นำเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 63 ไอโซเลต มาทดสอบยืนยันความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Didymella bryoniae* โดยทดสอบกับเชื้อ *D. bryoniae* ที่แยกได้จากใบเมลอน 2 ไอโซเลต (ME2 และ ME4) โดยวิธี bioassay พบว่ามี *Streptomyces* ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *D. bryoniae* ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้ดีที่สุด โดยที่เส้นใยเชื้อราไม่สามารถเจริญออกมาจากชิ้นวุ้นของอาหารเริ่มแรกได้ ได้แก่ *Streptomyces* –13, -22, -95 และ –128 และมี *Streptomyces* ไอโซเลตอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีมีทั้งไอโซเลตที่เคยมีรายงานไว้แล้ว คือ *Streptomyces* -13, -15, -22, -33, -37, -74, -78, -84 และ -87 ส่วนเพิ่มเติมที่ได้จากการศึกษานี้ ได้แก่*Streptomyces* –11, -23, -24, -26, -34, -106, -108, -132, -134, -142, -LP9, -LP39 และ –LP46 เมื่อคัดเลือก *Streptomyces* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *D. bryoniae* ได้ดี จำนวน 16 ไอโซเลต (*Streptomyces*-7, -13, -15, -22, -33, -42, -55, -74, -78, -84, -87, -95, -108, -128, -PR8 และ –PR12) มาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ cellulase, chitinase , amylase และ avicellase บนอาหารแข็ง พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, chitinase, amylase และ avicellase ได้ เมื่อตรวจวัดหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณจากสารกรองเชื้อ พบว่ามีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด เมื่อศึกษาผลกระทบของสารกรองเชื้อจาก *Streptomyces* ที่มีผลต่อเส้นใยของเชื้อรา *D. bryoniae* โดยเลี้ยงเชื้อรา *D. bryoniae* ร่วมกับสารกรองเชื้อของ *Streptomyces* ในอัตราส่วน สารกรองเชื้อ : PDB (1:1, 1:3, 1:5) โดยปริมาตร และอาหาร PDB 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารกรองเชื้อเข้มข้นของ *Streptomyces* ปริมาตร 42 ไมโครลิตร, 70 ไมโครลิตร และ 140 ไมโครลิตร พบว่าสารกรองเชื้อจาก *Streptomyces* ทุกไอโซเลต มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* โดยทำให้เส้นใยของเชื้อมีลักษณะโป่ง หงิกงอ องค์ประกอบภายในเซลล์ลดลงในทุกไอโซเลตของ *Streptomyces* โดยเฉพาะ *Streptomyces*-PR12 และ –42 พบการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเป็นอย่างมากโดย เส้นใยมีลักษณะโป่งพองคล้ายลูกโป่ง หลังจากนั้นนำเส้นใยมาทดสอบการรอดชีวิตบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเชื้อ *D. bryoniae* สามารถรอดชีวิตและเจริญได้คล้ายเส้นใยปรกติ แต่เมื่อนำเส้นใยมาทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ *D. bryoniae* บนผลแตงกวา พบว่าสารกรองเชื้อและสารกรองเชื้อเข้มข้นจาก *Streptomyces*-13, -15, -33, -74, -78 และ –PR8 ทำให้เชื้อรา *D. bryoniae* สูญเสียความสามารถในการเกิดโรค

Streptomyces ทั้ง 16 ไอโซเลต (*Streptomyces*-7, -13, -15, -22, -33, -42, -55, -74, -78, -84, -87, -95, -108, -128, -PR8 และ –PR12) นำมาเลี้ยงในอาหาร AGMB นาน 7 วัน กรองเอาอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ปริมาตร 70 มิลลิลิตร มาระเหยน้ำออกภายใต้สภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วละลาย

ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี paper chromatography ในระบบสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ citric acid พบว่า culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* ทุกไอโซเลต มีองค์ประกอบของสารที่ให้รูปแบบการเรืองแสงเมื่อตรวจด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ในรูปแบบที่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax. avenae* subsp. *citrulli* (Aac) โดยวิธี autobiography พบว่า *Streptomyces* ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ Aac ได้ดี โดยเฉพาะ *Streptomyces*-22, -42, -55, -108, -128 และ –PR12 พบสาร secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Aac ได้ตั้งแต่ Rf 0-1.0 เมื่อตรวจสอบการมีโปรตีนใน culture filtrate ที่ผ่านการระเหยน้ำออกโดยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27-36, 80-96 kDa ซึ่งอยู่ในช่วงของเอนไซม์ไคติเนส ไซลาเนส อะวิเซลเลส และเซลลูเลส

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต โดยเทคนิค repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ BOXA1R (BOX-PCR) และคู่ไพรเมอร์ ERIC$_1$R และ ERIC2 (ERIC-PCR) พบว่า *Streptomyces* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันมากในระดับสปีชีส์ โดย *Streptomyces* -87 และ -95 ที่มีรูปแบบคล้ายกันมากที่สุด เมื่อใช้เทคนิค BOX-PCR มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ระดับ 0.82 และเมื่อใช้เทคนิค ERIC-PCR ไอโซเลตที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ *Streptomyces* -13 และ –84 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.85 และเมื่อนำมาตรวจสอบความเป็นไปได้ในการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Streptomyces* ทุกไอโซเลต โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Nf และ Nr ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับชิ้นส่วนของยีนที่ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตาย (necrotizing gene ,*Nec1*) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 460 bp. จาก *Streptomyces* –7, ขนาด 290 bp. จาก *Streptomyces* –74 ,ขนาด 200 bp. *Streptomyces* –95 ส่วนใน *Streptomyces* -55 พบหลายขนาด 380, 460, 600 และ 800 bp. ส่วนไอโซเลต *Streptomyces* –13, -15, -22, -33, -42, -78, -84, -87, -128, -PR8 และ -PR12 ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับ *Nec 1* gene

การทดสอบเบื้องต้นของประสิทธิภาพการควบคุมโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight) ของแตงโมใน blotter และระดับเรือนทดลองโดยการคลุกเมล็ดด้วย *Streptomyce* –13, -15, 33, -42, -74, -87 และ –PR12 ร่วมกับเชื้อรา *D. bryoniae* ก่อนปลูก พบว่า *Streptomyces* –15 และ -87 มีความสามารถในการควบคุมโรค seed rot ที่เกิดจากเชื้อรา *D. bryoniae* ในระยะต้นกล้าได้ดีมาก และเมล็ดแตงโมสามารถงอกได้ดีกว่าการไม่มีเชื้อ *Streptomyces* คลุกเมล็ด

ABSTRACT

Streptomyces 63 isolates were re-tested for capabilities inhibition the growth of fungus *Didymella bryoniae* by bioassay. The test was done with 2 isolates (ME2 and ME4) of fungus *D. bryoniae* isolated from melon infected leaves. The result showed that *Streptomyces* -13, -22, -95 and -128 were excellent inhibition the growth of fungus *D. bryoniae* mycelium. Other *Streptomyces* isolates also gave good inhibition including the previously reported, *Streptomyces*-13, -15, -22, -33, -37, -74, -78, -84, -87 and new finding in this study, e.g. *Streptomyces* –11, -23, -24, -26, -34, -106, -108, -132, -134, -142, -LP9, -LP39 and -LP46. The selected *Streptomyces* 16 isolates (*Streptomyces*-7, -13, -15, -22, -33, -42, -55, -74, -78, -84, -87, -95, -108, -128, -PR8 and –PR12) were examined for cellulase, chitinase, amylase and avicellase activities on substrate agar plate. The result showed that all of tested *Streptomyces* isolates produced cellulase, chitinase, amylase and avicellase. The affect of culture filtrate on the mycelium growth of fungus *D. bryoniae* was studied by culture fungus *D. bryoniae* in liquid medium containing culture filtrate from each isolate. Abnormally structure of mycelium e.g. swollen cells, distorted mycelium and low cytoplasmic contents were observed in treatments containing *Streptomyces* culture filtrate. The treated mycelium remained survival as judged by mycelium growth activity after placing the treated mycelium onto PDA. The pathogenicity of fungus *D. bryoniae* mycelium was reduced or completely lost after exposing with *Streptomyces* culture filtrate. The chromatogram of secondary metabolites in condensed culture filtrate of each *Streptomyces* was examined by paper chromatography developed in 10% citric acid. The result indicated that all *Streptomyces* isolates produced several types or groups of secondary metabolite substances. Each isolate of *Streptomyces* produced it's own pattern and position of substances which inhibit the growth of bacteria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac). In addition, the basic composition of secondary metabolites produced by each *Streptomyces* isolates was also different by means of ninhydrin and iodine tests. The presence of proteins in condensed culture filtrates was examined by SDS-PAGE. The result showed several protein bands with molecular weight 27-36 and 80-96 kDa (approximately related with molecular weight of chitinase, avicellase and cellulase) were dominant presented in sample of *Streptomyces*-22, *Streptomyces*-74 and *Streptomyces*-78.

Study on genotypic information of 15 isolates antagonistic *Streptomyces* spp. by repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) technique was carried out with BOXA1R primer, $ERIC_1R$ and ERIC2 primers. DNA fingerprint of 15 selected *Streptomyces* spp. showed clearly distinctive at species level. Using BOXA1R primer (BOX-PCR), the *Streptomyces*-87 and -95 are highly closed relationship with similarity coefficient of 0.82 while using $ERIC_1R$ and ERIC2 primer (ERIC-PCR) the *Streptomyces*-13 and –84 are highly closed relationship with similarity coefficient of 0.85. Testing for possibility to be plant pathogen by detection the *Nec1* gene (necrotizing gene) with specific PCR using Nf and Nr primers was done. Result showed that *Streptomyces* –7, -74 and -95 produced one PCR product with size 460, 290 and 200 bp., respectively, but *Streptomyces* -55 produced 380, 460, 600 and 800 bp. The *Streptomyces* –13, -15, -22, -33, -42, -78, -84, -87, -128, -PR8 and –PR12 were not found amplified DNA fragment related to *Nec*1 gene.

Preliminary test for biological control efficacy was investigated by seed coating with *Streptomyces*-13, -15, -33, -42, -74, -87 and –PR12 and mycelium of fungus *D. bryoniae.* The treated seeds in all treatments were tested by blotter and green house condition. Result showed that the *Streptomyces* –15 and -87 significantly reduced seed rot caused by fungus *D. bryoniae*, enhance germination percentage and growth of watermelon seedlings.