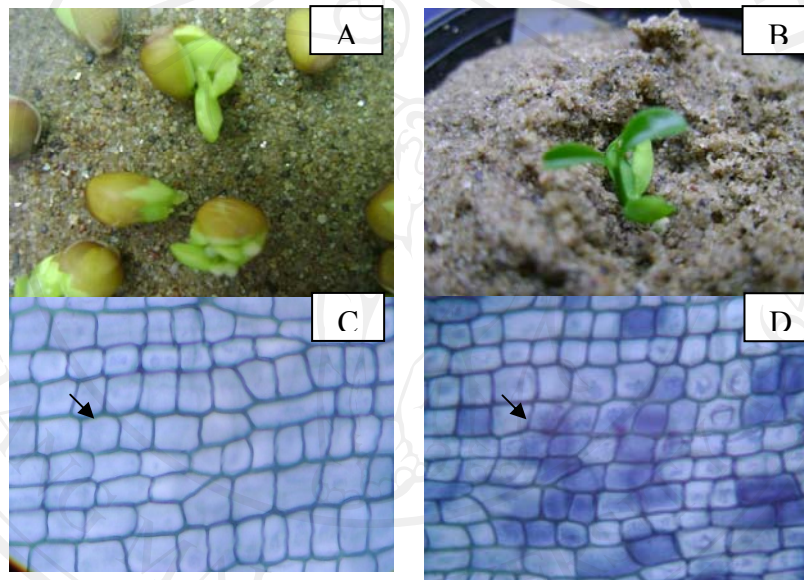
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

Spira (Sp), Rectiflexibles (Rf), Fragmenting branched (F), Spirillospora (Sr), Microbispora (Mb),
Micromonospora (Mn)

3.5 ศักยภาพในการส่งเสริมในการเจริญเติบโตของส้ม

3.5.1 วิธีการตรวจสอบการเข้าราก

ผลการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ปลูกถ่ายให้กับกล้าส้มที่ได้จากการเพาะจากเมล็ด นำไปตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าภายในเซลล์ของรากส้มมีแอคติโนมัยซีทอาศัยอยู่ (ภาพที่ 20 D) จะเห็นได้ว่าเชื้อเอนโดไฟท์สามารถเข้าอาศัยในส่วนของรากได้ ส่วนในกล้าส้มที่ไม่ได้ปลูกถ่ายเชื้อไม่พบการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช (ภาพที่ 20 C) อาจเป็นเพราะว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยละลายผนังเซลล์ของพืชได้หรือเชื้อนี้อาจเข้าทางบาดแผลของต้นพืช



ภาพที่ 20 การเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซีทและชุดควบคุมในเนื้อเยื่อของรากส้ม

A ลักษณะการงอกของเมล็ดส้ม

B กล้าส้มอายุ 15 วัน

C รากที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

D รากที่ได้รับการปลูกเชื้อ

3.5.2 ศักยภาพของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของกล้าส้ม

ผลจากการทดสอบพบว่าประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่ทำการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำให้ต้นส้มที่ได้รับเชื้อรวมกันทั้งสองไอโซเลท มีการเจริญเติบโตในด้านความสูงมากที่สุด โดยรองลงมาได้แก่กล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับต้นส้มที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ($P \leq 0.05$) แต่ในกล้าส้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท กับกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 และ กล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กับต้นส้มที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 14) เมื่อ

เปรียบเทียบน้ำหนักสด พบว่า ในกล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 และกล้าสั้ที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ ต้นสั้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ($P \leq 0.05$) แต่ในกล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กับ กล้าสั้ที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท กล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 กับ ต้นสั้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และกล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 และ กล้าสั้ที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของกล้าสั้พบว่ากล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล้าสั้ที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท ต้นสั้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ($P \leq 0.05$) กล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กับ กล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และกล้าสั้ที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 กล้าสั้ที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลทและ ต้นสั้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบศักยภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกล้าสั้เป็นระยะเวลา 1 เดือน

การทดลอง	ศักยภาพของเชื้อในการเจริญเติบโตของต้นสั้ (เดือนที่ 1)		
	ความสูง (cm)	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)
ทรีตเมนต์ 1 กล้าสั้ + TGsR-02-21	3.52 ± 0.51 bc	0.34 ± 0.03 a	0.12 ± 0.01 a
ทรีตเมนต์ 2 กล้าสั้ + TGsL-02-05	3.78 ± 0.39 ab	0.30 ± 0.03 ab	0.09 ± 0.01 ab
ทรีตเมนต์ 3 กล้าสั้ + TGsR-02-21 + TGsL-02-05	4.35 ± 0.58 a	0.32 ± 0.08 a	0.10 ± 0.03 a
ทรีตเมนต์ 4 ชุดควบคุม	2.83 ± 0.50 c	0.22 ± 0.05 b	0.07 ± 0.02 b
mean	3.62	0.32	0.10
F-test	*	*	*
%CV	13.80	17.47	17.13

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

ผลจากการทดสอบพบว่าประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ที่ทำการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีผลทำให้ความสูงของกล้าส้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 และกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 และ ต้นส้มที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ($P \leq 0.05$) แต่ในกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กับกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 15)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของกล้าส้มพบว่าให้ผลเหมือนกันคือ ในกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 กล้าส้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท และต้นส้มที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ($P < 0.05$) และในแต่ละทรีตเมนต์จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 15)

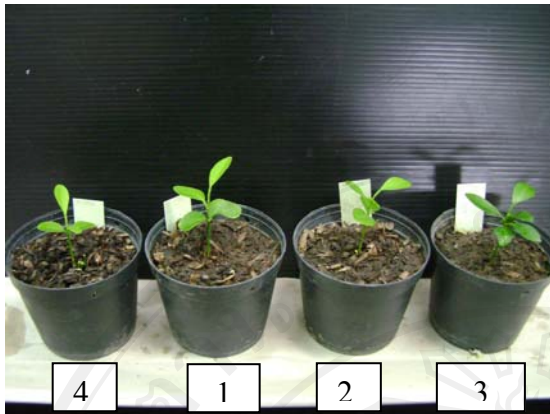
ตารางที่ 15 เปรียบเทียบศักยภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกล้าส้มเป็นระยะเวลา 2 เดือน

การทดลอง	ศักยภาพของเชื้อในการเจริญเติบโตของต้นส้ม (เดือนที่ 2)		
	ความสูง (cm)	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)
ทรีตเมนต์ 1 กล้าส้ม + TGsR-02-21	4.45 ± 0.13 b	0.59 ± 0.01 c	0.18 ± 0.01 c
ทรีตเมนต์ 2 กล้าส้ม + TGsL-02-05	4.63 ± 0.1 b	0.74 ± 0.01 a	0.22 ± 0.01 a
ทรีตเมนต์ 3 กล้าส้ม + TGsR-02-21 + TGsL-02-05	4.98 ± 0.1 a	0.67 ± 0.01 b	0.2 ± 0.01 b
ทรีตเมนต์ 4 ชุดควบคุม	4.03 ± 0.17 c	0.43 ± 0.02 d	0.14 ± 0.01 d
mean	4.52	0.61	0.19
F-test	*	*	*
%CV	2.8	2.36	6.28

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

เมื่อสรุปผลการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพของเชื้อทั้งสองไอโซเลทในกล้าส้ม ผลการทดลองในเดือนที่ 1 กล้าส้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท มีการเจริญเติบโตในด้านความสูงสูงสุด คือ 4.35 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจะพบว่าในกล้าส้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 ให้ผลการเจริญเติบโตสูงสุด คือน้ำหนักสดเท่ากับ 0.34 กรัม

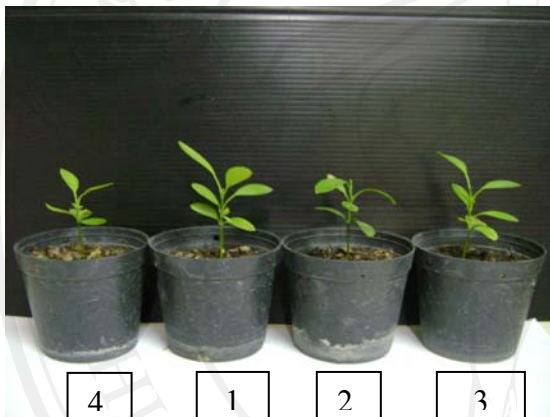
น้ำหนักแห้ง 0.12 กรัม และผลการทดลองในเดือนที่ 2 กล้าสั้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท มีการเจริญเติบโตในด้านความสูงสูงสุด คือ 4.97 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสดและ น้ำหนักแห้งจะพบว่าในกล้าสั้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 ให้ผลการเจริญเติบโตสูงสุด คือน้ำหนักสดเท่ากับ 0.74 กรัม น้ำหนักแห้ง 0.22 กรัม พบว่าในกล้าสั้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท TGsR-02-21 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับกล้าสั้มมากที่สุดในเดือนที่ 1 อาจเป็นเพราะเชื้อนี้มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตที่หลากหลาย และมีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ดี (43.64 mmole /g of cell) น่าจะสามารถเข้าไปอาศัยในต้นกล้าสั้มได้ดีเพราะว่ามีความสามารถในการย่อยละลายเซลลูโลสได้ (4.69) จึงทำให้มีการเจริญเติบโตดีในระยะแรก และในเดือนที่ 2 พบว่ากล้าสั้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับกล้าสั้มมากกว่ากล้าสั้มที่ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 เชื้อนี้มีความสามารถสังเคราะห์ IAA ได้สูงที่สุด (178.66 mmole /g of cell) และกล้าสั้มที่ได้รับเชื้อรวมกันสองไอโซเลท มีผลทำให้ความสูงของกล้าสั้มมากที่สุดทั้งสองเดือน น่าจะเป็นเพราะว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทนี้เข้าไปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับกล้าสั้มได้ดี และให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกับ Igarashi *et al.*, (2002) ที่พบว่า แอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ *Streptomyces hygroscopicus* S-17 มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ โดยมีความสูงเป็น 2 เท่า และมีน้ำหนักสดมากกว่า 8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรากของกล้าสั้มในทริตเมนต์ที่มีการปลูกถ่ายเชื้อแอกติโนมัยซีทลงไปจะมีปริมาณมากกว่ากับชุดควบคุม (ภาพที่ 20) Meguro *et al.* (2006) ก็รายงานว่าชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 เป็นตัวเร่งในการงอกและการยึดยาวของเซลล์พืช ทดลองโดยนำชิ้นส่วนของราก rhododendron มาเพาะด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วใส่ *Streptomyces* sp. MBR-52 ซึ่งเชื้อนี้จะอาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ต้นอ่อนหลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนของ rhododendron ผลการทดลองพบว่าการงอกของรากเมื่อใส่เชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 จะเจริญดีกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับงานทดลองนี้จะเห็นความแตกต่างตรงที่ทริตเมนต์ที่ทริตเชื้อจะมีการแตกแขนงของรากฝอยมาก แต่ในกล้าสั้มจะไม่ค่อยเห็นความแตกต่างกันทางสถิติและรูปร่างมากนัก เพราะว่กล้าสั้มเป็นไม้ยืนต้นมีการเจริญเติบโตช้า และมีปัจจัยหลายๆ อย่างเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตจึงต้องใช้ระยะเวลาในการทดลองที่นานขึ้นกว่านี้เพื่อที่จะให้เห็นผลชัดเจน



การเจริญเติบโตของกล้าส้ม 1 เดือน



ความแตกต่างของรากกล้าส้ม 1 เดือน



การเจริญเติบโตของกล้าส้ม 2 เดือน



ความแตกต่างของรากกล้าส้ม 2 เดือน

ภาพที่ 21 เจริญเติบโตของกล้าส้มในแต่ละทรีตเมนต์

1 ปลูกรเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21, 2 ปลูกรเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05,

3 ปลูกรเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 และ TGsL-02-05, 4 เป็นชุดควบคุม

ในปัจจุบันมีการศึกษาจุลินทรีย์ประเภทเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชเพิ่มมากขึ้น เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores และกิจกรรมของแอกติโนมัยซีท ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ nitrogen fixation, nutrient competition และ systemic disease resistance (Benhamou *et al.*, 1998 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Bailey *et al.*, 2006) ดังนั้นการศึกษากาการจำแนกลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส้ม เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยซีท และนำเชื้อที่ได้มาหาศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส้มนี้มีความหลากหลาย และสามารถผลิตสารที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับต้นส้มได้ดี โดยเฉพาะความสามารถในการ

สังเคราะห์ IAA เชื่อที่ทดสอบนี้สามารถสังเคราะห์ IAA ได้สูง เพราะฉะนั้นแอกติโนมัยซีทเอน-โดไฟท์ จึงเป็นจุดที่น่าสนใจและสามารถทำการทดลองต่อไปในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากในปัจจุบันสวนส้มมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากทั้งสารกำจัดศัตรูพืช โรค และแมลง รวมทั้งปริมาณปุ๋ยเคมี ซึ่งมีราคาแพงและเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค สำหรับงานวิจัยนี้น่าจะเป็นอีกตัวเลือกที่น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดปริมาณการใช้สารเคมีเกษตร และขยายผลการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved