



วิทยานิพนธ์

การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทเพื่อควบคุม
โรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

SELECTION AND IMPROVMENT OF ACTINOMYCETE
STRAINS FOR CONTROL THE ROOT
AND STEM ROT OF TOMATO

นางสาวประภัศร รักถาวร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

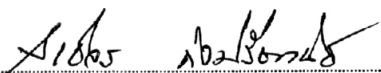
เรื่อง การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทเพื่อควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

Selection and Improvement of Actinomycete Strains for Control the Root and Stem Rot of Tomato

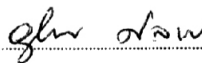
นามผู้วิจัย นางสาวประภัสสร รักถาวร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

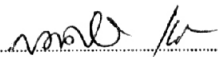
ประธานกรรมการ

(
รองศาสตราจารย์เกียรติคุณ กิจปรีชาวิช, Dr.Eng.)

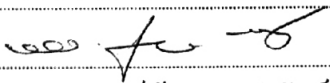
กรรมการ

(
อาจารย์อุไรวรรณ คิลกคุณานันท์, วท.ม.)

กรรมการ

(
รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(
รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(
รองศาสตราจารย์วินัย อางคหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 8 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทเพื่อควบคุม
โรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

Selection and Improvement of Actinomycete Strains for Control the
Root and Stem Rot of Tomato

โดย

นางสาวประภัศร รักถาวร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2551

ประภัศร รักถาวร 2551: การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทเพื่อ
ควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา:
รองศาสตราจารย์เชิษฐ์ กิจปรีชาวนิช, Dr.Eng. 118 หน้า

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 197 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท ที่
สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Fusarium sporotrichiodes*, *Rhizoctonia*
solani และ *Sclerotium rolfsii* ได้ดี เมื่อเหนี่ยวนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉาย
รังสีแกมมา พบว่า มีเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ SG4I-17 SG4I-38 และSJ9I-
15 ที่ควบคุมโรคได้สูงกว่าสายพันธุ์แม่ ซึ่งได้แก่ SG4 และ SJ9 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท SG4
ในอาหารเหลวไคติเน เป็นเวลา 10 วัน มีปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้สูงสุด 0.032 เปอร์เซ็นต์
น้ำหนักต่อปริมาตร และสารที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii*
เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนเชื้อ SJ9 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น
เวลา 5 วัน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 24.9 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร การใช้เชื้อแอคติ
โนมัยสีท ร่วมกับสารละลาย swollen chitin ในดินมีผลต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือ
เทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* หลังการทดสอบในกระถางปลูก เป็นเวลา 14 วัน ได้ดีกว่าการใช้เชื้อ
แอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว 6-13 เปอร์เซ็นต์ การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท SG4I-38 และ SG4 มีผล
ให้ต้นมะเขือเทศรอดตายได้สูง 73.3 และ 66.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทาง
สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าจากทั้ง 2 วิธี มีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส เท่ากับ 4.3 และ
5.5 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้งตามลำดับ และมีปริมาณสารสกัดหยาบสูงเท่ากับ 0.037 และ 0.034
เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง และสารที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโต
ของเชื้อรา *S. rolfsii* เท่ากัน คือ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร การใช้เชื้อผสมระหว่าง SG4 และ
SG4I-38 ในดินร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีผลให้ต้นมะเขือเทศรอดตายสูงกว่าการใช้เชื้อผสม
คู่อื่น โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่นร้อยละ 95 พบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส เท่ากับ 5.4 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง และมี
ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 0.039 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง และสารที่ได้มีค่า
ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* เท่ากับ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

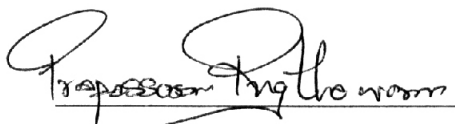
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒๗ มิถุนายน ๒๕๕๑

Prapassorn Rugthaworn 2008: Selection and Improvement of Actinomycete Strains for Control the Root and Stem Rot of Tomato. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Vichien Kitpreechavanich, Dr.Eng. 118 pages.

Four isolates out of 197 isolates were selected by using the ability to produce chitinase and to inhibit the growth of plant pathogenic fungi; *Fusarium sporotrichiodes*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. To increase antifungal activity of the selected isolates, gamma irradiation were applied. Three isolates of mutant strains; SG4I-17, SG4I-38 and SJ9I-15 showed higher tendency on antifungal activity than wild type strains; SG4 and SJ9. The strain SG4 gave the highest yield of crude extract 0.032 % (w/v) after growing on liquid chitin medium for 10 days, and its MIC against the growth of *S. rolfsii* was 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, which was the lowest. The strain SJ9 produced the highest chitinase activity, which was 24.9 mU/ml after 5 days cultivation. Application of each actinomycete strain with swollen chitin decreased tomato stem and root rot diseased caused by *S. rolfsii* in pot soil for 14 days, 6-13% higher than applying actinomycete alone. The strains SG4I-38 and SG4 showed high survival of tomato plant, 73.3 and 66.6%, respectively that no significantly difference at confident interval of 95%. The two treatments gave chitinase activity, 4.3 and 5.5 mU/g dried soil, and the crude extract, 0.037 and 0.034 % (g/g dried soil), respectively with their MIC to inhibit the growth of *S. rolfsii* was the same at 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Application of mixed strains between SG4 and SG4I-38 with swollen chitin gave resulted 73.3 % survival plant which was higher than other mixed strains with significantly difference at confident interval of 95%. Chitinase activity, 5.4 mU/g dried soil and the highest yield of crude extract, 0.039 % (g/g dried soil) with its MIC to inhibit the growth of *S. rolfsii* at 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ were detected.


Student's signature


Thesis Advisor's signature


27 March 2008

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ อาจารย์อุไรวรรณ คิลกคุณานันท์ กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก และ
รศ. ดร. สมศิริ แสงโชติ กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนทั้งในด้านการ
เรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบ
ขอบพระคุณ รศ. ดร. เสาวนีย์ สาธรวิริยะพงศ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจ
แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ และคุณณัฐยาน์ เปี้ยแดง ที่ได้พิจารณา
มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุก
ท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป
ขอขอบพระคุณสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับ
สถานที่ในการค้นคว้าวิจัย ขอขอบคุณ คุณอุดมลักษณ์ สุขอัครตะ หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการ
เทคโนโลยีสมุนไพรฯ สถาบันผลิตผลเกษตรฯ สำหรับการช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน และให้
คำปรึกษาในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกท่านทั้งที่หน่วย
ปฏิบัติการเทคโนโลยีสมุนไพรฯ และห้องปฏิบัติการ 4309 ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือใน
ด้านต่างๆ จนงานสำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว น้องสาว และญาติสนิททุกๆ ท่าน รวมทั้งผู้มีพระคุณที่
มิได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ทุกท่าน สำหรับความรัก ความห่วงใย ความเข้าใจ และกำลังใจที่มีให้มา
ตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่ครูบาอาจารย์ และ
ผู้มีพระคุณทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอรับไว้เพียงผู้เดียว

ประภัสสร รักถาวร

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	39
สรุปผลการทดลอง	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	89
ภาคผนวก ข ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีตที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส	93
ภาคผนวก ค ภาพประกอบการทดลอง	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้ง และปูที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลในสหรัฐอเมริกาและจากทั่วโลก	11
2	การกระจาย และองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบไคตินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	11
3	ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ <i>F. sporotrichiodes</i> บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน	40
4	ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ <i>R. solani</i> บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน	41
5	ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ <i>S. rolfsii</i> บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน	42
6	ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช (ทั้ง 3 ชนิด) บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช	46
7	ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลว chitin medium เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 และ 10 วัน ในการผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา <i>S. rolfsii</i>	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของด้้นมะเขือเทศ หลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่ใส่และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	50
9	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ปริมาณ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. rolf sii</i> ของสารสกัดหยาบที่สกัดจากดินหลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	51
10	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินจากวิธีการต่าง ๆ หลังเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีท เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศร่วมกับสารละลาย swollen chitin	57
11	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของด้้นมะเขือเทศ หลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของ มะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	60
12	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ปริมาณ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. rolf sii</i> ของสารสกัดหยาบที่สกัดดินหลังควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา <i>S. rolf sii</i> โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	61
13	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินจากวิธีการต่าง ๆ หลังเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสม เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของด้้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา <i>S. rolf sii</i> ร่วมกับสารละลาย swollen chitin	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน	94
ข2 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท SA6 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน	97
ข3 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน	100
ข4 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท SJ9 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน	102

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของไคติน	10
2 การแตกพันธะไกลโคซิดิกของเอนไซม์ไคตินเอส	12
3 การย่อยไคตินโดยกระบวนการ glycohydrolases ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป amomeric configuration (ก) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป inversion configuration (ข)	14
4 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลว chitin medium เป็นเวลา 5 และ 10 วัน	47
ภาพผนวกที่	
ก1 ลักษณะบริเวณไสروبโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารวุ้น chitin medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	105
ก2 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา <i>F. sporotrichiodes</i> (ก), <i>R. solani</i> (ข) และ <i>S. rolfsii</i> (ค) บนอาหาร chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคฟิช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีท ก่อนเพาะเชื้อราโรคฟิชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน	106
ก3 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท SG5 ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา <i>F. sporotrichiodes</i> (ก), <i>R. solani</i> (ข) และ <i>S. rolfsii</i> (ค) บนอาหาร chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคฟิช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีท ก่อนเพาะเชื้อราโรคฟิชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน	107
ก4 ลักษณะเชื้อรา <i>F. sporotrichiodes</i> (ก), <i>R. solani</i> (ข) และ <i>S. rolfsii</i> (ค) ที่เจริญบนอาหาร chitin medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน	107
ก5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์แม่ รหัส SG4 (ก), สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SG4I-17 (ข) และรหัส SG4I-38 (ค) ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา <i>S. rolfsii</i> บนอาหาร chitin medium	108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค6 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์แม่ รหัส SJ9 (ก) และ สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SJ9I-15 (ข) ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา <i>S. rolf sii</i> บนอาหาร chitin medium	108
ค7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา <i>S. rolf sii</i> ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสิท ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว chitin medium	109
ค8 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> ในระดับกระถางปลูก	110
ค9 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> ในระดับกระถางปลูก	111
ค10 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิท รหัส SG4I-38 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin (ก) และการใช้เชื้อ SG4I-38 เพียงอย่างเดียว (ข) ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>S. rolf sii</i> เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่เพาะเชื้อโรคพืชเพียงอย่างเดียว (ค)	112
ค11 อาการโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา <i>S. rolf sii</i>	113
ค12 สภาพแปลงปลูกพืชทดลอง	113
ค13 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยสิทรหัส SG4 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และไดคัลลิ่งจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)	114
ค14 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยสิทรหัส SG4I-17 บนจานเพาะเลี้ยง(ก) และไดคัลลิ่งจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค15 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4I-38 บนจานเพาะเลี้ยง(ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)	116
ค16 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SJ9 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (ข)	117
ค17 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SJ9I-15 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)	118

การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทเพื่อควบคุม โรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

Selection and Improvement of Actinomycete Strains for Control the Root and Stem Rot of Tomato

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเพาะปลูก ผลผลิตส่วนใหญ่ นอกจากการบริโภคและอุปโภคในประเทศแล้ว ยังส่งเป็นสินค้าออกไปจำหน่ายต่างประเทศอีกด้วย แต่การเกษตรของไทยนั้นยังได้รับผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้สาเหตุหนึ่งมาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่ง 80 เปอร์เซ็นต์เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการใช้สารเคมีในการป้องกัน และกำจัดโรคพืช ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีผลทำให้เชื้อดื้อยา จึงทำให้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลกระทบต่อธรรมชาติ สิ่งแวดล้อม และการส่งออกสินค้าทางการเกษตรของไทย อันเนื่องมาจากพิษของสารเคมีตกค้างในผลิตผลเกษตร ปัจจุบันภาครัฐได้มีการส่งเสริมการปลูกพืชในระบบการจัดการคุณภาพทางเกษตรกรรมที่ดี เหมาะสม หรือ GAP (Good Agricultural Practice) เพื่อให้สามารถส่งออกผลิตผลทางการเกษตรไปยังต่างประเทศได้ตามเกณฑ์กำหนดของประเทศคู่ค้าโดยไม่เกิดปัญหา และเพื่อให้เกิดความปลอดภัยในด้านสุขอนามัยแก่ผู้บริโภค และเกษตรกรผู้ผลิตพืชผลต่าง ๆ โดยการพยายามส่งเสริมให้เกษตรกร ลด ละ การใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืช และเพื่อให้การส่งเสริมการทำเกษตรในระบบ GAP ประสบความสำเร็จ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการควบคุมโรคพืชโดยวิธีที่ไม่ต้องพึ่งพาสารเคมีในการควบคุมโรคพืช

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) เป็นอีกแนวทางในการควบคุมโรคพืชที่รักษาระบบนิเวศน์ และสมดุลของธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ตลอดจนช่วยลดอัตราการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมใช้ในการควบคุมโรคพืชในปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum*. และ *Gliocladium virens* (จิระเดช และคณะ, 2538; วรรณวิไล และจิระเดช, 2540) และ *Chaetomium* spp. (เกษม, 2532) ซึ่งสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Phythium aphanidermatum*, *Phytophthora* spp., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* สำหรับเชื้อ

แบคทีเรีย ได้แก่ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 สามารถควบคุมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สาเหตุโรค crown gall ของพืชได้ *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus* spp. สามารถควบคุมเชื้อ *Phythium aphanidermatum* (จิระเดช, 2531)

แอคติโนมัยซีตเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่มีการนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ (Goodfellow *et al.*, 1988) Samac *et al.* (2003) รายงานว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดได้ดี และได้นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบรากและเมล็ด Gesheva (2002) ได้ใช้เชื้อแอคติโนมัยซีต ในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Micromonospora* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย และเชื้อราซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides azalomycin B ในการควบคุมเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆ ในดินของสวนส้มและมะนาว นอกจากความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วเชื้อแอคติโนมัยซีตยังสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสที่มีสมบัติในการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราได้อีกด้วย (Monreal and Reese, 1969; Gooday, 1994) Gomes *et al.* (2000) พบว่า เอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* ซึ่งแยกจากดินที่บริเวณ cerrado ในตอนกลางของประเทศบราซิล สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* และ *Aspergillus parasiticus* เป็นต้น

แม้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตเป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้เป็นอย่างดี แต่ยังไม่พบรายงานการนำเชื้อแอคติโนมัยซีต และไคตินไปใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราโรคพืช อันเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ไคตินเอสที่เชื้อแอคติโนมัยซีตผลิตขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือก และปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยซีตให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี รวมทั้งพัฒนารูปแบบใหม่ในการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีตร่วมกับสารละลาย swollen chitin เพื่อควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช
2. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้สูงขึ้น
3. การศึกษา การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับ swollen chitin ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในระดับกระถางปลูก

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เชื้อแอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก บางชนิดติดสี acid fast ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้รา มีความแตกต่างจากเชื้รา คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่มีไมโทคอนเดรีย และที่สำคัญเชื้อแอคติโนมัยสีทจะถูกยับยั้งการเติบโตได้โดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้รา (Cross and Goodfellow, 1973; Alexander, 1991) เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีปริมาณ % G+C content ในเซลล์มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Ruan, 1994) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีทยังประกอบไปด้วยมิวโคเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วย n-acetyl muramic acid และ diaminopimelic acid, glutamic acid, glycine และ alanine (Davis, 1973) ในปี ค.ศ. 1997 Stackebrandt และคณะ ได้เสนอการจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16s rDNA โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทจัดอยู่ใน Class Actinobacteria วงศ์ Actinomycetales

เชื้อแอคติโนมัยสีท ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ (saprophytic) และบางชนิดเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช (Williams *et al.*, 1989) โดยทั่วไปมีถิ่นอาศัยในดิน แต่ก็พบแพร่กระจายใน น้ำ อากาศ อาหาร และพืช แหล่งที่พบมาก ได้แก่ บริเวณที่มีการสะสมของสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก ปุ๋ยหมัก วัตถุเน่าเปื่อยโคลนตม ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน ป่าชายเลน และดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) เป็นต้น (Alexander, 1991; Hayakawa *et al.*, 1988) ปริมาณแอคติโนมัยสีทในดินขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพ พีเอช (pH) และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน โดยทั่วไป ในดินจะมีเชื้อแอคติโนมัยสีทอยู่ในช่วง 10^5 - 10^8 เซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobe) ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการ (obligate anaerobe) หรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (facultative anaerobe) (Williams *et al.*, 1989) ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทจะพบในชั้นดินที่อยู่ลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร และจะพบในส่วนของดินที่ลึกไม่เกิน 1 เมตร (Alexander, 1991; Kim, 1992; Sylvia *et al.*, 1998) เชื้อเติบโตได้ดีในดินที่มีค่า pH 6.5-8.0 (Williams *et al.*, 1989) จึงพบว่า ในดินที่แห้ง และมีสภาพเป็นด่างจะพบเชื้อแอคติโนมัยสีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งพบสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสีทจะลดลงในดินที่เปียกชื้น และมีสภาพเป็นกรด (Alexander, 1991) เชื้อแอคติโนมัยสีท

ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส, มอลโตส, กลีเซอรอล เป็นต้น และมักจะทนความเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ขึ้นไป สำหรับเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัว และมีความหนาแน่นมากที่สุด จัดเป็นสมาชิกสกุลสำคัญมีมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด (Williams *et al.*, 1989) ทั้งนี้เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตได้เร็ว และมีปริมาณมากในธรรมชาติ (Goodfellow *et al.*, 1988; Yuan and Crawford, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000)

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) และลักษณะการเจริญ (cultural characteristics) ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลายมีตั้งแต่กลุ่มที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีท เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างเส้นใยที่เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงไปใต้อู้น และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) โดย substrate mycelium จะเติบโตบนผิวหน้าอาหารก่อน และแทงเส้นใยเข้าไปในอาหารเพื่อนำสารอาหารไปใช้อย่างเต็มที่ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium จะเกิดขึ้นมาภายหลัง และชูขึ้นไปในอากาศเพื่อทำหน้าที่หลัก คือ สืบพันธุ์ สำหรับโคโลนีที่เจริญ aerial mycelium จะสร้างขึ้นใน สภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้น aerial mycelium จึงต้องมี hydrophobic sheath เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ เส้นใยใต้ผิวอาหารจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.8 ไมโครเมตร ส่วนเส้นใยเหนือผิวอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ตั้งแต่ 1.0-1.4 ไมโครเมตร

โดยทั่วไปลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีหลายแบบ ได้แก่

1. โคโลนีแบบหยาบ หรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวม ๆ สร้าง aerial mycelium ปกคลุมผิวหน้าอาหาร (มักพบในแอคติโนมัยสีทที่มีการเติบโตในระยะ transient mycelial ที่มีการเติบโตของ mycelia ไม่แน่นอน)
2. โคโลนีไม่มี substrate mycelium มี aerial mycelium ที่ยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนพิเศษที่เรียกว่า holdfast
3. โคโลนีที่มีลักษณะเกาะกันคล้ายแผ่นหนังสร้าง aerial mycelium ที่มีลักษณะค่อนข้างโป่งยึดกับ substrate ด้วยเส้นใยที่แทงลงไปอาหาร (substrate mycelium) สำหรับอาหาร

เหลวเรียกเส้นใยเหนือผิวอาหารว่า generative mycelium และเส้นใยที่อยู่ในอาหารว่า vegetative mycelium

ผิวโคโลนีจะมีลักษณะเรียบ หรือขรุขระ มีหลายสี ได้แก่ ขาว แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง (Metting, 1992) สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสกุลของเชื้อได้ ซึ่งสีของโคโลนีที่เห็นเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน และสามารถเปลี่ยนตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทเพื่อให้สร้างสปอร์ คือ ISP2 (International *Streptomyces* Project) และส่วนใหญ่ด้านล่างของโคโลนีเส้นใยอาหารจะเป็นสีน้ำตาล แต่อาจจะพบสีอื่นๆ เช่นเดียวกับสีสปอร์ได้ นอกจากนี้เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทยังสามารถผลิตตรงक्टูอื่นที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces coelicolor* A3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE medium สามารถผลิตสาร actinorhodin ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำเงิน มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ (Onaka *et al.*, 1998) นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังผลิตสาร geosmin (tran-1,10-dimethyl decalol) ที่มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายดิน (earth odor) (Williams *et al.*, 1989) ซึ่งสามารถใช้แต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหารได้อีกด้วย (Dionigi, 1993)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทโดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ คือ แบบ mycelium fragmentation มีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ และแบบ sporulation หรือการสร้างสปอร์ (conidia) บนเส้นใยที่มีทั้งเป็นเม็ดเดี่ยวๆ และเรียงต่อกันเป็นสายรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ สายสปอร์แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบคูป (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) นอกจากนี้ยังมีแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* จะมีการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาวของ aerial mycelium โดยเซลล์ขยายใหญ่ และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า chlamydo-spore หรือ arthrospore (Mendez *et al.*, 1985)

2. บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีท

เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายชนิด เช่น โคติเนส เซลลูเลส กลูโคสไอโซเมอเรส ตลอดจนมีการนำเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไปใช้ประโยชน์ในการรักษา

ระบบนิเวศน์ และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เนื่องจากบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุหลายชนิดในดินเช่น ไคติน เซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น

2.1 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ เชื้อ *Streptomyces nodosus* สามารถผลิตสารพอลิไทด์ซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อราเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มพอลิอิน สารที่สำคัญได้แก่ amphotericin B (Caffrey *et al.*, 2001) และ nystatin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *S. noursei* (Brautaset *et al.*, 2000) โดยสารเหล่านี้จะเข้าไปจับตัวได้ดีกับเอร์โกสเตอรอล ซึ่งเป็นสารสเตอรอลที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา แต่จะจับกับคอเลสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ได้ไม่ดี ผลการจับทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย โดยพบว่าจำนวนพันธะคู่ในโครงสร้างของพอลิอิน ส่งผลต่อระดับความรุนแรงของการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา (McGinnis and Rinaldi, 1996; Andriole, 2000) เช่นการใช้ amphotericin B และ nystatin ซึ่งมีจำนวนพันธะคู่ 7 ตำแหน่ง (heptaene) และ 4 ตำแหน่ง (tetraene) ตามลำดับ จะให้ผลในการรักษาได้เท่ากันเมื่อใช้ amphotericin B ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่า nystatin

นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มพอลิอิน เช่น สาร candididin ที่ผลิตจากเชื้อ *S. griseus* (Campelo and Gil, 2002) และสาร polyoxin ที่มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา และสาร anthracycline สามารถต้านการเติบโตของเชื้อราได้ โดยไปยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้ และนอกจากสาร anthracycline จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแล้วยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย และสาร limocrocin ที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถต้านเซลล์มะเร็ง โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุโรค จึงส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Goodfellow *et al.*, 1988) จากการศึกษาของ Kelly *et al.* (2008) พบว่า เชื้อ *Streptomyces sahachiro* สามารถผลิตสาร azinomycin B ที่มีผลต่อการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูทดลอง

นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Microbispora* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่เรียกว่า glucosylquestiomycin ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ได้ (Igarachi *et al.*, 1998) *Microtetraspora* sp. ผลิตสารในกลุ่ม macrolactam trisaccharide ซึ่ง

สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราได้ (Hedge *et al.*, 1998) และเชื้อ *Saccharothrix* sp. ผลิตสารชนิดใหม่ที่เรียกว่า formamycin ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา (Igarashi *et al.*, 1998)

Jiun-Yan *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *Streptomyces padanus* PMS-702 ที่แยกจากซากเห็ดที่ย่อยสลายที่เกาะชินจู ประเทศไต้หวัน มีความสามารถในการผลิตสาร fungichromin ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราได้หลายชนิด และสามารถควบคุมโรคเน่าระดับดินที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Rhizoctonia damping-off* ของต้นกะหล่ำปลี และมะเขือเทศ (Shih *et al.*, 2003) และมีรายงานการใช้ สาร fungichromin ในการรักษาการติดเชื้อยีสต์ที่บริเวณผิวหนัง (Festo, 2006; Hedgpeth, 2005; Wong, 2006)

2.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์

เชื้อแอคติโนมัยซีทในธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นที่อยู่อาศัยในดินจะมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืช และสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีหลายสายพันธุ์จะช่วยกันย่อยสลายสารพวก กรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง ไขมัน และ โปรตีน รวมทั้งอินทรีย์วัตถุหลายชนิดในดินเช่น ไคติน เซลลูโลส ลิกนิน (Alexander, 1991; ชาญวิทย์ และคณะ, 2546) นอกจากนี้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomonospora* ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* หลายสายพันธุ์มีความสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Czoch and Mordarski, 1988)

เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซลเลนที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* เช่น *S. flavogriseus* และ *S. lividans* และพบว่า การใช้เอนไซม์ไซลเลนสที่ผลิตจากเชื้อ *S. lividans* ร่วมในกระบวนการฟอกขาว จะสามารถเพิ่มความขาว (brightness) ในเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็งที่มีความขาว 89.5 เปอร์เซนต์ ส่วนเชื้อไม้เนื้ออ่อนให้ความขาว 93 เปอร์เซนต์ (Senior *et al.*, 1992)

จากการศึกษาของ Czoch and Mordarski (1988) พบว่า เชื้อ *S. griseus*, *S. antibioticus* และ *Amycolatopsis orientalis* เป็นเชื้อที่สำคัญที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคตินได้เป็น chitobiose และ chitotrose นอกจากนั้นเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* สามารถย่อย

สลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้หลายชนิด เช่น *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* และ *Collectotrichum gloeosporioides* เป็นต้น (Gome et al., 2001)

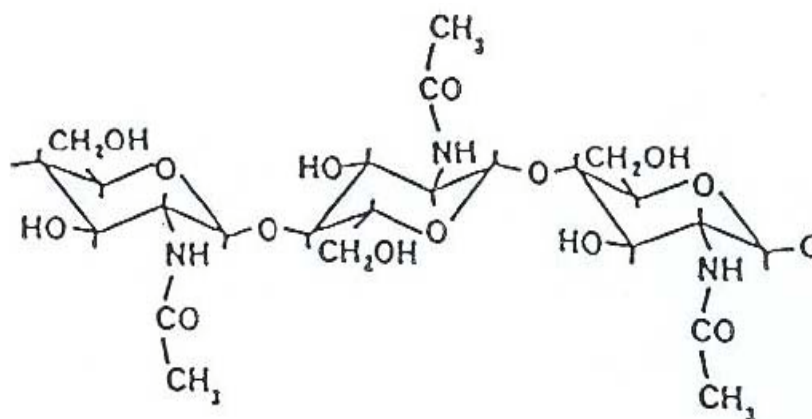
จากการศึกษาของ Stamford et al. (2001) พบว่า เอนไซม์ α -amylase ที่ทนร้อนที่ผลิตโดยเชื้อ *Nocardopsis* sp. ที่เลี้ยงเชื้อในอาหาร Starch-Czapek เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถนำไปใช้ย่อยแป้งในอุตสาหกรรม โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที และยังมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ glucoamylase ที่ทนร้อน จากเชื้อ *Streptosporangium* sp. เพื่อนำไปใช้ย่อยแป้งในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร Starch-Czapek เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที

นอกจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแล้วยังมีการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น การศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย aliphatic-aromatic copolyesters ที่เป็นพิษต่อระบบนิเวศน์ พบว่า เชื้อ *Thermomonospora fusca* สามารถย่อยสลายหน่วยย่อยของ copolyesters ได้แก่ 1,4-butanediol, terephthalate และ adipate ได้ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร defined synthetic medium ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 วัน (Witt et al., 2001)

3. ไคติน

3.1 ลักษณะโครงสร้างของไคติน

ไคติน มีสูตรโมเลกุลคือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซ้ำกัน น้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ β -N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamid-2-deoxy-D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4- glucosidic linkage ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมโนแซคคาไรด์ตัวถัดไป ดังภาพที่ 1 ไคตินมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรงยาว ไม่มีกิ่งก้านสาขา มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็น $NH-CO-CH_3$ แทนที่จะเป็น $-OH$ group ในโมเลกุลเซลลูโลส (Gooday, 1994; Cottrell et al., 1999) ไคตินเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดบางชนิด เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน และกรดฟอสฟอริก เป็นต้น (Deshpande, 1986)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไคติน

ที่มา: Gooday (1994)

3.2 แหล่งของไคติน

ไคตินเป็นสารที่พบมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส (Shaikh and Deshpande, 1993; Wang and Chang, 1997) เป็นทรัพยากรที่สำคัญของสิ่งแวดล้อมทั้งในทะเลและบนบก (Tsujibo *et al.*, 1991) โดยเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใยยืดหยุ่นต่าง ๆ ให้เป็นแผ่น และเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะ และสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ (ปิยะบุตร และสุวดี, 2542) ส่วนใหญ่ในสัตว์จะพบไคตินอยู่กับคิวติเคิลที่ผิวหนังของอภิปิธิเลียม ในยีสต์พบในส่วนที่กำลังแตกหน่อ แต่ส่วนมากจะพบในเปลือกของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น โปรโตซัว นิมาโทด ในโครงสร้างชั้นนอกของแมลง กุ้ง ปู แคนกลาง ปลาหมึก และหอย (Cody *et al.*, 1990) จากการศึกษาพบว่าเปลือกของกุ้ง และปูมีไคตินประมาณ 14-27 เปอร์เซ็นต์ (Moiseev, 1981) และในปีหนึ่งๆ จะมีไคตินจากเปลือกกุ้ง และปูในทะเลถึงหนึ่งร้อยล้านตัน และเป็นไคตินที่ได้จากของที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล โดยเฉพาะในกระบวนการแปรรูปกุ้ง และปู ประมาณ 1.2×10^5 เมตริกตันต่อปี ดังแสดงในตารางที่ 1 (Knorr, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าในผนังเซลล์ของเชื้อราชั้นสูงมีไคตินเป็นองค์ประกอบหลักสูงถึง 22-44 เปอร์เซ็นต์ (Monreal and Reese, 1969; Gooday, 1994)

ไคตินเป็นสารโครงสร้างที่มักอยู่ร่วมกับสารชนิดอื่น เป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น ใน exoskeleton ของแมลง ไคตินจะอยู่ร่วมกับโปรตีน ในหอยเปลือกแข็งพบไคตินอยู่กับแคลเซียม

คาร์บอนและโปรตีน ส่วนไคตินที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะอยู่ร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ (Deshpande, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้ง และปูที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลใน สหรัฐอเมริกาและจากทั่วโลก

ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักแห้งของเหลือทิ้ง		ไคติน	
	10 ³ เมตริกตัน		10 ³ เมตริกตัน	
	สหรัฐอเมริกา	ทั่วโลก	สหรัฐอเมริกา	ทั่วโลก
ปลาขาว	-	154	-	39
ปู	17	-	6	-
กุ้ง	78	-	39	-
เคย	-	801	-	56
หอยนางรม	-	482	-	22
ปลาหมึก	-	21	-	1
รวม	95	1,458	45	118

ที่มา: Knorr (1991)

ตารางที่ 2 การกระจาย และองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบไคตินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

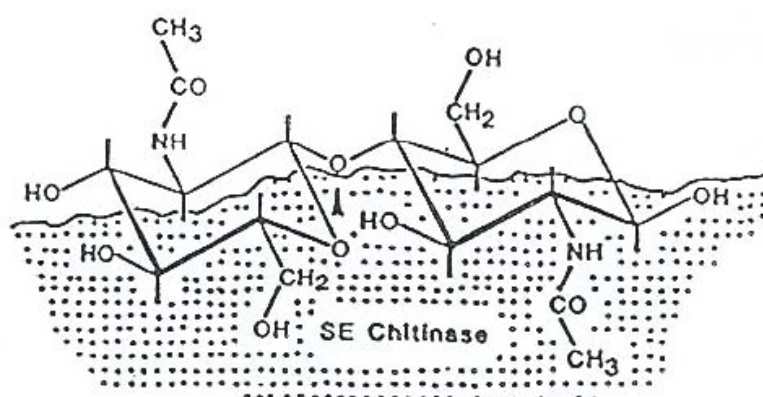
สิ่งมีชีวิต	โครงสร้าง	สารประกอบอนินทรีย์	สารประกอบอินทรีย์
เชื้อรา	ผนังเซลล์	-	กลูแคน และแมนแนน
สาหร่าย: chlorophyceae	ผนังเซลล์	-	เซลลูโลส
โปรโตซัว	ผนังถุงชีสต์ และ เปลือก	เหล็ก และซิลิกา	โปรตีน และไขมัน
หนอนมีข้อปล้อง	เปลือก และเขี้ยว	ไม่สามารถระบุ	โปรตีน
หอย ปลาหมึก	ขากรรไกร, เขี้ยว และ เปลือก	แคลเซียม, เหล็ก และซิลิกา	คอนไกลิน และ โปรตีน
แมลง	เปลือก	แคลเซียม	อาโรโพดิน และ มูเซอร์

ที่มา: Deshpande (1986)

3.3 เอนไซม์ย่อยสลายไคติน และการทำงาน

ในธรรมชาติส่วนใหญ่ไคตินจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไคตินเนส (Gooday, 1994) เอนไซม์ไคตินเนส (EC.3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายยาวที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของ *N*-acetyl-D-glucosamine (*N*-acetyl-2-amido-2-deoxy-D-glucopyranose) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4- glucosidic linkage ไปอยู่ในรูป *N*-acetyl-glucosamine (NAG) โดยการทำงานร่วมกันของ Chitinolytic enzyme ซึ่งประกอบด้วย endo-chitinase, exo-chitinase และ chitinase (Vyas and Deshpande, 1989)

ไคตินเนสเป็นเอนไซม์ที่แตกพันธะระหว่าง C1 และ C4 หรือพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ของ GlcNAc ที่ต่อกันเป็นไคติน ดังแสดงในภาพที่ 2 สิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบของร่างกายจะผลิตเอนไซม์ไคตินเนสด้วย แต่บางชนิดที่ไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ ได้แก่ แบคทีเรีย และพืชชั้นสูง (Flach *et al.*, 1992)



ภาพที่ 2 การแตกพันธะไกลโคซิดิกของเอนไซม์ไคตินเนส

ที่มา: Hara *et al.* (1989)

Robbins *et al.* (1988) แบ่งเอนไซม์ไคตินเนสออกเป็น 3 ชนิด คือ (1) endo-chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มได้ diacetylchitobiose และ triacetylchitotriose เป็นส่วนใหญ่ (2) chitinase จะย่อย dimer หรือ diacetylchitobiose หรือย่อยไคตินทีละหนึ่งหน่วย จากปลาย non-reducing เป็น *N*-acetyl-glucosamine (NAG) ก็ได้ และ (3) exo-chitinase จะย่อย diacetylchitobiose หรือไคตินจากปลาย non-reducing sugar ทีละหนึ่งหน่วย

Ulhoa and Peberdy (1992) รายงานว่า เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินทำงานต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน คือ ไคตินเอสย่อยไคตินเป็นโอลิโกเมอร์ และได้ไคเมอร์เป็นสำคัญ จากนั้นไคเมอร์จะถูกย่อยด้วยไคโตไบเอสเป็น *N*-acetyl-glucosamine (NAG) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Vyas and Deshpande (1989) ไคตินจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์เป็น NAG โดยการทำงานอย่างต่อเนื่องของเอนไซม์ endo-chitinase และ chitobase นอกจากนี้ยังมี exo-chitinase ที่จะย่อยไคตินจากปลาย non-reducing โดยจุลินทรีย์ที่มีระบบการทำงานแบบนี้ได้แก่ *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Serratia* และ *Streptomyces* เป็นต้น

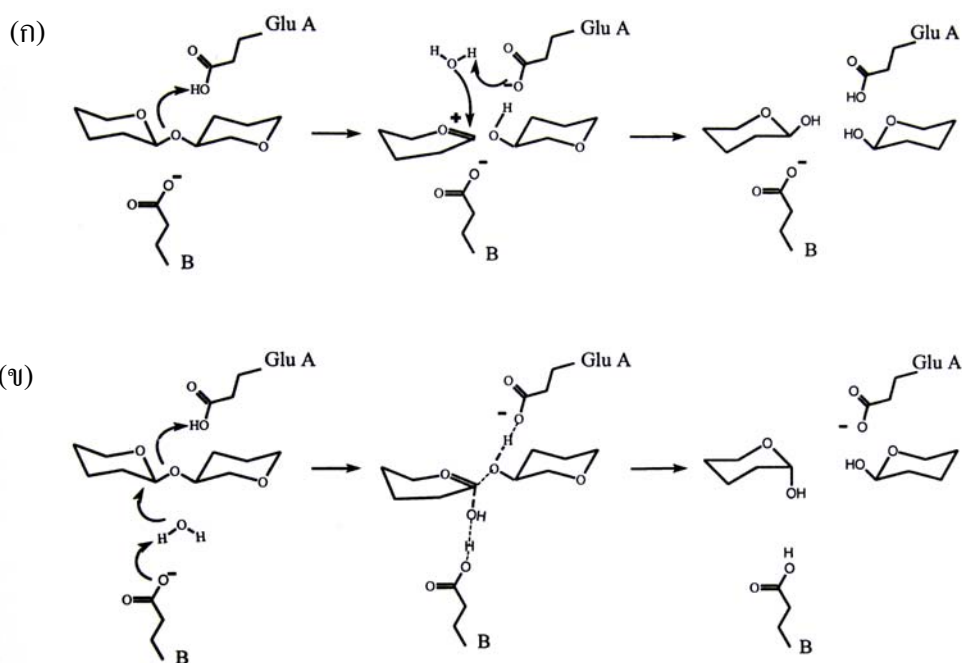
Flach *et al.* (1992) ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์ย่อยไคตินไว้ 4 ชนิด คือ endo-chitinase, exo-chitinase (EC 3.2.1.14), β -*N*-acetyl-glucosaminidase และ chitobiase

1. endo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้สายพอลิเมอร์ของไคตินแยกออกจากกัน
2. exo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไคตินแล้วได้ chitobiose
3. chitobiase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย chitobiose ได้ GlcNAc
4. *N*-acetyl-glucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยภายในสายไคตินได้ GlcNAc

Shaikh and Deshpande (1993) ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์ย่อยไคตินไว้ 2 ชนิดหลัก คือ endo-chitinase (EC 3.2.1.14) และ *N*-acetyl-glucosaminidase (Chitobiase: EC 3.2.1.30 หรือ *N*-acetyl-hexosaminidase: EC 3.2.1.52) ต่อมาเมื่อเพิ่มมา คือ exo-chitinase

1. endo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแบบสุ่มในสายโซ่ของ *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) ซึ่งจะได้ diacetylchitobiose เป็นผลผลิตหลัก และได้ triacetylchitotriose บ้างเล็กน้อย
2. *N*-acetyl-glucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย dimer (diacetylchitobiose) โดยที่บางครั้งเอนไซม์จะย่อยหน่วยของ GlcNAc จากปลายด้าน non-reducing ของสายโซ่ไคติน
3. exo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นทำให้เกิดการแตกตัวของ diacetylchitobiose จากปลาย non-reducing ของสายไคติน

Sinnott (1990) รายงานว่าในกระบวนการย่อยสลายไคตินสามารถเกิดขึ้นได้ 2 แบบด้วยกัน โดยแบบที่ 1 ผลึกภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป amomeric configuration และแบบที่ 2 ผลึกภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป inversion configuration (ภาพที่3)



ภาพที่ 3 การย่อยไคตินโดยกระบวนการ glycohydrolases ผลึกภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป amomeric configuration (ก) และผลึกภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูป inversion configuration (ข)

ที่มา : Sinnott (1990)

3.4 แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน

เอนไซม์ไคตินเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืชสามารถพบเอนไซม์ไคตินเนสได้ในเมล็ดถั่ว *Phaseolus vulgaris* และใน emulsion ของ sweet almonds (Monreal and Reese, 1969; Deshpande, 1986) นอกจากนั้นยังพบในสัตว์หลายชนิด เช่น ในหอยทาก แมลง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เช่น โปรโตซัว หนอนตัวกลม หอย ปลาหมึก ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลากินแมลง สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลื้อยคลานซึ่งพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสจะหลั่งออกมาจากตับอ่อน และเนื้อเยื่อชั้นในของกระเพาะ

ในจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งเอนไซม์ไคตินเอสที่สำคัญ และพบเอนไซม์นี้ได้ในจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น จากเชื้อรา *Trichoderma*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Mucor*, *Beauveria*, *Lycopodon* และ *Aspergillus* ในยีสต์พบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Deshpande, 1986; Gooday, 1994) และในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Serratia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* และ *Streptomyces* (Kobayashi *et al.*, 1995)

จากการศึกษาของ Monreal and Reese (1969); Vyas and Deshpande (1986) พบว่าเอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่แล้วจะขับออกมานอกเซลล์ ยกเว้นจุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ไคตินเอสแล้วอยู่ภายในเซลล์ เช่น *Mucor mucedo* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Elango *et al.*, 1982)

ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะในสกุล *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเอนไซม์ไคตินเอสที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไคตินที่มีอยู่ในดิน (Goodfellow *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000) ในปี ค.ศ.1988 Czoch and Mordarski พบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินที่สำคัญได้แก่ *S. griseus* และ *S. antibioticus* เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีท สกุล *Streptomyces* เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เติบโตได้เร็ว และมีปริมาณมากในธรรมชาติ

3.5 การศึกษาการใช้เอนไซม์ไคตินเอสในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

Elad *et al.* (1982) ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Trichoderma harzianum* ในการผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase และไคตินเอส โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี laminarin และไคตินหรือที่มีผนังเซลล์ของ *Sclerotium rolfsii* เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะสูงมาก เมื่อเติบโตในอาหารที่มี sclerotis ของเชื้อ *S. rolfsii* ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ protease และ lipase จะตรวจพบเมื่อ antagonist สัมผัสกับเส้นใยของ *S. rolfsii*

Shaspira *et al.* (1989) ได้ทำการ subclone สาย DNA ที่มียีน Chi A จาก *Serratia marcescens* เข้าไปในพลาสมิด pBR 322 โดยให้ชื่อว่า pCHIA ซึ่งได้ชักนำเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ และเมื่อนำไปฉีดพ่น *S. rolfsii* ด้วยเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า บริเวณปลายของเส้นใยจะเกิดการไหม้ ซึ่งพบว่าไคตินเอสที่

เตรียมได้นี้มีประสิทธิภาพในการลดการก่อโรคจากเชื้อรา *S. rolfii* และ *R. solani* ของถั่วในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

Robert *et al.* (1990) ศึกษาผลของ extracellular metabolite จาก *Gliocladium virens* ที่มีต่อการงอกของ sporangia และการเจริญของ *Pythium ultimum* โดยเพาะเลี้ยง *G. virens* ในอาหาร minimal medium ที่เติมสารสกัดจากรำข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ หรือเส้นใยของ *P. ultimum* พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของ sporangia และยับยั้งการเติบโตของ *P. ultimum* ได้โดยพบ gliotoxin, laminase, amylase, carboxymethyl cellulase chitinase และ protease ในน้ำเลี้ยงของเชื้อ *G. virens*

Lorito *et al.* (1993) ศึกษาการควบคุม *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* และ *Uncinula necator* ด้วย *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ร่วมกับ chitinolytic enzyme 2 ชนิด จาก *T.harzianum* สายพันธุ์ P1 โดยตั้งสมมุติฐานว่า chitinolytic enzyme จะช่วยปลดปล่อยสารอาหารจากเส้นใยของเชื้อราเป้าหมาย ซึ่งแบคทีเรียที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพจะนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้เพื่อเพิ่มจำนวน จากผลการทดลอง พบว่า chitinolytic enzyme จะทำให้การเติบโตของ *E. cloacae* เพิ่มขึ้น และทำให้แบคทีเรียจับกับเส้นใยของเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น ถึงแม้ในอาหารจะมี D-glucose หรือ sucrose ความเข้มข้นสูงก็ตาม และการยับยั้งการงอกของสปอร์ และการงอกของเส้นใยจาก germ tube ของ *B. cinerea*, *F. solani* และ *U. necator* จะเพิ่มโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา ร่วมกับเซลล์แบคทีเรีย *E. cloacae* ยกเว้น *Pseudomonas* spp.

Di Pietro *et al.* (1993) พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราของ *G. virens* strain 41 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโคตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งการเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด และสามารถแยกสารปฏิชีวนะที่มีชื่อ gliotoxin ได้อีกด้วย น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ chitinolytic enzyme ชนิดต่างๆ คือ chitin 1,4- β -chitobiosidase และ glucan N-acetyl- β -D-glucosaminidase เมื่อนำ endo-chitinase ที่บริสุทธิ์ และมีความเข้มข้น 150 μ g/ml มาทดสอบการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย และการงอกของเส้นใยจาก germ tube ของ *Botrytis cinerea* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. cinerea* และทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย โดยทำให้ส่วนปลายของเส้นใยตาย และเมื่อใช้ endochitinase ร่วมกับ gliotoxin จะสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ทั้งหมด

Gunaratana and Balasubramanian (1994) นำ *Acremonium obclavatum* ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อราสนิม *Puccinia arachidis* มาเลี้ยงในอาหาร Czapek's Dox medium ที่เติมผนังเซลล์

ของเชื้อ *Ac.obclavatum* และ colloidal chitin 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนพบว่า สามารถยับยั้งการงอกของ uredospore และยับยั้งการเจริญของ germ tube ของเชื้อรา *P. arachidis* ได้

De la Cruze *et al.* (1995) ศึกษาเอนไซม์จาก *Trichoderma* sp. พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิต β -1,6-glucanase อย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกับเอนไซม์ hydrolase ชนิดอื่นๆ และเมื่อนำ extracellular β -1,6-glucanase มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 43,000 ดาลตัน และมีค่า isoelectric point เป็น 5.8 และเมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ไคตินสจะสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi* และ *Phytophthora syringae* ได้

Chernin *et al.* (1995) ศึกษา chitinolytic activity จากเชื้อ *Enterobacter agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่สามารถด้านการเติบโตของเชื้อราโรคพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ที่สลายไคตินในอาหารที่มี colloidal chitin 0.2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจพบเอนไซม์ทั้งหมด 4 ชนิด คือ *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase 2 ชนิด, endo-chitinase และ chitobiosidase มีน้ำหนักโมเลกุล 89,000, 67,000, 59,000 และ 50,000 ดาลตัน ตามลำดับ และใช้เชื้อ *E. agglomerans* ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคในฝ้าย โดยทำการทดสอบในเรือนเพาะชำ พบว่า สามารถลดการเกิดโรคได้ 64-86 เปอร์เซ็นต์

Wannissorn *et al.* (1996) พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคตินสสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Lasiodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp. ได้

เครือวัลย์ (2541) ศึกษาผลการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยแบคทีเรียที่ผลิตไคตินส จำนวน 23 ไอโซเลท ด้วยวิธี poisonous food technique พบว่า *Bacillus* sp. M₁₀, *Bacillus* sp. M₁₅ และ *Bacillus* sp. S₃ ให้ผลในการยับยั้งได้สูง โดยสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Alternaria* sp. ได้ 73, 66 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Cladosporium* sp. เป็น 71.4, 64.3 และ 51.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. เป็น 84.4, 73.0 และ 75.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ คือ 2.51, 0.79 และ 3.26 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า specific activity คือ 1.95, 1.25 และ 0.5 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

4. โรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Linn.) เป็นพืชผักในตระกูล Solanaceae มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศแถบละตินอเมริกา ทวีปอเมริกาใต้ แต่ในปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย ผลมะเขือเทศนอกจากทุกครัวเรือนจะนำมาบริโภค โดยประกอบเป็นอาหารชนิดต่างๆ แล้ว ยังมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญหลายชนิด เช่น ซอสปรุงรแต่งรสอาหาร ทำเป็นน้ำมะเขือเทศใช้ดื่มแทนน้ำผลไม้ ปลากระป๋อง ส่วนเนื้อมะเขือเทศตากแห้งนำมาเชื่อมกับน้ำตาลทำเป็นผลไม้เชื่อมในรูปของหวานได้ และเป็นส่วนประกอบสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร

การปลูกมะเขือเทศจัดเป็นอาชีพทางการเกษตรที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับพืชผักชนิดอื่นทั่วไป แต่ในการเพาะปลูกก็มีอุปสรรคมาเช่นกัน โคนเน่าเฉพาะในด้านโรคต่างๆ เนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชที่อ่อนแอ และง่ายต่อการเข้าทำลายจากโรคต่างๆ ได้เกือบทุกชนิด โดยเฉพาะโรคเหี่ยว และโรครากและโคนเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

4.1 ลักษณะของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

เชื้อรา *S. rolfsii* จัดจำแนกทางอนุกรมวิธานโดย Hawksworth *et al.* (1983) ได้ดังนี้

Kingdom	Deuteromycetes
Division	Deuteromycetes
Order	Agronomycetales
Genus	Sclerotium
Species	<i>S. rolfsii</i>

ลักษณะเชื้อรา *S. rolfsii* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีโคโลนีสีขาว เส้นใยมีความมันวาวคล้ายไหม เมื่อมีอายุมากขึ้นความมันวาวจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งกลายเป็นสีขาวด้าน การเติบโตของเชื้อเป็นไปอย่างรวดเร็ว อาจเติบโตเลยขึ้นไปบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างเส้นใยขึ้นไปในอากาศ (aerial hypha) โคโลนีมีลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (concentric ring) และมีกลุ่มของเส้นใย (mycelial strand) เจริญแตกแขนงแผ่ออกเป็นรูปพัด (Aycok, 1996)

เชื้อรา *S. rolfii* มีการสร้างเม็ด sclerotia ที่เกิดจากเส้นใยมาเรียงตัวขนานกันเป็นกลุ่ม (hyphal strand) ประมาณ 3-12 เส้น มีการแตกแขนงสั้นๆ ออกมาสานเป็นร่างแห และพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเม็ด sclerotium ซึ่งเมื่อเริ่มแรกจะเป็นเม็ดกลมสีขาวขนาดเล็ก และขยายขนาดใหญ่ขึ้น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ

4.2 การเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfii*

S. rolfii เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน สามารถรุกรานและทำลายพืชได้มากกว่า 100 Family ในเขตอบอุ่น ทั้งพืชผัก ผลไม้ ไม้ดอก ไม้ประดับ วัชพืช พืชไร่ หรือแม้แต่ไม้ยืนต้นที่มีเนื้อแข็งบางชนิด (Aycok, 1996) สามารถทำให้เกิดโรค seedling blight, โรคเน่าระดับดิน (damping off) และ โรครากและโคนเน่า (root and stem rot) สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตได้ทั้งในระยะ Pre-emergence damping-off หรือ Seed rot ซึ่งเข้าทำลายเมล็ดหรือกล้าพืชส่วนที่อยู่ใต้ดิน และระดับดินทำให้เมล็ดเน่า ยุบ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเน่าในที่สุด หรือทำให้ต้นอ่อนที่เพิ่งงอกออกมาจากเมล็ดส่วนราก และยอดตรงจุดที่เข้าทำลายเป็นแผลเน่าช้า ลึกลงข้างดำ แผลขยายใหญ่ขึ้นทำให้ต้นอ่อนเน่าตายอย่างรวดเร็วจึงไม่มีกล้างอกโผล่ขึ้นจากดินให้เห็น และในระยะ Post-emergence damping-off หรือ Seedling damping-off ที่เชื้อเข้าทำลายต้นอ่อนซึ่งเจริญโผล่พ้นดินแล้ว ปรากฏอาการให้เห็นตรงโคนต้นกล้าที่อยู่ระดับดิน หรือใต้ดิน ระยะแรกเกิดเป็นจุดช้ำน้ำขนาดเล็กแล้วจึงขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว โดยรอบต้นกล้า ซึ่งต้นกล้าอาจหัก และพับลงในขณะที่ใบยอดยังเขียวอยู่ ต่อมาส่วนยอดจะเน่าและแห้งตายคล้ายน้ำร้อนลวก ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อผลิตสาร oxalic acid (Punja, 1985) pectic acid และ เอนไซม์เซลลูโลสมาย่อยเนื้อเยื่อพืช (Agrios, 1978)

ในดินมะเขือเทศที่โตพ้นระยะกล้าแล้ว เชื้อจะเข้าทำลายส่วนของลำต้นที่อยู่ระดับหรือใต้ผิวดินลงไปเล็กน้อย ก่อให้เกิดอาการแผลแห้งตายขึ้นอยู่กับส่วนของต้น และเปลือกจนรอบต้น สำหรับอาการที่จะสังเกตเห็นได้บนต้นที่อยู่เหนือพื้นดิน คือ ยอดเหี่ยวใบเหลือง การเหี่ยวโตหยุดชะงัก ระยะแรกอาจเหี่ยวเฉพาะเวลากลางวันที่อากาศร้อน พอตกเย็นหรือกลางคืนซึ่งมีอากาศเย็นขึ้นจะกลับสดใสดังเดิม และจะค่อยๆ เหี่ยวรุนแรงขึ้นจนในที่สุดเหี่ยวอย่างถาวรแล้วแห้งตายทั้งต้น สามารถสังเกตเห็นเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ทั่วไปที่บริเวณโคนต้น และบริเวณพื้นดิน โดยรอบพร้อมทั้งมีเม็ด sclerotia เป็นเม็ดกลมๆ สีน้ำตาลคล้ายเมล็ดผักกาด ซึ่งเมื่อเริ่มเกิดจะเป็นเม็ดสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นน้ำตาลหรือดำเมื่อมีอายุมากขึ้น เม็ด sclerotia จะมีเป็นจำนวนมากและสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน หลังจากเข้าทำลายบริเวณโคนต้นแล้วเส้นใยก็จะเติบโตแผ่กระจาย

ขึ้นมายังลำต้นข้างบน และลึกลงไปได้ดิน ทำลายส่วนรากทั้งหมดซึ่งมีผลทำให้เกิดอาการเหี่ยว และแห้งตายในที่สุด สำหรับลูกมะเขือที่อยู่บริเวณผิวดินจะถูกเชื้อเข้าทำลายก่อให้เกิดผลสีเหลือง ขอบตัวลงเน่าอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งมีเส้นใยสีขาวและเม็ด sclerotia ขึ้นปกคลุม สำหรับต้นอ่อน หรือ ต้นกล้าหากเกิดโรคขึ้นมักจะรุนแรง และก่อให้เกิดการตายอย่างรวดเร็วทำให้ต้นหักพับ และแห้งตายในที่สุด

5. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

โรคพืชเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเพาะปลูกพืช และจัดเป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่สามารถทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุที่อาศัยอยู่ในดิน นับเป็นโรคที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ทั้งพืชไร่ ไม้ผล และพืชผัก ไม่ว่าจะเป็นอาการเมล็ดเน่า เน่าระดับดิน หรือเน่าคอดิน (จิระเดช, 2538) ซึ่งโดยทั่วไปไม่มีวิธีการในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุที่อาศัยอยู่ในดินหลายวิธี ดังนี้

5.1 เตรียมดินในแปลงปลูกพืชให้มีระบบการระบายน้ำที่ดี ไม่รุดน้ำจนแฉะเกินไป

5.2 กำจัดเชื้อราในแปลงเพาะกล้าโดยใช้ไอน้ำร้อน และสารเคมี นอกจากนี้อาจใช้สารเคมีควบคุมเชื้อรา metalaxyl หรือ mancozeb พ่นหรือราดลงบนดินก่อนหว่านเมล็ดพืช หรือ อาจอบหรือ รุมดิน เช่น methyl bromide, chloropicrin สามารถกำจัดเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินได้ดี ไม่หว่านเมล็ด หรือเพาะต้นกล้าแน่นจนเกินไป ควรเว้นระยะต้นกล้าให้มีอากาศถ่ายเทสะดวก

5.3 ทำลายต้นพืชที่เป็นโรค เพื่อป้องกันการระบาดของโรค

5.4 เพาะเมล็ดพืชในดินที่เป็นดินร่วนหรือดินที่มีอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายแล้ว หรือยกแปลงเพาะกล้าให้สูงขึ้นไม่น้อยกว่า 5 นิ้ว จากระดับดิน

5.5 ลดการใส่ปุ๋ยในระยะที่ต้นกล้ากำลังเจริญเติบโต และอาจช่วยเพิ่มความแข็งแรงของต้นกล้าโดยการรดน้ำต้นกล้าด้วยน้ำปูนใส

5.6 ไม่ปลูกพืชชนิดเดียวกันติดต่อกันเป็นเวลานาน ๆ ควรจะปลูกพืชหมุนเวียน

5.7 ใส่สารเคมีคลุกเมล็ดก่อนปลูกพืช เช่น metalaxyl หรือ mancozeb นอกจากนี้อาจใช้ฉีดพ่นต้นกล้าในกรณีที่ดินมีความชื้นสูง หรือเริ่มพบโรคระบาด แต่การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และมักมีปัญหาสารพิษตกค้าง เนื่องจากใช้ปริมาณมากเกินไปก่อให้เกิดมลภาวะต่อสภาพแวดล้อม พืชของสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในดิน ทำลายจุลินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

5.8 เนื่องจากการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชก่อให้เกิดปัญหามากมาย ประเทศที่เจริญจึงได้ค้นคว้า และหันมาศึกษาวิธีการควบคุมโรคพืชในดินโดยชีววิธี (biological control) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. หรือแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (นิตยา, 2534; ณรงค์, 2540) *Streptomyces griseoviridis* ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตในทางการค้าในชื่อ Mycostop (Sabaratnam and Traquair, 2002)

6. กลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

การควบคุมโรคด้วยชีววิธี หมายถึง การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งมีชีวิตอื่นลดจำนวนประชากรของเชื้อโรค ลดการเกิดโรค หรือลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อโรค ซึ่งอาจรวมถึงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พันธุกรรม หรือผลผลิตจากพันธุกรรม ด้วยยกเว้นการกระทำโดยตรงของมนุษย์ต่อเชื้อโรคเท่านั้น การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการนี้ในปัจจุบันเกษตรกร และนักวิชาการเกษตรจำนวนมากให้ความสำคัญ และนิยมนำมาควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีซึ่งมีผลต่อสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตมากขึ้น (เกษม, 2532)

สำหรับกลไกในการควบคุมโรคพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นมีวิธีการทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบก็มีผลที่แตกต่างกันออกไปดังนี้

6.1 การแก่งแย่งแข่งขัน (competition)

เป็นการแข่งขันของจุลินทรีย์สอง หรือมากกว่าสองชนิดในด้านที่อยู่อาศัยแหล่งอาหาร หรือปัจจัยอื่นที่จำเป็นในการดำรงชีวิต ซึ่งส่งผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์เอง จุลินทรีย์ชนิดที่มีการเติบโตได้รวดเร็ว จะได้เปรียบในการแข่งขันปัจจัยในการเติบโตกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ดี

6.2 การเป็นปรสิต (mycoparasitism)

เป็นการใช้เส้นใยเข้าพันรัดเส้นใยโรคพืช มีการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น ไคตินเอส เซลลูเลส และเบต้ากลูคาเนส เป็นต้น แล้วแทงผ่านเข้าภายในเส้นใยเพื่อใช้เป็นอาหาร ทำให้เกิดการฉีกขาด และสลายในส่วนของผนังเซลล์ และตายในที่สุด (Lorito *et al.*, 1993)

6.3 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

สารที่เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งสารนี้มีผลในการยับยั้งหรือต่อต้านต่อการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น สารปฏิชีวนะในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides azalomycin B หรือสารพิษ (toxin) (Gesheva, 2002)

6.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)

เป็นกลไกที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง จะไม่ทำให้เกิดโรคแต่จะเติบโตอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงที่มีชีวิตอยู่สามารถชักนำให้พืชผลิตสาร tomatine ซึ่งปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมที่ก่อโรคได้ (จิระเดช, 2538)

7. การใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ในการควบคุมโรคพืช

การแพร่ระบาดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชในดิน โดยเฉพาะโรครากและเมล็ดเน่าซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา เช่น *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Pythium aphanomyces* และโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Fusarium* spp. (Altier and Thies, 1995) เป็นปัญหาสำคัญที่เกษตรกรมักประสบในการเพาะปลูกพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ที่ผ่านมามีการใช้สารเคมีในการป้องกัน และกำจัดโรคพืช ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีผลทำให้เชื้อคือยา ส่งผลกระทบโดยตรงต่อธรรมชาติทำให้เกิดการเสื่อมโทรมของดิน ตลอดจนสุขภาพของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในการป้องกัน และกำจัดโรคพืชในปัจจุบันนั้น ประเทศไทยได้นำเข้าจากต่างประเทศปีหนึ่ง ๆ คิดเป็นมูลค่าหลายล้านบาท การควบคุมโรคพืชแบบชีววิธีโดยการใช้เชื้อปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ไคตินเนสที่มีสมบัติในการย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Monreal and Reese, 1969; Gooday, 1994) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการจัดการ และ

ควบคุมโรคพืชที่ยังคงรักษาระบบนิเวศน์วิทยา และสมดุลของธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ตลอดจนในปัจจุบันของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลมีมากจนก่อให้เกิดปัญหาสภาพแวดล้อม

ด้วยเหตุนี้จึงมีการพยายามที่จะศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาวิธีการในการควบคุม และจัดการปัญหาโรคพืชโดยนำเอาวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้เป็นวัตถุดิบร่วมกับเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน เช่น เชื้อแอสเพอจิลลินัม (Goodfellow *et al.*, 1988; Lazzarini *et al.*, 2000) ในกระบวนการควบคุมโรคพืชแบบชีววิธีเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

7.1 การใช้เอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อแอสเพอจิลลินัมในการควบคุมโรคพืช

จากการศึกษาของ Mahadevan and Crawford (1997) รายงานว่า เชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 เป็นเชื้อแอสเพอจิลลินัมที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในดินที่บริเวณรากของต้นพืช และเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงมีการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับรากและเมล็ดของพืช เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอส ซึ่งมีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกเหนือไปจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ซึ่งมีผลต่อเชื้อราแล้วยังพบว่า เชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ยังเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีบทบาทในการพัฒนาการเจริญเติบโตของระบบรากของพืชโดยจะขับสารที่ผลิตมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อโรคพืชมากขึ้นอีกด้วย (Lynch, 1990; Crawford *et al.*, 1993; Kunoh, 2002)

Gomes *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อแอสเพอจิลลินัมในสกุล *Streptomyces* ซึ่งแยกจากดินที่บริเวณ cerrado ในตอนกลางของประเทศบราซิล พบว่า crude enzyme ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูง เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า รวมทั้งได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ crude enzyme ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว chitin medium ที่มีส่วนผสมของ colloidal chitin และผนังเซลล์จากเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ด้วยอัตราส่วน 1:3 ตามวิธีการของ Gupta *et al.* (1995) และบ่มบนเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาแยกเอาส่วนน้ำใสโดยใช้กระดาษกรอง เพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน microtiter plate โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์

ทางการค้า พบว่า crude enzyme ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* sp., *F.oxysporum*, *F.solani*, *F. graminearum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* และ *A. parasiticus* เป็นต้น

Gomes *et al.* (2001) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเอสที่ทนร้อนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* RC 1071 ที่แยกจากดินที่บริเวณ cerrado ตอนกลางของประเทศบราซิล โดยเปรียบเทียบระหว่าง crude enzyme, purified enzyme และการใช้เชื้อที่มีชีวิต (vegetative cell) เพื่อยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* sp., *F.oxysporum*, *F.solani*, *F. graminearum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* และ *Aspergillus parasiticus* พบว่า crude enzyme ที่ได้จากการเติบโตของเชื้อ *Streptomyces* RC 1071 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม colloidal chitin และผนังเซลล์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ด้วยอัตราส่วน 1:3 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่ใช้ในการศึกษาได้ทุกสายพันธุ์ยกเว้น *A. parasiticus* สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชด้วยเชื้อแอคคิโนมัยสที่ยังมีชีวิต (vegetative cell) ทำโดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces* RC 1071 ในอาหาร yeast extract-malt extract-agar medium (YMA medium) และทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี dual culture method พบว่า สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่ใช้ศึกษาได้ทุกสายพันธุ์ สำหรับการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งราโรคพืชด้วย purified enzyme ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* RC 1071 แล้วผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยกระบวนการ gel filtration พบว่า สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้บางส่วน เช่น การงอกของสปอร์ และบริเวณปลายเส้นใยซึ่งเป็นบริเวณที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบสูง ทั้งนี้ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่สมบูรณ์อาจจะต้องอาศัยกระบวนการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abd-Allah (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces plicatus* ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยแยกเชื้อจากดินจำนวน 372 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส พบว่าเชื้อ *S.plicatus* เป็นเชื้อที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีสารไคติน ชูโครส และแคลเซียม เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ การยืดตัวของ germ tube และการเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria alternata* และ *Verticillium albo-atrum* เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว stem canker และโรคเหี่ยว *verticillium* ของมะเขือเทศได้

7.2 การยับยั้งเชื้อราโรคพืชด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

Liu *et al.* (1992) ได้นำดินในบริเวณเพาะปลูกต้นมันฝรั่งที่ปราศจากโรคหูด (potato scab) มาทำการแยกเชื้อ พบว่ามี เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะอยู่เป็นจำนวนมาก และพบว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ผลิตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ต่อมาได้นำเชื้อ *Streptomyces* เพื่อควบคุมโรคหูดในมันฝรั่งในระดับเรือนทดลองโดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces* spp. ลงในดินโดยตรง พบว่า สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดี (Liu *et al.*, 1995)

ในการศึกษาการควบคุมโรคพืชระดับเรือนทดลอง พบว่า เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลที่มีผู้ที่สนใจนำมาศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชจากดิน (soil borne pathogenic fungi) ที่เป็นสาเหตุในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด (Crawford *et al.*, 1993) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Yuan and Crawford ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด พบว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชหลายชนิด โดยสามารถผลิตสาร extracellular antifungal metabolite และ เมื่อทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า *S. lydicus* WYEC 108 สามารถยับยั้งการงอกของ oospore ของเชื้อรา *Pythium ultimum* นอกจากนี้ยังสามารถทำลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราได้

Cecilia and Deborah (1996) ศึกษาการควบคุมโรครากเน่าคอดินในต้นกล้าถั่วโดยใช้เชื้อ *Streptomyces* strain 93 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่า สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดเน่าและโรคเน่าคอดินของต้นกล้าได้ในสภาพห้องปฏิบัติการ และ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Rhizobium meliloti* ที่อาศัยอยู่ในปมรากถั่ว

Sabaratnam and Traquair (1996) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. Di-944 ที่แยกจากดินที่บริเวณรากของต้นมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) สามารถยับยั้งโรครากเน่า (root rot) ในต้นกล้าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในระดับห้องปฏิบัติการได้

จากการศึกษาผลของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา มีรายงานว่า Kolomiets *et al.* (2003) ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใย และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท *Streptomyces flavescens* อยู่มา

ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ก่อโรคในแตงกวา พบว่า สารสกัดซึ่งได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งมีเซลล์ของเชื้อ *S. flavescens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *F. oxysporum* ได้สูงที่สุด และสารสกัดที่ได้จากเส้นใยของเชื้อ *S. flavescens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำที่สุด

Jones and Samac (1996); Xiao *et al.* (2002) ได้ใช้เชื้อ *Streptomyces* sp. ควบคุมการเกิดโรครากเน่า (root rot) ซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Aphanomyces euteiches* และ *Phytophthora medicaginis* ของต้นพืชตระกูลถั่วในระดับห้องทดลอง และได้มีการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa พบว่า สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดของพืชในกลุ่มนี้ได้ ดังนั้นจึงได้นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบรากและเมล็ด (Samac *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเชื้อ *Streptoverticillium albireticculi* ซึ่งมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อราก่อโรคที่อยู่ในดิน เช่น *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งจะมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อโรคพืชต่อไป (Park *et al.*, 2002)

Trejo-Estrada (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท *Streptomyces violaceusniger* YCED 9 ต่อการยับยั้งการเติบโตเชื้อราโรคพืช 7 ชนิด คือ *Pythium aphanidermatum* No.39, *Gaeumannomyces graminis* FL-151, *G. graminis* FL-179, *Collectotrichum graminicola*, *Rhizoctonia solani* MSU, *Microdochium nivale* และ *Sclerotinia homeocarpa* พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่ทำการทดสอบได้ดี เนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ nigericin, geldanamycin และสารประกอบเชิงซ้อนพวก macrocyclic lactone antibiotic ซึ่งจะตรวจพบ nigericin บริเวณดินและหญ้าที่เพาะ

จากการศึกษาของ Marten *et al.* (2001) พบว่า เชื้อ *Streptomyces rimosus* สามารถผลิต Rhizovit R ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้หลายชนิด *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicola*, and *Botrytis* sp.

Chris (2002) ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากพืชในประเทศออสเตรเลีย และพบว่ามีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพ ที่มีผลในการป้องกันต้นข้าวสาลีจากเชื้อสาเหตุโรคพืชในระหว่างการเจริญจนถึงขั้นตอนการเก็บเกี่ยว

Getha and Vikineswary (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Streptomyces violaceusniger* strain G10 ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 จากการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual method พบการสร้าง clear zone บริเวณที่เส้นใยของเชื้อราที่เติบโตแผ่ออกมาในระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดนั้น และเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยของเชื้อราถูกย่อยสลาย จากนั้นเลี้ยงเชื้อ *S. violaceusniger* strain G10 ในอาหารเหลวร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 พบว่าเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวแสดงอาการผิดปกติ และไม่มีการเติบโต

Gesheva (2002) ศึกษาสมบัติของเชื้อแอคติโนมัยซีตเพื่อใช้ควบคุมเชื้อโรคพืชในสวนส้มและมะนาว พบว่า เชื้อที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคพืช ก็คือเชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Micromonospora* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides azalomycin B และสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆอีก ซึ่งสารปฏิชีวนะต่างๆที่เชื้อแอคติโนมัยซีตผลิตขึ้นนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆในดินของสวนส้มและมะนาว

วันวิสาข์ (2546) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีตจากต้นข้าว และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Pyricularia oryzae*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* และ *Rhizoctonia solani* พบว่า เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต MN 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ทดสอบในห้องปฏิบัติการ และจากการศึกษาความสามารถในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวระยะต้นกล้า พบว่า สามารถควบคุมการทำลายของโรคโดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายน้อยกว่าต้นกล้าชุดควบคุม

Xiao et al. (2002) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* จากดินที่ Minnesota, Nebraska และ Washington พบว่า สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora medicaginis* และ *P. sojae* ได้ดีในห้องปฏิบัติการ และสามารถลดการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าในพืชตระกูลถั่ว ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. medicaginis* และ *P. sojae* ได้อย่างอย่างมีนัยสำคัญ

Coombs et al. (2004) พบว่าเชื้อ Non streptomyces actinomycetes เช่น *Actinoplanes* sp., *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptosporangium* สามารถที่จะยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้น

EL-Tarabily (2006) ได้ใช้เชื้อ *Microbispora rosea*, *Micromonospora chalcea* และ *Actinoplanes philippinensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ในการย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราได้หลายชนิด เช่น β -1,3, β -1,4 และ β -1,6,-glucanase และพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pythium ap hanidermatum* และลดอัตราการเกิดโรคน้ำระดับดินของแตงกวาในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้เป็นอย่างดี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแอคติโนมัยสีท

เชื้อแอคติโนมัยสีท ที่คัดแยกจากตัวอย่างดินในพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช และสถานีวิจัยพืชไร่นาสวนรุกจากกสิกิจ จังหวัดนครราชสีมา (ชาญวิทย์ และคณะ, 2546) จำนวน 197 ไอโซเลท

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน และยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช

2.1 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไคติน

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน จำนวน 197 ไอโซเลท ที่เติบโตบนอาหาร yeast extract-malt extract agar medium (ISP-2) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน ด้วยวิธีการจุดเชื้อ (point inoculation) ลงบนอาหารแข็ง chitin medium ซึ่งประกอบด้วย swollen chitin 30 กรัม peptone 10 กรัม yeast extract 5 กรัม NaCl 1 กรัม KH_2PO_4 1 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จานละ 6-8 ไอโซเลท จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตความสามารถในการย่อยสลายไคติน จากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีเชื้อ บันทึกระยะความกว้างของโคโลนีเชื้อ และบริเวณใส

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารวุ้น chitin medium เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชในข้อ 2.2 ต่อไป

2.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช

2.2.1 เชื้อราสาเหตุโรคพืช

กลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากดิน (soil borne pathogenic fungi) ที่ก่อโรคกับระบบรากและเมล็ดในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่

1. *Fusarium sporotrichiodes* สาเหตุโรคเหี่ยว
2. *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรครากและโคนเน่า
3. *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก
รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

2.2.2 วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่ดัดแปลงจากวิธี Dual Culture Technique (Sadfi *et al.*, 2001) โดยใช้ห้วงเชื้อ เชื้อเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 ที่เติบโตบนอาหารผิวแข็ง ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน มาจัดเป็นเส้นตรงรูปกากบาทผ่านจุดศูนย์กลางของจานบนผิวอาหารวุ้น 2 ชนิด คือ chitin medium ซึ่งมี swollen chitin เป็นแหล่งคาร์บอน และ glucose-meat extract-peptone medium (GMP) ซึ่งมีองค์ประกอบของ glucose 15 กรัม peptone 6 กรัม meat extract 3 กรัม yeast extract 3 กรัม NaCl 5 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน จากนั้นใช้เข็มเชื้อเชื้อขึ้นวุ้นจำนวน 4 ชิ้นที่ตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 สายพันธุ์ คือ *Fusarium sporotrichiodes*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ที่มีอายุ 7 วัน ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละด้านของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เพาะไว้เดิม โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อแอคติโนมัยสีท และเชื้อราโรคพืช 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 – 5 วัน บันทึกระยะกว้างของรัศมีโคโลนีของเชื้อราโรคพืชที่เติบโตจากจุดที่เพาะไปจนถึงขอบโคโลนีในแนวที่ถูกยับยั้ง เป็นค่า R2 และระยะกว้างของรัศมีโคโลนีจากจุดที่เพาะไปจนถึงขอบโคโลนีของ

เชื้อราโรพิษที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar เป็นเวลา 3-5 วัน เป็นค่า R1 ความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรพิษคำนวณโดยใช้สูตร $[(R1-R2)/R1] \times 100$

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรพิษทั้ง 3 ชนิดบนอาหารวุ้นได้ดี จำนวน 4 ไอโซเลท โดยคัดเลือกจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และนำไปฉายรังสีแกมมาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรพิษได้สูงในข้อ 3 ต่อไป

3. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยการฉายรังสีแกมมา และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเติบโตของเชื้อราโรพิษได้สูง

3.1 วิธีการฉายรังสี

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน และยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรพิษ ทั้ง 3 ชนิด มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา โดยนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน เติม 0.05 M Phosphate Buffer pH 7.0 ให้เต็มเจือเชื้อที่เผาไฟแล้วเจือเชื้อให้สปอร์กระจาย นำสปอร์ที่ได้ไปกรองผ่านสำลีปราศจากเชื้อ และเจือจางให้สารละลายสปอร์มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.6-0.7 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปฉายรังสีแกมมา ที่ระดับความเข้มของแสง 0.4-8 กิโลเกรย์ (สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ) และคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินสบนอาหารวุ้น chitin medium ตามวิธีการทดสอบในข้อ 2.1 และความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรพิษทั้ง 3 ชนิด ตามวิธีการทดสอบในข้อ 2.2 โดยทดสอบเฉพาะการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรพิษ

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรพิษทั้ง 3 ชนิด ได้สูงสุด จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อนำไปศึกษาสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไคตินส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในข้อ 4 ต่อไป

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีตในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีต

นำเชื้อแอคติโนมัยซีต ที่มีความสามารถในการควบคุมการเติบโตของเชื้อราโรคพืชในห้องปฏิบัติการได้สูงสุดจำนวน 5 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 0.01 % Tween 20 ลงในหลอด แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟแล้วเขี่ยเชื้อให้สปอร์กระจาย นำสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ที่ได้ไปกรองผ่านลำไส้ปราศจากเชื้อ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7 (มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 2.0×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

4.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นำกล้าเชื้อแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือกไว้ทั้ง 5 ไอโซเลต ที่เตรียมด้วยวิธีการในข้อ 4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว chitin medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนรอบด้วยอัตราความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 และ 10 วัน

4.3 การตรวจวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

เก็บตัวอย่างอาหารเหลวในแต่ละวิธีการ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แยกส่วนที่เป็นเซลล์ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ตามวิธีการในข้อ 7.1

4.4 การตรวจวิเคราะห์การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เก็บตัวอย่างอาหารเหลว ในแต่ละวิธีการ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเติมตัวทำละลาย Ethyl acetate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่าให้ Ethyl acetate สัมผัสกับตัวอย่างอย่างทั่วถึง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

ไขส่วนชั้นน้ำทิ้ง และนำส่วนของ Ethyl acetate ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน (vacuum rotary evaporator) (Alim AL-Bari *et al.*, 2006) และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี Resazurin Microtiter Assay Plate Method ตามข้อ 7.3

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. rolfsii* ในระดับกระถางปลูก

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก และเมล็ดของพืชในระดับกระถางปลูก ได้คัดเลือกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากมีพืชอาศัยมากกว่า 100 Family ด้วยกัน มาศึกษาเพื่อเป็นเชื้อราโรคพืชต้นแบบ และคัดเลือกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ซึ่งเป็นพืชผลทางเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ แต่อ่อนแอต่อการเกิดโรคได้ง่ายเป็นพืชต้นแบบ

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ โดยนำเชื้อรา *S. rolfsii* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จนเส้นใยมีการสร้างเม็ด sclerotia สีน้ำตาลดำ

5.2 กล้าพืชทดสอบ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวเมล็ดด้วยการแช่ในสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง และนำเมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดมาเพาะลงในกระบะเพาะกล้าที่มีดินสำเร็จรูป (ตรา ไม่ลองไม่รู้) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปลูกภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้ามะเขือเทศจากกระบะเพาะ ใช้น้ำสะอาดล้างดินออกจากราก และปลูกมะเขือเทศลงในกระถางที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 กรัม หนึ่งต้นต่อกระถาง และเพาะเลี้ยงจนต้นมะเขือเทศมีอายุ 30 วัน

5.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรค

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับกระถางปลูก โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการควบคุมการเติบโตของเชื้อราโรคพืชในห้องปฏิบัติการได้สูงสุดจำนวน 5 ไอโซเลท ที่เตรียมในข้อ 4.1 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร มาเติมและไม่เติมสารละลาย swollen chitin ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และราดลงบนโคนต้นมะเขือเทศ ที่มีอายุ 30 วัน จากนั้นทำการเพาะกล้าเชื้อรา *S. rolfii* ลงในกระถางโดยใช้เมล็ด sclerotia ที่เตรียมในข้อ 5.1 วางที่โคนต้นกล้าทั้ง 4 ด้าน ๆ ละ 1 เม็ด โดยให้ห่างจากโคนต้นประมาณ 1 เซนติเมตร ลงในวัสดุปลูก โดยปลูกพืชทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ต่อวิธีการ ซ้ำ ละ 5 ต้น วัดเปอร์เซ็นต์การรอดตายหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับ 2 วิธีการควบคุม คือ 1) วิธีการที่ปลูกพืชในดินผสมสำเร็จรูปที่ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ 2) วิธีการที่ปลูกพืชในดินผสมสำเร็จรูปที่ใส่เชื้อสาเหตุโรค วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เก็บตัวอย่างวัสดุปลูกในแต่ละวิธีการเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีท วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก จำนวนไม่น้อยกว่า 4 ไอโซเลท เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรคในระดับกระถางปลูกในข้อ 6 ต่อไป

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทแบบไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรค

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี จำนวน 4 ไอโซเลท มาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศ โดยการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทร่วมกัน ทั้งแบบที่ร่วมกัน 2 ไอโซเลท จำนวน 6 วิธีการ และร่วมกันแบบพบกันทุกไอโซเลท จำนวน 1 วิธีการ นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เตรียมตามข้อ 4.1

แต่ละไอโซเลทมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร โดยทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตามวิธีการในข้อ 5.3

6.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสิท

เก็บตัวอย่างดินในวิธีการต่างๆ 10 กรัมต่อวิธีการ นำมาผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 0.01 % tween 20 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาเจือจางลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 0.01 % tween 20 และตรวจนับปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสิท โดยวิธี dilution plate count ปิเปตสารละลายตัวอย่างดินที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร 0.02% yeast extract ซึ่งเติม nystatin ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย spreader บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจนับปริมาณเชื้อแล้วคำนวณปริมาณเชื้อเป็น colony forming unit (CFU) ต่อดิน 1 กรัม

6.3 การตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ไคตินเอสในวัสดุปลูก

เก็บตัวอย่างดินในวิธีการต่างๆ 150 กรัมต่อวิธีการ และเติมสารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.05 M pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดเอนไซม์ โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำออกมารองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ตามข้อ 7.1

6.4 การตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เก็บตัวอย่างดินในวิธีการต่างๆ 200 กรัมต่อวิธีการ และเติมตัวทำละลาย Ethyl acetate ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน แยกส่วนที่เป็นน้ำออกมารองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และนำไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน (vacuum rotary) (Alim AL-Bari *et al.*, 2006) และนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี Resazurin Microtiter Assay Plate Method ตามข้อ 7.3

7. วิธีการวิเคราะห์

7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส

7.1.1 ทำให้เอนไซม์เจือจาง โดยใช้สารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.05 M pH 7

7.1.2 เตรียมสารละลาย swollen chitin ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.05 M pH 7

7.1.3 อุ่นเอนไซม์ และสับสเตรตในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7.1.4 ผสมเอนไซม์ และสับสเตรต โดยใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และสับสเตรต 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นจัด หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 7.2 หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ *N*-acetylglucosamine

คำจำกัดความของ 1 หน่วยเอนไซม์ไคตินเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไคตินให้เป็น *N*-acetylglucosamine 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

7.2 การวิเคราะห์ห่าน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการ Somogyi (1952)

7.2.1 สารเคมี

ก) การเตรียม Low-alkalinity of Somogyi (สารละลาย A) การเตรียม แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1) สารละลายโปตัสเซียมโซเดียมคาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้มปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติมน้ำ NaHCO_3 16 กรัม

2) ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 1) เติมลงในสารละลายข้อ 2) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา และสารละลายนี้ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

ข) การเตรียม Arsenomolybdate reagent of Nelson (สารละลาย B) การเตรียม แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1) ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

2) ละลาย $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 1) เติมลงในสารละลายข้อ 2) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

7.2.2 วิธีการวิเคราะห์

1) หากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย *N*-acetylglucosamine ความเข้มข้น 25 50 75 100 150 200 250 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

2) ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

3) เติมสารละลาย Somogyi (สารละลาย A) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

4) เติมสารละลาย Nelson (สารละลาย B) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

6) การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากสารตัวอย่าง ทำเช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐานของ *N*-acetylglucosamine และหาปริมาณของน้ำตาลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ถ้าปริมาณน้ำตาลสูงกว่าค่าจากกราฟต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

7.3 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี Resazurin Microtiter Assay Plate Method

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ด้วยวิธี Resazurin Microtiter Assay Plate Method (Palimo *et al.*, 2002) โดยเปิดสารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แบบ serial twofold dilutions ด้วยตัวทำละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่มีอาหาร glucose-meat extract-peptone medium (GMP) อยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใช้เข็มเจาะเชื้อที่เผาไฟแล้วแตะเมล็ด sclerotia ใส่ลงในแต่ละหลุม จำนวน หลุมละ 1 เม็ด โดยหลุมที่มีเฉพาะอาหาร GMP เป็น Positive control และหลุมที่มีเฉพาะเมล็ด sclerotia และอาหาร GMP เป็น Negative control บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการยับยั้งการเติบโต โดยเติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* โดยการสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย resazurin ซึ่งแสดงถึงไม่มีการเติบโตของเชื้อ รายงานประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

ผล และวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีที่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยสีที่ จำนวน 197 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยไคติตินบนอาหารวุ้น chitin medium พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีที่ จำนวน 63 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีได้ (clear zone) ซึ่งคิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด เชื้อแอคติโนมัยสีที่แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยไคติตินได้แตกต่างกัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี และขนาดของโคโลนีอยู่ระหว่าง 1.05-2.75 ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข1

นำเชื้อแอคติโนมัยสีที่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคติตินทั้ง 63 ไอโซเลท ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป

2. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีที่ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีที่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 63 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากดิน จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium sporotrichiodes*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ทำการทดสอบบนอาหารวุ้น chitin medium และ GMP medium โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยสีที่พร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีที่ก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีที่ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5-10 วัน มีผลยับยั้งได้ดีกว่าการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีที่พร้อมกับเชื้อโรคพืช ดังแสดงในตารางที่ 3-5 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีที่ เป็นเวลา 10 วันก่อนเพาะเชื้อราโรคพืช มีเชื้อแอคติโนมัยสีที่ จำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อรหัส SA2 SA6 SB11 SG4 SG5 SJ9 DMKU 213 และ DMKU 260 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนการทดสอบเป็นเวลา 5 วัน มีเชื้อที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้ จำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อรหัส SA2 SA6 SB11 SG4 SG5 และ SJ9 และเมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีที่พร้อมกับเชื้อราโรคพืช พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีที่ เพียง 4 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ SA6 SG4 SG5 และ SJ9 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้

ตารางที่ 3 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *F. sporotrichiodes* บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคฟิช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคฟิชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน

รหัส	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเลี้ยงเชื้อราโรคฟิช					
	0 วัน		5 วัน		10 วัน	
	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium
SA2	0.0 ^d	0.0 ^d	10.0 ^e	40.0 ^d	72.0 ^c	100.0 ^a
SA6	8.0 ^c	4.0 ^c	32.0 ^d	43.0 ^c	74.0 ^c	100.0 ^a
SB11	0.0 ^d	0.0 ^d	14.0 ^e	10.0 ^e	60.0 ^d	58.0 ^b
SG4	28.0 ^a	32.0 ^a	72.0 ^b	40.0 ^d	90.0 ^b	100.0 ^a
SG5	20.0 ^b	28.0 ^b	78.0 ^a	74.0 ^b	100.0 ^a	100.0 ^a
SJ9	8.0 ^c	0.0 ^d	52.0 ^c	92.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a
DMKU 213	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^f	0.0 ^f	58.0 ^d	28.0 ^c
DMKU 260	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^f	0.0 ^f	16.0 ^e	4.0 ^d

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *R. solani* บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคฟิช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคฟิชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน

รหัส	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเลี้ยงเชื้อราโรคฟิช					
	0 วัน		5 วัน		10 วัน	
	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium
SA2	48.0 ^b	52.0 ^d	80.0 ^d	88.0 ^c	82.8 ^d	100.0
SA6	45.2 ^b	54.0 ^{cd}	85.2 ^c	94.8 ^b	78.0 ^e	100.0
SB11	34.0 ^d	33.2 ^e	72.0 ^e	93.6 ^b	64.0 ^f	100.0
SG4	54.8 ^a	66.8 ^a	95.6 ^b	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0
SG5	38.8 ^c	57.2 ^{bc}	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0
SJ9	57.2 ^a	60.0 ^b	95.6 ^b	100.0 ^a	90.0 ^b	100.0
DMKU 213	0.0 ^e	0.0 ^f	32.0 ^f	40.0 ^d	85.6 ^c	100.0
DMKU 260	0.0 ^e	0.0 ^f	24.0 ^g	40.0 ^d	100.0 ^a	100.0

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน

รหัส	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเลี้ยงเชื้อราโรคพืช					
	0 วัน		5 วัน		10 วัน	
	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium
SA2	0.0 ^f	14.0 ^a	4.0 ^c	100.0 ^a	92.0 ^b	100.0
SA6	0.0 ^f	0.0 ^f	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0
SB11	4.0 ^d	10.0 ^b	44.0 ^d	100.0 ^a	72.0 ^c	100.0
SG4	16.0 ^c	12.0 ^{ab}	100.0 ^a	100.0 ^a	92.0 ^b	100.0
SG5	32.0 ^a	12.0 ^{ab}	90.0 ^c	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0
SJ9	28.0 ^b	4.0 ^c	94.0 ^b	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0
DMKU 213	0.0 ^f	0.0 ^f	4.0 ^c	78.0 ^b	50.0 ^c	100.0
DMKU 260	0.0 ^f	0.0 ^f	0.0 ^f	46.0 ^c	56.0 ^d	100.0

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราในอาหารทดสอบ 2 ชนิด คือ chitin medium และ GMP medium พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร chitin medium มีแนวโน้มในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงบนอาหาร GMP medium เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท SA2 เป็นเวลา 5 วัน ก่อนทดสอบบนอาหาร chitin medium เชื้อรหัส SA2 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร GMP สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้เพียง 4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากในอาหาร chitin medium เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถผลิตเอนไซม์ ไคตินเอสซึ่งมีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Gupta *et al.*, 1995; Goodfellow *et al.*, 1988; Lazzarini *et al.*, 2000) รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงทำให้กลไกในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชมีประสิทธิภาพสูงขึ้น (Kun *et al.*, 2007) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu *et al.* (2008) ที่พบว่า การเติมไคตินความเข้มข้น 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ NYDB มีผลให้เชื้อ *Cryptococcus laurentii* สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Penicillium expansum* ที่เป็นสาเหตุโรคราสีน้ำเงินได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่เติมไคติน

จากผลการทดลอง เมื่อเพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีท เป็นเวลา 5 และ 10 วัน ก่อนทดสอบบนอาหาร chitin medium เชื้อแอสคิโนมัยซีทแต่ละไอโซเลท สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้สูงในระดับที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูง เพื่อนำไปใช้จริงในสภาพแวดล้อมที่อาจมีเชื้อโรคพืชปนเปื้อนอยู่ก่อนแล้ว จึงพิจารณาจากประสิทธิภาพของเชื้อแอสคิโนมัยซีทในการยับยั้งเชื้อโรคพืช เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช จากผลการทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *F. sporotrichiodes* และ *R. solani* พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทรหัส SG4 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ได้สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 32.0 และ 66.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 4) และการทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทรหัส SA2, SG4 และ SG5 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* ได้สูงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 14.0, 12.0 และ 12.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เชื้อแอสคิโนมัยซีทสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้ดี แม้เพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีทพร้อมกับเพาะเชื้อราโรคพืช การเพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีทก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 10 วัน สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช มีผลให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราลดลง จากผลการทดลอง ที่พบว่า เชื้อรหัส DMKU 213 และ 260 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเชื้อก่อนทดสอบเป็นเวลา 10 วัน แต่เมื่อลดระยะเวลาเพาะเชื้อก่อนทดสอบลง เป็นเวลา 5 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช ลดลงอย่างชัดเจน และเมื่อเพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีท ทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชที่ทำการทดสอบได้ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าระยะเวลาในการเติบโตของเชื้อแอสคิโนมัยซีทมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตสะสมในช่วง stationary phase และเอนไซม์ไคเนสที่ผลิตในช่วงของการเจริญ

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราแต่ละชนิด พบว่า โดยส่วนใหญ่เชื้อแอคติโนมัยสีทมีแนวโน้มในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *R. solani* และ *S. rolfii* ได้ดีกว่าเชื้อ *F. sporotrichiodes* ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีปริมาณของไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน (Monreal and Reese, 1969; Gooday, 1994) ซึ่งพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราชั้นสูงแต่ละชนิดอาจมีไคตินเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 22-44 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *S. rolfii* ที่พบไคตินเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Deshpande, 1986) นอกจากนั้นชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตนั้น อาจมีความจำเพาะกับเชื้อ *R. solani* และ *S. rolfii* มากกว่าเชื้อ *F. sporotrichiodes* เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายกลุ่ม ซึ่งมีสมบัติในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงระหว่างชนิดของสารและกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ (Trejo-Estrada, 1998)

นอกจากนั้น Mahadevan and Crawford (1997) รายงานว่า เชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในดินที่บริเวณรากของต้นพีช มีสมบัติในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับรากและเมล็ดของพีชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของเชื้อรา

จากผลการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพีชได้ดี จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อรหัส SA6 AG4 SG5 และ SJ9 ไปเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาต่อไป

3. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีที่ สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชจำนวน 4 ไอโซเลท มาฉายรังสีแกมมา และนำไอโซเลทที่ผ่านการฉายรังสี มาคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้สูงขึ้น พบว่า มีเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี จำนวน 119 ไอโซเลท ซึ่งได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีรหัส SA6 จำนวน 51 ไอโซเลท, เชื้อรหัส SG4 จำนวน 39 ไอโซเลท และ เชื้อรหัส SJ9 จำนวน 29 ไอโซเลท ส่วนเชื้อรหัส SG5 ไม่มีสายพันธุ์ใดที่รอดชีวิตหลังการฉายรังสี

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารวุ้น chitin medium พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทยังสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ และมีความสามารถแตกต่างกัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี และขนาดของโคโลนี อยู่ระหว่าง 1.0 – 2.0 ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข2-ข4

เมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ทั้ง 119 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช ทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีพร้อมกับเชื้อราโรคพืชบนอาหาร GMP และ chitin medium พบว่า มีเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้เพียง 13 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้สูงกว่าสายพันธุ์แม่ และเมื่อเชื้อแอคติโนมัยสีเจริญเติบโตบนอาหาร chitin medium และมีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้สูงกว่าบนอาหาร GMP จากผลการทดลอง เชื้อรหัส SG4I-35, SG4I-28, SG4I-37 และ SJ9I-15 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *F. sporotrichiodes* ได้สูง และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 67.0, 66.7, 66.7 และ 66.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรหัส SG4I-17 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *R. solani* ได้สูง และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อรหัส SG4 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 66.5 และ 66.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรหัส SG4I-38 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้สูงที่สุด และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อรหัส SG4I-17 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 80.2 และ 80.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า เชื้อรหัส SG4I-17, SG4I-38 และ SJ9I-15 สามารถควบคุมการเติบโตของเชื้อราที่ทำการทดสอบได้สูงที่สุด และได้นำเชื้อ 3 ไอโซเลทนี้ ไปศึกษา

ประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูกร่วมกับสารละลาย swollen chitin เปรียบเทียบกับสายพันธุ์แม่ ซึ่งได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส SG4 และ SJ9

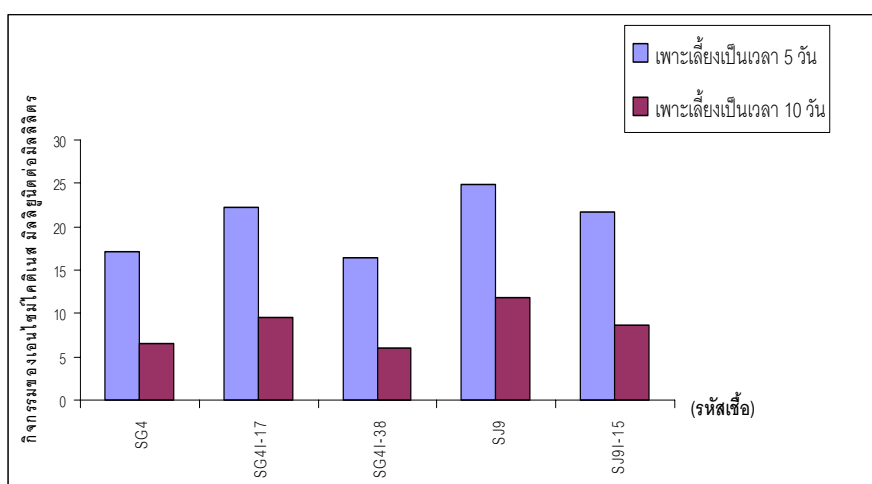
ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช (ทั้ง 3 ชนิด) บนอาหาร GMP medium และ chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช

รหัส	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช					
	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Sclerotium rolfii</i>	
	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium	GMP	chitin medium
SA6	8.0 ^f	3.5 ^h	45.1 ^c	54.0 ^d	0.0 ^j	2.7 ^j
SG4	27.7 ^d	31.2 ^f	54.5 ^a	66.2 ^a	16.3 ⁱ	19.2 ^h
SG5	19.8 ^c	28.0 ^g	38.2 ^c	57.2 ^c	32.3 ^h	12.0 ⁱ
SJ9	7.8 ^f	0.0 ⁱ	56.3 ^a	63.3 ^b	32.0 ^h	4.0 ^j
SA6I-8	0.0 ^h	3.6 ^h	18.2 ^h	6.0 ^j	37.7 ^g	54.0 ^g
SA6I-9	8.0 ^f	3.8 ^h	34.4 ^f	42.6 ^f	44.0 ^c	60.0 ^c
SA6I-23	0.0 ^h	3.6 ^h	22.1 ^g	18.2 ⁱ	48.0 ^d	57.7 ^{ef}
SA6I-32	20.0 ^c	28.5 ^g	55.0 ^a	38.5 ^g	60.0 ^a	54.0 ^g
SA6I-36	4.0 ^g	33.0 ^c	38.5 ^c	63.4 ^b	52.0 ^c	63.8 ^d
SG4I-17	62.0 ^a	64.0 ^b	55.0 ^a	66.5 ^a	60.3 ^a	80.0 ^a
SG4I-26	58.0 ^b	40.0 ^d	34.2 ^f	53.0 ^d	55.2 ^b	66.5 ^d
SG4I-27	50.0 ^c	64.0 ^b	50.5 ^b	46.0 ^e	52.0 ^c	64.0 ^d
SG4I-28	58.0 ^b	66.7 ^a	38.4 ^c	28.4 ^h	60.3 ^a	55.8 ^{fg}
SG4I-35	58.0 ^b	67.0 ^a	43.0 ^d	45.7 ^c	48.0 ^d	74.9 ^b
SG4I-37	62.0 ^a	66.7 ^a	50.8 ^b	45.0 ^c	44.0 ^c	72.0 ^c
SG4I-38	62.0 ^a	60.0 ^c	50.8 ^b	62.4 ^b	60.0 ^a	80.2 ^a
SJ9I-15	60.0 ^{ab}	64.0 ^b	56.0 ^a	59.0 ^c	40.0 ^f	76.0 ^b

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. ผลของการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งเชื้อราโรคพืช *S. rolfsii* ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์แม่ SG4 และ SJ9 และ สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี SG4I-17, SG4I-38 และ SJ9I-15 ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว chitin medium ที่มี swollen chitin เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท เป็นเวลา 5 วัน เชื้อรหัส SJ9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงที่สุด เท่ากับ 24.9 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ เชื้อรหัส SG4I-17, SJ9I-15, SG4 และ SG4I-38 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเท่ากับ 22.3, 21.7, 17.2 และ 16.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ทุกไอโซเลทผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไคตินเอสจะถูกผลิตขึ้นในช่วงของการเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zheng และคณะ (1993) ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงสุด คือ 21.0 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคติน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-6 วัน และ Gupta และคณะ (1995) ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces viridificans* สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงที่สุด คือ 0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี colloidal chitin ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลว chitin medium เป็นเวลา 5 และ 10 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตสารสกัดหยาบ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีตแต่ละไอโซเลตมีปริมาณ และประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีตจะมีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด โดยพบว่า เชื้อรหัส SG4 มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด เท่ากับ 0.032 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง เท่ากับ 1.02 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีต ทั้ง 5 ไอโซเลต ที่เจริญในอาหารเหลว chitin medium เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 และ 10 วัน ในการผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้ง การเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii*

รหัส	ปริมาณ และประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อ <i>S. rolfsii</i>			
	เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน		เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน	
	ปริมาณสารสกัด(%)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ในการยับยั้ง ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ปริมาณสารสกัด(%)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ในการยับยั้ง ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
SG4	0.008 ^a	1.0	0.032 ^a	1.0
SG4I-17	0.003 ^b	1.0	0.007 ^d	1.0
SG4I-38	0.007 ^a	1.0	0.024 ^b	1.0
SJ9	0.003 ^b	4.1	0.010 ^d	4.1
SJ9I-15	0.007 ^a	8.2	0.014 ^b	8.0
C ^{2/}	0.001 ^c	NG	0.001 ^c	NG

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกัน ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{2/} อาหารเลี้ยงเชื้อ chitin medium ที่ไม่ได้เพาะเชื้อแอคติโนมัยซีต

NG ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii*

จากผลการทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนไมซีตเป็นเวลา 10 วัน พบว่า จะมีปริมาณสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ในปริมาณที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ทั้งนี้เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นสารที่ผลิตในช่วงหลังการเติบโต (Goodfellow *et al.*, 1988; Gome *et al.*, 2001; Taechowisan *et al.*, 2003; Getha *et al.*, 2005) จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนไมซีตในอาหารเหลว chitin medium เป็นเวลา 10 วัน สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

5. ผลของเชื้อแอสคิโนไมซีตร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอสคิโนไมซีตที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแอสคิโนไมซีต สายพันธุ์แม่ รหัส SG4 และ SJ9 และเชื้อแอสคิโนไมซีตที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SG4I-17, SG4I-38 และ SJ9I-15 ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก โดยใช้เชื้อแอสคิโนไมซีตที่ใส่ และไม่ใส่สารละลาย swollen chitin และตรวจการรอดชีวิตของต้นมะเขือเทศที่ 7 และ 14 วัน พบว่า ต้นมะเขือเทศที่ควบคุมการเกิดโรคโดยใช้เชื้อแอสคิโนไมซีต มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายแตกต่างกับวิธีการควบคุมที่เพาะเชื้อโรคพืชเพียงอย่างเดียว (control 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

จากผลการทดลอง พบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอสคิโนไมซีตร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีผลในการควบคุมโรคได้สูงกว่าการใช้เชื้อแอสคิโนไมซีตเพียงอย่างเดียว 6-13 เปอร์เซ็นต์ โดยการใช้เชื้อรหัส SG4I-38 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงที่สุด ทั้งวิธีการที่ใช้เชื้อแอสคิโนไมซีตแบบไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin แต่พบว่าการใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีผลในการควบคุมโรคได้สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ หลังการทดสอบเป็นเวลา 14 วัน เท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการใช้เชื้อรหัส SG4 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศเท่ากับ 66.6 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการใช้เชื้อรหัส SG4I-17 แบบไม่ใส่สารละลาย swollen chitin มีผลในการควบคุมโรคได้ต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศหลังการทดสอบเป็นเวลา 14 วัน เท่ากับ 13.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของด้้นมะเขือเทศ หลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของ
มะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย
swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

รหัส	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของด้้นมะเขือเทศ			
	ระยะเวลาหลังการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีท			
	7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C
SG4	66.6 ^b	73.3 ^{bc}	53.3 ^{bc}	66.6 ^b
SG4I-17	33.3 ^d	46.6 ^d	13.3 ^{de}	26.6 ^d
SG4I-38	73.3 ^b	80.0 ^b	60.0 ^b	73.3 ^b
SJ9	60.0 ^c	66.6 ^c	33.3 ^{cd}	46.6 ^c
SJ9I-15	53.3 ^c	66.6 ^c	33.3 ^{cd}	46.6 ^c
Control 1 ^{2/}	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a
Control 2 ^{3/}	6.6 ^d	13.3 ^e	0.0 ^e	6.6 ^e

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน
ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfsii*

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ปริมาณ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ของสารสกัด
 หยาบที่สกัดจากดินหลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ
S. rolfsii โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7
 และ 14 วัน

รหัส	ปริมาณสารสกัด(%)				ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดหยาบในการยับยั้ง				กิจกรรมของเอนไซม์ ไคติเนส			
					(µg/µl)				(mU/g soil)			
	7 วัน		14 วัน		7 วัน		14 วัน		7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C
SG4	0.021 ^b	0.024 ^b	0.033 ^b	0.034 ^b	2.0	2.0	4.1	4.1	1.8 ^c	2.9 ^d	3.0 ^b	5.5 ^d
SG4I-17	0.016 ^{de}	0.017 ^c	0.023 ^d	0.023 ^d	2.0	2.0	4.1	4.1	2.2 ^b	3.5 ^c	3.7 ^a	6.7 ^b
SG4I-38	0.026 ^a	0.027 ^a	0.036 ^a	0.037 ^a	2.0	2.0	4.1	4.1	0.0 ^d	2.0 ^c	2.7 ^c	4.3 ^c
SJ9	0.019 ^c	0.020 ^d	0.023 ^d	0.024 ^d	8.2	8.2	8.2	16.4	3.0 ^a	6.3 ^a	3.9 ^a	9.6 ^a
SJ9I-15	0.021 ^b	0.022 ^c	0.025 ^c	0.028 ^c	8.2	8.2	16.4	16.4	2.2 ^b	5.0 ^b	3.2 ^b	6.3 ^c
Control 1 ^{2/}	0.017 ^d	0.016 ^c	0.019 ^f	0.019 ^c	NG	NG	NG	NG	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^f
Control 2 ^{3/}	0.015 ^c	0.017 ^c	0.021 ^c	0.020 ^c	NG	NG	NG	NG	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^f

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน
 ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช่เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfsii*

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

NG ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii*

จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช *S. rolfii* ในห้องปฏิบัติการ ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร chitin medium ที่มีสารละลาย swollen chitin เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลให้เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร GMP ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้น (Yuan and Crawford, 1995; Mahadevan and Crawford, 1997; Berg *et al.*, 2001; Sid Ahmed *et al.*, 2003) ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเมื่อใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับไคตินสูงกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *S. rolfii* และศึกษากลไกในการควบคุมโรคของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ ปริมาณเอนไซม์ไคติเนสพบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลตต่าง ๆ มีปริมาณของสารสกัดหยาบแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ และสารสกัดหยาบที่ได้จากดินที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากดินในวิธีการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 9

หลังการปลูกต้นมะเขือเทศเป็นเวลา 7 และ 14 วัน สารสกัดหยาบที่ได้จากดินที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส SG4I-38 ผสมกับสารละลาย swollen chitin มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูงสุด โดยมีปริมาณสารสกัดหยาบ 0.027 และ 0.037 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง ตามลำดับ และสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากับ 2.0 และ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และพบว่า การควบคุมโรคโดยเชื้อรหัส SG4I-17 เพียงอย่างเดียวมีปริมาณสารสกัดหยาบน้อยที่สุด โดยมีปริมาณสารสกัดหยาบ 0.016 และ 0.023 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากับสารสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรหัส SG4I-38 คือ 2.0 และ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในวิธีการที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อ SJ9I-15 มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการที่ใช้เชื้อ SG4I-17 แต่สารสกัดหยาบที่

ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้ต่ำกว่า โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากับ 8.2 และ 16.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากการพิจารณาปริมาณการผลิตสารสกัดหยาบ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ที่ได้ พบว่ามีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการควบคุมโรค จากเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ใช้เชื้อแอคติโนมัยสิท รหัส SG4I-38 และ SG4 ทั้งแบบผสม และไม่ผสมกับสารละลาย swollen chitin มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ และประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในทั้ง 2 วิธีการนี้ ที่มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูงที่สุด จากการทดลอง พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสิท รหัส SG4I-17 ผลิตสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ในระดับเดียวกับเชื้อรหัส SG4I-38 และ SG4 แต่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำกว่า เป็นผลเนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสิท รหัส SG4I-17 มีปริมาณสารสกัดหยาบน้อยกว่าเชื้อรหัส SG4I-38 และ SG4 และจากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้สารสกัดหยาบที่เชื้อแอคติโนมัยสิท SJ9I-15 ผลิตจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราในระดับที่ไม่สูง แต่ถ้าผลิตขึ้นมาในปริมาณมาก จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคดีกว่าเชื้อ SG4I-17 ที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* สูง แต่ผลิตได้ในปริมาณต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 9

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในวิธีการต่างๆ หลังทำการทดสอบเป็นเวลา 14 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้ลดลง เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดดินโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate นอกจากจะสกัดได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสิทผลิตขึ้นแล้ว ยังมีสารบางส่วนซึ่งมาจากผลพลอยได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยสิท และ ต้นมะเขือเทศที่ปล่อยสารอินทรีย์วัตถุในดินที่สามารถละลายในตัวทำละลาย Ethyl acetate ปนมาด้วย (พรทิพย์, 2548) ในขณะที่ปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสิทผลิตขึ้นในดินนั้นมีน้อยมาก จึงส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้นถูกเจือจางลงด้วยสารที่ปนเปื้อนเหล่านั้น เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* จึงให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ลดลง

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่ต่างไอโซเลทกัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้ในระดับที่ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแต่ละไอโซเลทผลิตขึ้น โดย Trejo-Estrada (1998) รายงานถึงความสามารถของเชื้อ *Streptomyces violaceusniger* YCED 9 ในการผลิตสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ nigericin, geldanamycin และสารประกอบเชิงซ้อนพวก macrocyclic lactone

antibiotic ซึ่งตรวจพบ nigericin บริเวณดิน และ หน้ที่เพาะเชื้อ ซึ่งพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้ในระดับที่ต่างกัน และสาร munumbicins A, B, C และ D ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. (NRRL 3052) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน ตลอดจนเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Castillo *et al.*, 2002) ถึงแม้สารที่ผลิตขึ้นจะสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลาย แต่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ต่างกันตามไปด้วย (Trejo-Estrada, 1998)

จากการเก็บตัวอย่างดินในวิธีการต่างๆ มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส พบว่าเมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทควบคุมโรคเพียงอย่างเดียว เมื่อปลูกพืชเป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลตต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยการใช้เชื้อรหัส SJ9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงที่สุด คือ 6.3 และ 9.6 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ และพบว่า การใช้เชื้อรหัส SG4I-38 ในการควบคุมโรค มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ต่ำที่สุด คือ 2.0 และ 4.3 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสที่สกัดจากดินหลังการทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส (Mahadevan and Crawford, 1997; Gome *et al.*, 2000; El-Tarabily, 2003) การเติมสารละลาย swollen chitin ลงไปในดินนอกจากจะเป็นการเพิ่มแหล่งไคตินให้กับเชื้อแอคติโนมัยสีทแล้ว สารละลาย swollen chitin ที่เติมลงไปยังอยู่ในรูปที่ง่ายต่อการที่จะนำไปใช้มากกว่าแหล่งไคตินที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติซึ่งเกิดจากการทับถมกันของซากพืช ซากสัตว์ รวมทั้งแมลงชนิดต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป ball-milled chitin ที่จะยากต่อการย่อยสลาย ดังรายงานการวิจัยของ Nawani และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Microbispora* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม colloidal chitin เป็นตัวเหนียวการสร้างเอนไซม์ไคตินเอส มีผลทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงกว่าใช้ chitin flakes และงานวิจัยของ Mahadavan *et al.* (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบ ไคตินชนิดต่างๆ เช่น chitin powder, chitin flakes และ colloidal chitin (1% w/w) เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนียวนาให้เชื้อ *Trichoderma* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสในสภาพการหมักแบบ solid state โดยพบว่า วัสดุหมักที่ประกอบด้วยรำข้าวสาลีที่ผสมกับ colloidal chitin (1% w/w) ให้กิจกรรมของเอนไซม์

ไคตินเอสสูงที่สุดถึง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ในการควบคุมการเกิดโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทผสมกับ สารละลาย swollen chitin ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงกว่าการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อ แอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างดินใน แต่ละวิธีการนั้น มีปริมาณต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว chitin medium ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยภายนอกหลายๆ ปัจจัย ที่ส่งผลให้เอนไซม์ไคตินเอสเสียสภาพ ทำให้พบปริมาณเอนไซม์ไคตินเอสในดินน้อยกว่าในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่ถึงอย่างไร พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ แอคติโนมัยสีทในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว chitin medium โดยเชื้อ รหัส SJ9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงที่สุด และเชื้อรหัส SG4I-38 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไคตินเอสต่ำที่สุด

จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณของเอนไซม์ไคตินเอสที่ตรวจพบ มีความสัมพันธ์กับ เปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ ซึ่งพบว่า การควบคุมการเกิดโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท ร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสในปริมาณสูงกว่าการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เดียวกัน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้น มะเขือเทศสูง แสดงให้เห็นว่า การใช้สารละลาย swollen chitin เข้าร่วมในการควบคุมโรคสามารถ ส่งเสริมให้เชื้อแอคติโนมัยสีทมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศจากเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูงขึ้น ซึ่งทั้งนี้ เป็นผลมาจากเอนไซม์ไคตินเอสที่เชื้อแอคติโนมัยสีทได้ผลิตขึ้น ผลการ ทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomes *et al.* (2000) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคตินเอส ต่อการควบคุมโรคพืช โดยพบว่า เอนไซม์ไคตินเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกจากดินที่ บริเวณ cerrado ในตอนกลางของประเทศบราซิล สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *Collectotrichum gloeoporioides*, *Magnaporthe grisea* และ *Aspergillus parasiticus* และงานวิจัยของ Abd-Allah (2001) ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces plicatus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ดี สามารถ ควบคุมการเกิดโรคสูง โดยไปยับยั้งการงอกของสปอร์ การยืดตัวของ germ tube และการเติบโตของ เส้นใยเชื้อราโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria alternata* และ *Verticillium albo-atrum*

จากการทดลองพบว่า วิธีการที่ตรวจพบการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงสุดไม่ได้แสดงถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด ดังเช่น วิธีการที่ใช้เชื้อรหัส SJ9 ในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่า มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงที่สุด แต่มีผลต่อการควบคุมโรคได้ต่ำกว่า การใช้เชื้อรหัส SG4I-38 ที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากกลไกในการควบคุมโรคพืชที่มีประสิทธิภาพอาจเกิดร่วมกันจากหลายๆ ปัจจัยนอกเหนือไปจากการทำงานของเอนไซม์ไคตินเอสเพียงปัจจัยเดียว (El-Tarabily, 2003) เช่น ความสามารถในการแก่งแย่งอาหาร ความสามารถในการเป็นปรสิตโดยใช้เส้นใยเข้าพันรัดเส้นใยโรคพืชแล้วแทงผ่านเข้าภายในเส้นใยเพื่อใช้เป็นอาหาร ทำให้เกิดการฉีกขาดและสลายในส่วนของผนังเซลล์ และตายในที่สุด (Lorito *et al.*, 1994) การผลิตสารบางชนิด เช่น ฮอร์โมนเพื่อส่งเสริมให้พืชมีความต้านทานต่อการเกิดโรคได้ดีขึ้น (Doumbou *et al.*, 2001; Coombs *et al.*, 2004) รวมถึงความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อปฏิปักษ์ซึ่งสารนี้มีผลในการยับยั้งหรือต่อต้านต่อการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช หรือ จุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น สารปฏิชีวนะในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides azalomycin B หรือสารพิษ (toxin) (Gesheva, 2002)

จากการเก็บตัวอย่างดินในทุก ๆ วิธีการ หลังการทดสอบ เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน ปริมาณ 10 กรัมต่อกรรมวิธี มาตรวจนับปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทในดิน ด้วยวิธี dilution plate count พบว่า ในทุกๆ วิธีการ ปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทำการทดสอบที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 10 จำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินในทุกวิธีการที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีแนวโน้มสูงกว่าการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสที่มีสมบัติในการย่อยสลายไคติน (Goodfellow *et al.*, 1988; Lazzarini *et al.*, 2000; Abd-Allah, 2001) ดังนั้นการใส่สารละลาย swollen chitin ลงไปในดินจึงเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารให้กับเชื้อแอคติโนมัยสีท เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงขึ้น

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินจากวิธีการต่าง ๆ หลังเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีท เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศร่วมกับสารละลาย swollen chitin

รหัส	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทในตัวอย่างดิน ($\times 10^7$ หน่วยโคโลนี/กรัมดิน)					
	ระยะเวลาหลังการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีท					
	0 วัน		7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C	NC	C
SG4	2.5 ^a	2.4 ^a	5.2 ^b	6.1 ^b	17.6 ^b	20.0 ^c
SG4I-17	2.2 ^c	2.1 ^b	4.1 ^c	5.4 ^c	10.1 ^d	12.1 ^d
SG4I-38	2.3 ^{bc}	2.0 ^b	6.4 ^a	7.5 ^a	22.0 ^a	29.0 ^a
SJ9	2.4 ^{ab}	2.4 ^a	5.1 ^b	5.5 ^c	13.7 ^d	24.0 ^b
SJ9I-15	2.0 ^d	2.1 ^b	4.1 ^c	3.3 ^d	13.1 ^d	23.0 ^b
Control 1 ^{2/}	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^d	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^c
Control 2 ^{3/}	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^d	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^c

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfsi*

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก พบว่า การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส SG4I-38 และ SG4 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ มีความสามารถในการผลิตสัคตินในปริมาณที่สูง ตลอดจนสารที่ผลิตมีฤทธิ์ต่อการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูงที่สุด รวมทั้งยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 2 ไอโซเลตนี้ ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งถึงแม้จะผลิตในปริมาณที่ไม่สูง แต่ก็พบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตขึ้นมีผลในการช่วยส่งเสริมให้เชื้อแอคติโนมัยสีทควบคุมโรคได้สูงขึ้น โดยเอนไซม์ไคติเนสจะไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. rolfii* ให้มีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสีทได้ผลิตขึ้น จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ประยุกต์ที่มีความสามารถเพียงด้านใดด้านเดียวเท่านั้น (Lorito *et al.*, 1996; Mahadevan and Crawford, 1997; Marja, 2000) งานวิจัยที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuan and Crawford (1995) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด พบว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชหลายชนิด และ เมื่อนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า สามารถผลิตสาร extracellular antifungal metabolite และเอนไซม์ไคติเนสได้สูง

จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และสารสัคตินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. rolfii* ได้สูงกว่าสายพันธุ์แม่เพียงเล็กน้อย จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี และ สายพันธุ์แม่มีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งทั้งนี้อาจเกิดจากผลของการฉายรังสีเพื่อเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์อาจให้ผลในหลายรูปแบบ ทั้งในแง่บวก คือเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีมีความสามารถในการควบคุมโรคสูงกว่าสายพันธุ์แม่ หรือในทางตรงกันข้ามให้ผลในทางลบ คือเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีมีความสามารถในการควบคุมโรคต่ำกว่า เช่นการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Actinoplanes italicus* ที่นำไปกลายพันธุ์ พบว่า เชื้อดังกล่าวไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อที่จะย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา *P. tabacinum* ได้ จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. tabacinum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองลดลง (El-Tarabily, 2003)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท ได้ทั้งสิ้น จำนวน 4 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ SG4, SG4I-38, SJ9 และ SJ9I-15 เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรคเน่าระดับดินที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทแบบไอโซเลทผสม ร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* ในระดับกระถางปลูก

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *S. rolfsii* จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์แม่รหัส SG4 และ SJ9 และเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SG4I-38 และ SJ9I-15 เพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทแบบไอโซเลทผสมร่วมกับไคติน ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศ ในการทดลองระดับกระถางปลูก โดยทำการทดสอบทั้งแบบที่ร่วมกัน 2 ไอโซเลท และร่วมกันแบบพบกันทุกไอโซเลท และตรวจผลการรอดชีวิตของต้นมะเขือเทศที่ 7 และ 14 วัน

จากผลการทดลอง พบว่า ต้นมะเขือเทศที่ควบคุมการเกิดโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมทุกตัวอย่างทดลอง ทั้งการใช้ร่วมกับสารละลาย swollen chitin หรือใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายแตกต่างกันกับการควบคุมที่เพาะเชื้อโรคพืชเพียงอย่างเดียว (control 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และการควบคุมโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทแบบไอโซเลทเดี่ยวต่อการควบคุมโรค

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่า พบว่า การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทผสมระหว่างรหัส SG4 และ SG4I-38 มีประสิทธิภาพต่อการควบคุมโรคได้สูงที่สุด ทั้งวิธีการที่ใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin หรือวิธีการที่ใช้เชื้อเพียงอย่างเดียว แต่การใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin ส่งผลให้เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถควบคุมโรคได้สูงขึ้น โดยหลังการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน การใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และ การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ 66.6 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า การใช้เชื้อไอโซเลทผสมระหว่างรหัส SG4 และ SJ9I-15 และไอโซเลทผสมระหว่างรหัส SG4I-38 และ SJ9 มีผลในการควบคุมโรคได้ต่ำที่สุด ทั้งการใช้เชื้อแบบใส่ และไม่ใส่สารละลาย swollen chitin โดยพบว่า การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียวมีผลต่อการควบคุมโรคได้ต่ำ

ที่สุด โดยหลังการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ 26.6 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 เปอร์เซนต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ หลังการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfii* โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิท ไอโซเลทผสมที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

รหัส	เปอร์เซนต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ			
	ระยะเวลาหลังการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิท			
	7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C
SG4+SG4I-38	80.0 ^b	80.0 ^b	66.6 ^b	73.3 ^b
SG4+SJ9	46.6 ^{de}	66.6 ^c	40.0 ^c	46.6 ^c
SG4+SJ9I-15	40.0 ^c	46.6 ^{ef}	26.6 ^e	33.3 ^d
SG4I-38+SJ9	40.0 ^c	40.0 ^f	26.6 ^e	33.3 ^d
SG4I-38+SJ9I-15	53.3 ^d	66.6 ^c	33.3 ^d	40.0 ^{cd}
SJ9+SJ9I-15	66.6 ^c	60.0 ^{cd}	40.0 ^c	46.6 ^c
Mix	46.6 ^{de}	53.3 ^{de}	40.0 ^c	40.0 ^{cd}
Control 1 ^{2/}	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a
Control 2 ^{3/}	6.6 ^f	13.3 ^g	0.0 ^f	6.6 ^c

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน

ในทางสถิติอย่างมี นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfii*

Mix ผสมทุกสายพันธุ์

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ปริมาณ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ของสารสกัด
หยาบที่สกัดดินหลังควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii*
โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตผสมที่ไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin เป็น
เวลา 7 และ 14 วัน

รหัส	ปริมาณสารสกัดหยาบ(%)				ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดในการยับยั้ง (µg/µl)				กิจกรรมของเอนไซม์ ไคตินเอส (mU/g soil)			
	7 วัน		14 วัน		7 วัน		14 วัน		7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C
SG4+SG4I-38	0.029 ^a	0.030 ^a	0.035 ^a	0.039 ^a	2.0	2.0	4.1	4.1	2.0 ^d	3.0 ^d	2.8 ^b	5.4 ^d
SG4+SJ9	0.021 ^{bc}	0.022 ^b	0.026 ^b	0.031 ^b	4.1	4.1	8.2	8.2	2.4 ^b	3.7 ^c	3.2 ^a	7.2 ^c
SG4+SJ9I-15	0.016 ^{bc}	0.017 ^b	0.024 ^c	0.025 ^d	8.2	16.4	16.4	16.4	0.0 ^e	2.4 ^c	1.8 ^d	3.7 ^f
SG4I-38+ SJ9	0.018 ^{bc}	0.020 ^b	0.023 ^c	0.026 ^d	8.2	8.2	16.4	16.4	0.0 ^e	2.2 ^c	2.2 ^c	4.4 ^e
SG4I-38+ SJ9I-15	0.021 ^{bc}	0.020 ^b	0.027 ^b	0.029 ^c	8.2	8.2	16.4	16.4	2.2 ^c	3.8 ^c	2.9 ^b	7.0 ^c
SJ9+SJ9I-15	0.020 ^{bc}	0.020 ^b	0.026 ^b	0.027 ^d	8.2	8.2	16.4	16.4	2.7 ^a	5.6 ^a	3.3 ^a	8.0 ^a
Mix	0.022 ^b	0.021 ^b	0.026 ^b	0.026 ^d	8.2	8.2	16.4	16.4	2.6 ^a	5.2 ^b	2.9 ^b	7.5 ^b
Control 1 ^{2/}	0.017 ^{bc}	0.016 ^b	0.019 ^c	0.019 ^c	NG	NG	NG	NG	0.0 ^e	0.0 ^f	0.0 ^e	0.0 ^g
Control 2 ^{3/}	0.015 ^c	0.017 ^b	0.021 ^d	0.020 ^e	NG	NG	NG	NG	0.0 ^e	0.0 ^f	0.0 ^e	0.0 ^g

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน
ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfsii*

Mix ผสมทุกสายพันธุ์

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

NG ไม่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii*

จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูง ดังเช่นเชื้อแอคติโนมัยสีทรหัส SG4 และ SG4I-38 มาใช้ร่วมกันไม่ได้ให้ผลในการควบคุมโรคแตกต่างกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทแบบโอโซเลทเดี่ยว และพบว่า การนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถควบคุมโรคได้สูงมาใช้ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ควบคุมโรคได้น้อยกว่า โอโซเลทที่ควบคุมโรคได้ดีไม่ได้ส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และเซลลูเลส ได้สูงร่วมกัน พบว่า ให้ผลในการควบคุมโรคไม่ต่างจากการใช้โอโซเลทเดี่ยว (วารุณี, 2546) ซึ่งทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแข่งขันกันเองในด้านของการใช้สารอาหาร หรือ สารที่ต้นมะเขือเทศปลดปล่อยออกมาในระหว่างการเจริญเติบโต รวมทั้งเชื้อแอคติโนมัยสีทอาจผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาเพื่อยับยั้งกันเอง จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลดลง (Harman *et al.*, 1993; วารุณี, 2546)

จากการนำตัวอย่างดินในวิธีการต่างๆ มาสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate เพื่อตรวจวิเคราะห์การผลิตกัดหยาบ และ ฤทธิ์ของสารต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในดิน เมื่อทดสอบ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทโอโซเลทเดี่ยวในการควบคุมโรค คือ สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในวิธีการที่ใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในวิธีการที่ควบคุมโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว

จากผลการทดลอง พบว่า การใช้เชื้อโอโซเลทผสมระหว่างรหัส SG4 และ SG4I-38 ทั้งวิธีการที่ใช้เชื้อแบบไม่ใส่ และใส่สารละลาย swollen chitin มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าวิธีการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว โดยหลังการปลูกพืชเป็นเวลา 7 และ 14 วัน มีปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดิน 0.030 และ 0.039 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง ตามลำดับ และสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง เท่ากับ 2.0 และ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12

เมื่อพิจารณาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการผลิตสารสกัดหยาบทั้งปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ต่อความสามารถในการควบคุมโรคพืช พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทแบบไอโซเลตเดียวในการควบคุมโรค โดยพบว่า ปริมาณ และประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่เชื้อผลิตมีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เชื้อที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืช ได้สูงจะสามารถควบคุมโรคได้ดี (Yuan and Crawford, 1995; El-Tarabily *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2001; Getha *et al.*, 2005) จากผลการทดลอง เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูง เช่น เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตผสมระหว่าง SG4 และ SG4I-38 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้สูงเช่นเดียวกัน จากเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศหลังการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน สูงถึง 73.3 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากดินในวิธีการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตผสมระหว่าง SG4I-38 และ SJ9 และไอโซเลตผสมระหว่าง SG4 และ SJ9I-15 แบบไม่ใส่สารละลาย swollen chitin หลังการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณสารสกัดต่ำที่สุด คือ 0.023 และ 0.024 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้งและสารสกัดที่ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* ได้ต่ำเช่นเดียวกัน โดยทั้ง 2 วิธีนี้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากัน คือ 16.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 12) จึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ต่ำตามไปด้วย จากเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่เหลือเพียง 26.6 เปอร์เซ็นต์ และ การนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. rolfii* ได้สูง 2 ไอโซเลตร่วมกันในการควบคุมโรค ไม่ได้แสดงถึงแนวโน้มที่จะสามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfii* ได้เพิ่มขึ้น จากผลการทดลอง พบว่า การนำเชื้อที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้สูง มาใช้ร่วมกับเชื้อที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้ต่ำกว่า ก็มีแนวโน้มในการส่งเสริมให้มีการผลิตสารสกัดหยาบที่มีปริมาณ และ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้มากขึ้นแต่อย่างใด

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสจากดินในวิธีการต่างๆ พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลตเดี่ยว คือ ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในทุกวิธีการที่ควบคุมโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีท และวิธีการควบคุมโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงกว่าการไม่ใช้สารละลาย swollen chitin จากการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสหลังทำการทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่า วิธีการ

ที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอลิโอสเลทผสมระหว่าง รหัส SJ9 และ SJ9I-15 ร่วมกับ สารละลาย swollen chitin มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุด คือ 5.6 และ 8.0 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ และพบว่า หลังการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน การใช้เชื้อไอลิโอสเลทผสมระหว่างรหัส SG4I-38 ร่วมกับ SJ9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสต่ำที่สุด โดยมีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเฉพาะในวิธีการที่ใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 2.2 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 14 วัน พบว่า การใช้เชื้อไอลิโอสเลทผสมระหว่างรหัส SG4 และ SJ9I-15 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ต่ำที่สุด ทั้งในวิธีการที่ใช้เชื้อร่วมกับสารละลาย swollen chitin หรือใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 3.7 และ 1.8 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

เมื่อพิจารณาผลของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้นต่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรค พบว่า ผลการทดลองที่ได้เป็นการสนับสนุนผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอลิโอสเลทเดียวในการควบคุมโรค ที่พบว่า เอนไซม์ไคติเนสมีผลในทางส่งเสริมประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมโรค (Gomes *et al.*, 2000) จากการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin ในการควบคุมโรค ที่พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว ในขณะเดียวกัน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศสูงกว่าเช่นเดียวกัน และการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทไอลิโอสเลทผสมระหว่างเชื้อรหัส SG4 และ SJ9I-15 และไอลิโอสเลทผสมระหว่างรหัส SG4I-38 และ SJ9 ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่ต่ำที่สุด ในขณะเดียวกันก็พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศต่ำที่สุดเช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทแบบไอลิโอสเลทต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่า การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูง ซึ่งได้แก่ เชื้อรหัส SJ9 และ SJ9I-15 มาใช้ร่วมกันเพื่อควบคุมโรค ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้ในปริมาณที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อไอลิโอสเลทอื่น ๆ แต่ถึงอย่างไร กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ตรวจพบมีระดับที่ใกล้เคียงกับวิธีการที่ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อไอลิโอสเลทเดียว และการนำเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงมาใช้ร่วมกับเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ต่ำกว่า ไม่ได้มีการส่งเสริมความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสให้สูงขึ้นแต่อย่างใด ซึ่งพบว่าหลังการควบคุมโรคเป็นเวลา 14 วัน การใช้เชื้อ SJ9I-15 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส 6.3 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง (ตารางที่ 9) เมื่อนำมาใช้ควบคุมโรคร่วมกับ SG4 ผสมกับสารละลาย swollen chitin พบว่า หลังการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน มี

กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเอสเตอเรส 3.7 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง (ตารางที่ 12) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการศึกษาความสามารถในการผลิตสารสกัด และประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ในดิน ซึ่งล้วนแต่เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรคทั้งสิ้น

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินในทุก ๆ วิธีการ ภายหลังเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิท เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน มาตรวจนับจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทในดิน ด้วยวิธี dilution plate count พบว่า ในทุกวิธีการ จำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสิทมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงต้นมะเขือเทศที่เพิ่มขึ้น และ การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทสูงกว่าการไม่ใช้สารละลาย swollen chitin ดังแสดงในตารางที่ 13

จากการทดลอง พบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลทผสมระหว่าง รหัส SG4 และ SJ9I-15 และไอโซเลทผสมระหว่างเชื้อรหัส SG4I-38 และ SJ9 มีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสิทน้อยกว่าวิธีการอื่นๆ โดยมีจำนวนเชื้อ 7.1×10^7 และ 8.7×10^7 หน่วยโคโลนีต่อกรัมดินตามลำดับ สำหรับการใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทร่วมกับสารละลาย swollen chitin และมีเชื้อแอคติโนมัยสิท จำนวน 6.5×10^7 และ 7.4×10^7 หน่วยโคโลนีต่อกรัมดิน ตามลำดับ สำหรับการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทเพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ ที่พบว่า การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลทผสมระหว่าง รหัส SG4 และ SJ9I-15 และระหว่างเชื้อรหัส SG4I-38 และ SJ9 มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายหลังการทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ และเมื่อพิจารณาปริมาณของเอนไซม์ไคตินเอส และ สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ได้จาก 2 วิธีการนี้ พบว่า มีปริมาณต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสิทแต่ละไอโซเลทเกิดการแข่งขันกันเองในด้านต่าง ๆ ส่งผลให้จำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสิทในดินลดลง จึงส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ลดลง และสุดท้ายประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* จึงลดลงตามไปด้วย (Gomes *et al.*, 2001; Madhavan *et al.*, 2004; Nawani and Kapadnis, 2005)

ตารางที่ 13 จำนวนเชื้อแอคติโนมัลลิตในดินจากวิธีการต่าง ๆ หลังเพาะเชื้อแอคติโนมัลลิต
ไอโซเลทผสม เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรค
รากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfii* ร่วมกับสารละลาย
swollen chitin

รหัส	ปริมาณเชื้อแอคติโนมัลลิตในตัวอย่างดิน ($\times 10^7$ หน่วยโคโลนีต่อกรัม)					
	ระยะเวลาหลังการเพาะเชื้อแอคติโนมัลลิต					
	0 วัน		7 วัน		14 วัน	
	NC	C	NC	C	NC	C
SG4+SG4I-38	2.90 ^a	2.30 ^b	8.20 ^a	8.10 ^a	12.90 ^c	26.00 ^a
SG4+SJ9	2.00 ^d	3.90 ^a	6.70 ^c	6.80 ^c	9.40 ^d	27.00 ^a
SG4+SJ9I-15	2.00 ^d	2.30 ^b	3.50 ^f	5.20 ^e	6.50 ^f	7.10 ^e
SG4I-38+SJ9	2.20 ^c	2.10 ^c	4.20 ^e	5.80 ^d	7.40 ^e	8.70 ^e
SG4I-38+SJ9I-15	3.00 ^a	2.10 ^c	6.70 ^c	7.40 ^b	16.70 ^b	19.00 ^c
SJ9+SJ9I-15	2.70 ^b	1.90 ^d	7.40 ^b	8.10 ^a	32.00 ^a	24.00 ^b
Mix	2.90 ^a	2.10 ^c	5.60 ^d	6.90 ^c	9.80 ^d	17.00 ^d
Control 1 ^{2/}	0.00 ^e	0.00 ^e	0.00 ^g	0.00 ^f	0.00 ^g	0.00 ^f
Control 2 ^{3/}	0.00 ^e	0.00 ^e	0.00 ^g	0.00 ^f	0.00 ^g	0.00 ^f

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งของตารางซึ่งตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกัน
ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{2/} วิธีการควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อ

^{3/} วิธีการควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfii*

Mix ผสมทุกสายพันธุ์

NC ไม่ใส่สารละลาย swollen chitin

C ใส่สารละลาย swollen chitin

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทแบบไอโซเลทเดี่ยว และ ไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin โดยนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้ดีในห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์แม่ SG4 และ SJ9 และเชื้อแอคติโนมัยสิทที่ผ่านการฉายรังสี ได้แก่ SG4I-17, SG4I-38 และ SJ9I-15 มาใช้ควบคุมโรค พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้แตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และสารสกัดที่มีปริมาณ และฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfii* ได้แตกต่างกัน และสำหรับผลการทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชส่วนใหญ่จะเป็นผลมาจากการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้น และมีเอนไซม์ไคตินเอสเป็นส่วนที่ช่วยเสริมให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชเกิดได้สูงขึ้น

จากผลการทดลอง พบว่า ถึงแม้เอนไซม์ไคตินเอสจะช่วยเสริมฤทธิ์ให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีขึ้น แต่ก็พบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคระหว่างการใช้อเชื้อแอคติโนมัยสิทแบบไม่ใส่ และ ใส่สารละลาย swollen chitin มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกลไกในการควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา อาจไม่ได้ต้องการเอนไซม์ไคตินเอสเพียงชนิดเดียวในการย่อยสลาย เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อรานอกจากมีไคตินเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังพบว่ามีเซลลูโลส และกลูแคนเป็นส่วนที่ช่วยเสริมให้เส้นใยของเชื้อรามีความแข็งแรงมากขึ้น ดังนั้นเพื่อให้การควบคุมโรคพืชมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจจำเป็นต้องมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ β -1,3 glucanase และ β -1,4 glucanase (Zhang, 2000) เพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์กันในการควบคุมโรคพืช ดังงานวิจัยของ El-Tarabily (2000) ที่พบว่า เชื้อ *Micromonospora carbonacea* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β -1,3 glucanase และเอนไซม์ไคตินเอสได้สูง สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราโรคพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราถลอก ส่งผลให้สามารถลดการเกิดโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเสริมให้เชื้อมีความสามารถในการควบคุมโรคได้ดีขึ้นแล้วยังพบว่า อาจเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทในการควบคุมโรคโดยการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทลงในดินในช่วงของการเตรียมแปลงสำหรับปลูกพืชจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อแอคติโนมัยสิทสามารถควบคุมโรคพืชได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการใช้เชื้อ *Streptomyces griseoviridis* K61 สายพันธุ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชทางการค้าที่ใช้ชื่อว่า Mycostop ซึ่งพบว่าเชื้อ *S. griseoviridis* K61 มีกลไกในการควบคุม

โรคพืชที่ประกอบด้วย ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ความสามารถในการแย่งสารอาหาร รวมทั้งการเป็นปรสิตกับเชื้อราโรคพืช (Mohammadi and Lahdenpera, 1992) โดยสามารถควบคุมโรครากเน่า และโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. และ *Phytophthora* spp. ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพาะเชื้อ *S. griseoviridis* K61 ลงในแปลงปลูก เพื่อให้เชื้อมีการเติบโต และเพิ่มจำนวนในดินก่อนที่ทำการย้ายต้นกล้ามาปลูก (White *et al.*, 1990)

สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมโรคพืช โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา พบว่า ผลที่ได้อาจเกิดขึ้นได้ทั้งในด้านบวกคือ เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น ซึ่งอาจจะส่งผลให้เชื้อมีความสามารถในการควบคุมโรคได้สูงขึ้น ดังเช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4I-38 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hassan and Haggag (2006) ที่พบว่า เชื้อ *Trichoerma harzianum* ที่ฉายรังสีแกมมามีผลทำให้เชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ เช่น เอนไซม์ไคตินเอส เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ β -1,3 glucanase ได้สูง และมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ดีภายใต้สภาวะดินเค็ม หรืออาจส่งผลในด้านลบ คือ เชื้อผลิตเอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ลดลง ดังเช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4I-17 ดังเช่นงานวิจัยของ El-Tarabily *et al.*, (2003) ที่พบว่า เชื้อ *Actinoplanes italicus* ที่ผ่านการฉายรังสี ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสเพื่อที่จะย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *Plectosporium tabacinum* และการเกิดโรครากเน่าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า การเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อในการควบคุมโรคโดยการนำเชื้อที่มีความสามารถในการควบคุมโรคได้สูงมาใช้ร่วมกัน ไม่ประสบผลสำเร็จในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เนื่องจากให้ผลในการควบคุมโรคได้ไม่ต่างไปกับการใช้เชื้อไอโซเลทเดี่ยว แต่ในทางตรงกันข้ามมีรายงานการวิจัยที่พบว่า การนำเชื้อที่มีความสามารถที่ต่างด้านกันมาใช้ร่วมกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคให้สูงขึ้นได้ ดังเช่น ในงานวิจัยของ El-Tarabily *et al.* (2003) พบว่าการนำเชื้อ *Micromonospora carbonacea* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรามาใช้ร่วมกับเชื้อ *Streptomyces violascens* ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี สามารถควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราได้สูงกว่าการใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง และเพื่อให้แนวโน้มในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มขึ้น อาจมีการนำเชื้อมาใช้ผสม และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการก่อนที่จะทำการทดลองในสภาพเรือนทดลอง

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงขึ้น เช่น ความสามารถของเชื้อในการผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นไม้ ซึ่งจากงานวิจัยของ El-Tarabily (2003) และ Coombs *et al.* (2004) พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท (Non-streptomyces actinomycetes) ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือ สารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ในระดับสูง ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ สารในกลุ่มฮอร์โมน auxins ที่พบว่ามีการผลิตโดยเชื้อ *Actinomyces* spp. (Kaunat, 1969) และ gibberellins ที่พบว่ามีการผลิตโดยเชื้อ *Norcadia* spp. (Brown, 1972)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน จำนวน 197 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส บนอาหารวุ้น chitin medium จำนวน 63 ไอโซเลท และมีเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อรหัส SA6 SG4 SG5 และ SJ9 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าในพืช จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium sporotrichiodes*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* เมื่อทดสอบโดยการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช

2. เมื่อเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 4 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้ดีด้วยการฉายรังสีแกมมา พบว่า มีเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี จำนวน 119 ไอโซเลท และมีเพียง 13 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้สูงกว่าสายพันธุ์แม่ และมีเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรหัส SG4I-17 SG4I-38 และ SJ9I-15 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้สูงที่สุด จึงได้คัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในระดับกระถางปลูกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แม่ ได้แก่ เชื้อรหัส SG4 และ SJ9

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์แม่ SG4 และ SJ9 และ สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี SG4I-17 SG4I-38 และ SJ9I-15 เป็นเวลา 10 วัน ในอาหารเหลวไคติเนส จะมีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด โดยเชื้อรหัส SG4 มีปริมาณสารสกัดหยาบสูง 0.032 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และสารที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเวลา 5 วัน จะผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด โดยเชื้อรหัส SJ9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด คือ 24.9 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

3. การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับสารละลาย swollen chitin ในดินมีผลต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* หลังการทดสอบระดับกระถางปลูกเป็นเวลา 14 วัน ได้ดีกว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทเพียงอย่างเดียว 6-13 เปอร์เซ็นต์ การใช้เชื้อแอคติโนมัยสีท SG4I-38 และ SG4 มีผลให้การรอดตายของต้นมะเขือเทศสูงสุด และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของทั้ง 2 วิธีการไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 73.3 และ 66.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีกิจกรรม

ของเอนไซม์ไคตินเนส เท่ากับ 4.3 และ 5.5 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณสารสกัดหยาบสูง เท่ากับ 0.037 และ 0.034 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง และสารสกัดหยาบที่ได้จากทั้ง 2 วิธีการนี้ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากัน คือ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร การใช้เชื้อผสมระหว่าง รหัส SG4 และ SG4I-38 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin มีผลให้การรอดตายของต้นมะเขือเทศสูงกว่าการใช้เชื้อผสมคู่อื่นๆ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ เท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส เท่ากับ 5.4 มิลลิยูนิตต่อกรัมดินแห้ง และพบว่า วิธีการนี้มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด คือ 0.039 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักดินแห้ง และสารที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* เท่ากับ 4.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และจากผลการทดลองที่ได้สนับสนุนสมมุติฐานเกี่ยวกับการควบคุมโรคโดยอาศัยกลไกที่เกิดจากการทำงานร่วมระหว่างเอนไซม์ไคตินเนส และสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfii* สามารถส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคสูงขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- เครือวัลย์ ทองเล่ม. 2541. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชโดยแบคทีเรียที่ผลิตไคตินเอส. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2531. อิทธิพลของสายพันธุ์และปริมาณเชื้อโรคและการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ต่อการเกิดโรคเหี่ยวของพืชมะเขือในฝ้าย 4 สายพันธุ์. รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา: ตอนที่ 2 หลักการและบทบาท. วารสารเคหะการเกษตร. 19 (10): 159-165.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. แอคติโนมัยสีทที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช และ ไร่สุวรรณ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, พัฒน์ จันทโรทัย และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. เชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากในดินจาก พื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช และ ไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย, น. 104-111. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2540. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชกับเชื้อโรค. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิตยา สุวรรณรัตน์. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราขึ้นด่าง, น. 67-88. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และ สุวดี จันทร์กระจ่าง. 2542. การพัฒนาแผ่นบางไคโตซานเพื่อการ
กรองแยกชีวสาร, น. 28-59. ใน การสัมมนาวิชาการเรื่อง ความร่วมมือของภาครัฐ และ
เอกชนในการพัฒนาการผลิต และการใช้สารไคติน ไคโตซานแบบครบวงจร, 2-3 เมษายน
2542. โรงแรมไอเฟล, ระนอง.
- วรรณวิไล อินทนู และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2540. *Gliocladium virens* เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ
ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช. ใน รายงานการประชุมวิชาการอรัญญาพิชแห่งชาติ
ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วันวิสาข์ แฝงพิภ. 2546. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซินเอนโดไฟต์ในข้าวเพื่อควบคุมโรคใบไหม้.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วารุณี มณีนาถ. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคตินเอส
ได้สูง และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*
(Edson) Fitzp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abd-Allah E.F. 2001. *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. **Folia Microbiology**
(Praha) 46 (4): 309-314.
- Agrios, G.N. 1978. **Plant Pathology**. Academic press, New York. 703 p.
- Alexander, M. 1991. **Introduction to Soil Microbiology**. Krieger Publishing Company.
Malabar, Florida.
- Alim Al-Bari, M. A., S.A. Bhuiyan, M.E. Flores, P. Petrosyan and M.A. Islam. 2006.
Streptomyces bangladeshiensis a new microorganism isolated from soil producing bis-(2-
ethylhexyl) Phthalate. **In. J. Syst. Evolu. Micro.** 55: 1973-1977.
- Altier, N.A. and J.A. Thies. 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedling diseases in
alfalfa using a culture plate method. **Plant Dis.** 79: 341-346.

- Andriole, V.T. 2000. Current and future antifungal therapy: new target for antifungal therapy. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 16: 317-321.
- Aycock, R. 1996. Stem and rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. **N.C. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.** 174: 1-202.
- Berg, G., A. Fritze, N. Roskot and K. Smalla. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. **J. Appl. Microbiol.** 156: 75-82.
- Birber, B., J. Nuske, M. Ritzau and U. Grafe. 1998. Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **J. Antibiotics.** 51: 381–382.
- Brautaset, T., O.N. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, A.R. StrLm, S. Valla and S.B. Zotchev. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. **Chem. Biol.** 7: 395-403.
- Brown, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere, **J. Appl. Bacteriol.** 35: 443–451.
- Caffrey, P., S. Lynch, E. Flood, S. Finnan and M. Oliynyk. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and lated genes. **Chem. Biol.** 8: 713-723.
- Campelo, A.B. and J.A. Gil. 2002. The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. **Microbiol.** 148: 51-59.
- Castillo, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen, H. Albert and R. Robison. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology.** 148: 2675–2685.

- Cecilia, R.J. and A.S. Deborah. 1996. Biological Control of Fungi Causing Alfalfa Seeding Damping-off with a Disease-suppressive Strain of *Streptomyces*. **Biological Control**. 7: 196-204.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran and I. Chet. 1997. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1720-1726.
- Chris, F. 2002. **The Role of Actinomycetes in Plant Growth and Development**. Available source: http://www.bio.finders.edu.au/biotech/staff/cmmf_res.htm, July 15, 2006.
- Cody, R.M., N.D. Davis, J. Lin and D. Shaw. 1990. Screening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugar. **Biomass**. 21: 285-295.
- Coombs, J.T., P.P. Michelsen and M.M. Franco. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**. 29: 359–366.
- Cottrell, M.T., J.A. Moore and D.L. Kirchman. 1999. Chitinase from uncultured marine microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2553-2557.
- Crawford, D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps and M.A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 3899–3905.
- Cross, T. and M. Goodfellow. 1973. Taxonomy and Classification of the Actinomycetes in Sykes. In F.A. Gand, eds. **Actinomycetes characteristic and Practical Importance**. Academic press, London
- Czoch, W.P. and M. Mordarski. 1988. Actinomycete Enzymes, pp. 219–283. In M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski, eds. **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic Press, San Diego.

- Davis, J.R., O.C. Huisman, D.T. Westermann, S.L. Hafez, D.O. Everson, L.H. Sorensen and A.T. Schneider. 1973. Effects of green manures on *Verticillium* wilt of potato. **Phytopathology**. 86: 444–453.
- De La Cruz, J., J.A. Pintor-Toro, T. Benitez and A. Llobell. 1995. Purification and characterization of an endo-beta-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **J. Bacteriol.** 177: 1864-1871.
- Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. **J. Sci. Ind. Res.** 45: 273-281.
- Dionigi, C.P. 1993. **Food Flavour Safety**. 322-377.
- Di Pietro, A., M. Lorito, C.K. Hayes, R.M. Broadway and G.E. Harman. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. **Phytopathol.** 83: 308–13.
- Doumbou, C.L., M.K. Hamby Salove, D.L. Crawford and C. Beaulieu. 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection** 82: 85–102.
- Elad, Y., I. Chet and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.** 28: 719–725.
- Elango, N., J.U. Correa and E. Cabib. 1982. Secretory nature of yeast chitinase. **J. Bilo. Chem.** 257: 1398-1400.

El-Tarabily, K.A., M.L. Sykes, I.D. Kurtböke, G.E.St.J. Hardy, A.M. Barbosa and R.F.H.

Dekker. 1996. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root-rot of *Banksia grandis*. **Can. Journal of Botany**. 74: 618–624.

_____, G.E.St.J. Hardy, K. Sivasithamparam, A.M. Hussein and I.D. Kurtböke. 1997.

The potential for the biological control of cavity spot disease of carrots caused by *Pythium coloratum* by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes in Western Australia. **New Phytologist**. 137: 495–507.

_____, M.H. Soliman, A.H. Nassar, H.A. Al-Hassani, K. Sivasithamparam, F.

McKenna and G.E.St.J. Hardy. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathol.** 49: 573–583.

_____. 2003. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupine caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian J. Bot.** 51: 257–266.

_____. 2006. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. **Can. J. Bot.** 84.

Festo, N. 2006. **Pharmaceutical Compositions Containing Compounds with Activity for the Enhancement of Absorption of Active Ingredients**. U.S. Patent 7, 026, 360.

Flach, J., P.E. Pilet and P. Jolles. 1992. What is new in chitinase. *Res. Exp.* 48: 701-716.

Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **Euro. J. Soi. Biol.** 38: 85–88.

Getha, K. and S. Vikineswary. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 : Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **J. Indust. Microbiol. Biol.** 28: 303 - 310.

_____, S. Vikineswary, W.H. Wong, T. Seki, A. Ward and M. Goodfellow. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g 10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **J. Ind. Microbiol. Biol.** 32: 24-32.

Gomes, R.C., L.T.A.S. Semedo, R.M.A. Soares, C.S. Alviano, L.F. Linhares and R.R.R. Coelho. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **L. Appl. Microbiol.** 30: 146-150.

.2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **J. Appl. Microbiol.** 90: 653–661.

Gooday, G. W. 1994. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, pp. 279-312. *In* C. Ratledge, eds. **Biochemistry of Microbial Degradation**. Kluwer Acad., Netherlands.

Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. **Actinomycetes in biotechnology**. Academic Press Limited, London.

Gunaratna, K.R. and R. Balasubramanian. 1994. Partial purification and properties of extracellular chitinase produced by *Acremonium obclavatum* and antagonist to the groundnut rust, *Puccinia arachidis*. **W. J. Microbiol. Biol.** 10: 342-345.

Gupta, R., R.K. Saxena, P. Chaturvedi and J.S. Vimdi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viriditjkan*: its potential in fungal cell wall lysis. **J. Appl. Bacteriol.** 87: 378-883.

- Haggag, W.M. 2002. Hyperproducing chitinase *Trichoderma* mutants induced by gamma-ray for efficient biocontrol of *Botrytis cinerea* on tomato and cucumber plants growing in plastic houses. **Arab J. Biol.** 5 (2): 151-164.
- Hara, S., Y. Yamamura, Y. Fujii, T. Mega and T. Ikenaka. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. **J. Biochem.** 105: 484-489.
- Harman G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pirtro and C. Peterbauer. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathol.** 83: 313–318.
- Hassan, A., A. Mohamed1 and W. M. Haggag. 2006. Biocontrol Potential of Salinity Tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian J. Microbiol.** 37: 181-191.
- Hawksworth, D.L., B.C. Sutton and G.C. Ainsworth. 1983. **Answorth and Bisty's Dictionary of the fungi.** 7th ed. Commonwealth Mycol. Kew Surrey.
- Hayakawa, M., K. Ishizawa and H. Nonomura. 1988. Distribution of Rare Actinomycetes in japanese Soils. **Ferment Technology.** 66: 367 – 373.
- Hedge, V.R., M.G. Patel, M.C. Horan, A.H. King, F. Gentile, M.S. Puar and D. Loebenberg. 1998. A novel macrolactam - trisaccharide antifungal antibiotic. Taxonomy , Fermentation, Isolation. Physico-chemical properties, structure elucidation and biological activity. J. **Antibiotic.** 51: 464 – 470.
- Hedgpeth, D.L. 2005. **Adhesive Treatment for Skin Yeast Infections.** U.S. Patent 6, 942, 875.
- Igarashi, Y., K. Takagi, T. Kajiura, T. Furamai and T. Oki. 1998. Glucosylquestiomycin, a novel antibiotic from *Microbispora* sp. **J. Antibiotics.** 51: 915-920.

- Isaac, S. and D. Jennings. 1995. **Microbial Culture**. Bios Sci. Publ. Limited, London.
- Jiun-Yan W., H. Jenn-Wen, S. Hsin-Der, L. Wei-Chen and L. Yung-Chuan. 2008. Optimization of cultivation conditions for fungichromin production from *Streptomyces padanus* PMS-702. **J. Chinese Inst. Chem. Engineers**. xxx: xxx–xxx.
- Jones, C.R. and D.A. Samac. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. **Biol. Control** 7: 196-204.
- Kaunat. H. 1969. Bildung von indolderivaten durch rhizosphäreenspezifisch Bakterien und Aktinomyzeten. **Zentralblatt fuer Bakteriologie Abteilung II**. 501–515.
- Kelly, G.T., V. Sharma and M.H.W. Coran. 2008. An improved method for culturing *Streptomyces sahachiroi*: Biosynthetic origin of the enol fragment of azinomycin B. **Bioorganic Chem.** 36: 4–15.
- Kolomiets, E.I., N.A. Zdor and T.V. Romanovskaya. 2003. Investigation of antibacterial metabolites produced by *Streptomyces flavescens* B-2223. **Biol. Sci.** 51: 67-72.
- Kim, J.C. 1992. Isolation and screening of actinomycetes from natural environment. *In* **UNESCO Regional Training Workshop on Exploitation of Novel Microorganisms, Especcially Actinomycetes. Aug. 24-Sept. 2**. Taedox Science Town Taejon, Korea.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Tech.** 45: 114-120.
- Kobayashi D.Y., M. Guglielmoni and B.B. Clarke. 1995. Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas malthophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. **Soil Biol. Biochem.** 27: 1479-1487.

- Kunoh, H. 2002. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **J. Gen. Plant Pathol.** 68: 249–252.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 399-405.
- Liu, D., 1992. **Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens.** Ph.D. Thesis, University of Minnesota.
- _____, N.A., L.L.K. Anderson. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. **Phytopathol.** 85: 827-831.
- Lorito, M., G.E. Harman, C.K. Hayes, R.M. Broadway, A. Tronsmo, S.L. Woo and A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathol.** 83: 302–307.
- _____. 1994. Chitinolytic enzyme produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathol.** 83: 302–807.
- _____, S.L. Woo, B. Donzelli, F. Scala. 1996. Synergistic antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. *In* R.A.A. Muzzarelli, ed. **Chitin Enzimology**. Edizioni Atec, Grottammare, Italy.
- Lynch, J.M. 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. **Biotech. Advances** 8: 335-346.

- Madhavan, K.N., T.V. Baiju, C. Sandhya, A. Sabu, G. Szakacs and A. Pandey. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochem.** 39: 1583-1590.
- Mahadevan, B. and D.L. Crawford. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108. **Enz. Microb. Tech.** 20: 489-493.
- Marja, L.L. 2000. **How mycostop acts in the control of fungal plant disease.** Biocontrol Info letter. Available source: <http://www.yankeegrower.uconn.edu/2002.doc.pdf>, July 27, 2006.
- Marten, P., S. Bruckner, A. Minkwitz, P. Luth and G. Bergm. 2001. RhizovitR: Impact and formulation of a new bacterial product, pp. 78–82. *In* E. Koch and P. Leinonen, eds. **Proceedings of Microbial inoculants for agriculture and environment.** Braunschweig, Germany.
- McGinnis, M.R. and M.G. Rinaldi. 1996. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing and assays of activity in biologic fluids, pp. 176-184. *In* V. Lorian, eds. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Medez, C., A.F. Brana, M.B. Mamzanal and C. Hardisson. 1985. Role of Substrate Mycelium in Colony Development in *Streptomyces*. **Can. J. Microbiol.** 31: 446-450.
- Metting, F.B. 1992. **Soil Microbiology Ecology.** M. Dekker. Inc., New York.
- Mohammadi, O. and M.L. Lahdenpera. 1992. Mycostop biofungicide in practice. pp. 289–295. *In* H. Lyr and G. Polter, eds. **Modern Fungicides and Antifungal Compounds.** German

- Moiseev, S.R. and A. Carroad. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. **Biotech. Bioen.** 23: 1067-1078.
- Monreal, J. and E.T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Can. J. Microbiol.** 15: 669–689.
- Nawani N.N. and B.P. Kapadnis. 2005. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. **Process Biochem.** 40: 651–660.
- Nelson, N. 1944. A Photometrigue adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Onaka, H., T. Nakagawa and S. Horinouchi. 1998. Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. **Mol Microbiol.** 28: 743-753.
- Palomino, J.C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings and F. Portaels. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 2720–2722.
- Park, J.O., E. Tarabily, E.L. Ghisalberti and K. Sivasithamparam. 2002. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **L. Appl. Microbiol.** 35: 361 – 365.
- Robbins, P.W., C. Albright and B. Benfield. 1988. Clonig and expreesion of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 263: 443-447.
- Robert, D.P. and R.D. Lumsden. 1990. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelia growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathol.** 80: 461-465.

- Ruan J.S. 1994. Rapid isolation and identification of actinomycetes. *In* Southeast Asia **Regional Training Workshop on Rapid Method Microbiology and Biotechnology**, 19-28 October 1994. Bangkok.
- Sabaratnam, S. and J.A. Traquair. 1996. Biological control of *Rhizoctonia* problems in tomato plug transplants. **Phytopathol.** 86: 37.
- _____. 2002. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. **Biological Control.** 23: 245-253.
- Sadfi, N., M. Cherif, I. Fliss, A. Boudabbous and H. Antoun. 2001. Evaluation of *Bacillus* isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. **J. Plant Pathol.** 83: 101–118.
- Samac, D.A., A.M. Willert, M.J. McBride and L.L. Kinkel. 2003. **Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa.** Appl. Soil Ecol. **22**: 55-66.
- Shaikh, S.A. and M.V. Deshpande. 1993. Chitinolytic Enzymes: Their contribution to basic and applied research. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 468-475.
- Shih, H.D., Y.C. Liu, F.L. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J.W. Huang. 2003. Fungichromin: A Substance from *Streptomyces padanus* with Inhibitory Effects on *Rhizoctonia solani*. **J. Agric. Food Chem.** 5: 95.
- Sid A.A., M. Ezziyyani, C. Pérez Sánchez and M.E. Candela. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **Euro. J. Plant Pathol.** 109: 633-637.

- Sinnott M.L. 1990. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. **Chem Rev.** 90: 1171-1202.
- Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N.L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria ciassis* nov. **Inter. J. System. Bacteriol.** 47: 479-491.
- Stamford, T.L.M. 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of Yam bean. **Bioresource Technology.** 76: 137-141.
- Sylvia, D.M. 1998. **Principles and Applications of Soil Microbiology.** 7th ed. Prentic Hall, New Jersey.
- Taechowisan, T., J.F. Peberdy and S. Lumyong. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World J. Microbiol. Biol.** 19: 381–385.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey and M.J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2161–2171.
- Trejo-Estrada, S.R., A. Paszczynski and D.L. Crawford. 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biological control agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **J. Ind. Microbiol. Technol.** 21: 81-90.
- Ulhoa, C.J. and J.F. Peberdy. 1992. Purification and some properties of extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enz. Microb. Tech.** 14: 236-240.

- Vyas, P.R. and M.V. Deshpande. 1989. Chitinase production by *Myrotheciumveerucaria* and its significance for fungal mycelial degradation. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 35: 343-350.
- Wang, S. and W. Chang. 1997. Purification and characterzation of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 380-386.
- Wannissorn, B., P. Suyananda, P. Somchai, O. Shida and K. Komageta. 1996. **Antifungal activity of *Bacillus***. Thailand Institute of Science and Technology Research.
- Whipps, J.M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogensand antagonistic fungi. **New Phytologist** 107: 127-142.
- William R.H. 1989. **Bergey' Manual of Systematic Bacteriology**. 4th ed. U.S.A. Baltimore. Williams&Wilkins.
- Witt, U., T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.D. Dekwer and R. J. Muller. 2001. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. **Chemosphere** 44: 289-299.
- Wong, V.G. 2006. **Methods for Reducing or Preventing Transplant Rejection in the Eye and Intraocular Implants for Use Therefor**. U.S. Patent 7, 033, 605.
- Xiao, K., L.L. Kinkel and D.A. Samac. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biol. Control.** 23: 285-295.

- Yuan, W.M. and D.L. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Appl. Environ. Microb.** 61: 3119-3128.
- Zhang, Z. and G.Y. Yuen. 2000. The Role of Chitinase Production by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3 in Biological Control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathol.** 90: 384-389.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Yeast extract-malt extract agar (ISP-2)

Yeast extract	4 g.
Malt extract	10 g.
Glucose	4 g.
Agar	15 g.
Distilled water	1,000 ml.
pH	7.0

2. สูตรอาหาร Chitin medium

Swollen chitin	30 g
Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	1 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml

การเตรียม swollen chitin ชั่ง chitin (sigma) 10 กรัม เติมกรด H_3PO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่แช่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำในปริมาณมากๆ จนมี pH ประมาณ 5 ปรับ pH ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ pH 7 ปล่อยให้ตกตะกอนเทส่วนใสด้านบนทิ้งเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. สูตรอาหาร Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นจนเดือดและเอามันฝรั่งนี้มากรองเอาแต่ส่วนน้ำต้มมันฝรั่ง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมวุ้นผง คนให้ละลายหมดจึงเติม dextrose คนให้ละลายอีกครั้ง บรรจุภาชนะแก้ว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทอาหารลงในจานเพาะเลี้ยง

4. สูตรอาหาร Glucose-meat extract-peptone (GMP)

Glucose	15 g.
Yeast extract	3 g.
Meat extract	3 g.
Peptone	6 g.
NaCL	5 g.
MgSO ₄ ·2H ₂	0.25 g.
Agar	15 g.
Distilled water	1,000 ml.

pH 7.0

5. สูตรอาหาร 0.02 % yeast extract

Yeast extract	0.2 g
Nystatin	50 mg
Distilled water	1,000 ml.

นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส ใส่ Nystatin ก่อนเทอาหารลงในจานเพาะเลี้ยง

วิธีการเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

Resazurin sodium salt powder	0.02 g.
Distilled water	100 ml.

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ตารางผนวกที่ ข1 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น
chitin medium เป็นเวลา 10 วัน

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
	โคโลนี	บริเวณใส	
	(CS)	(CZ)	
SA1	15.50	17.00	1.10
SA2	9.30	10.00	1.07
SA3	8.60	9.50	1.10
SA5	5.00	7.20	1.44
SA6	18.90	23.00	1.22
SB1	17.20	19.40	1.13
SB3	13.40	14.30	1.07
SB4	10.60	16.00	1.51
SB5	13.70	16.00	1.17
SB11	17.00	17.90	1.05
SB12	10.00	12.70	1.27
SC3	11.00	16.30	1.48
SD4	5.50	7.10	1.29
SD6	14.20	16.10	1.13
SD8	13.50	15.50	1.15
SE2	6.40	7.30	1.14
SE3	6.20	7.60	1.22
SE5	8.00	8.60	1.07
SE7	11.80	16.50	1.40
SF6	8.00	9.00	1.12
SF7	8.20	8.70	1.06
SF8	7.80	8.70	1.12
SG2	7.20	10.00	1.40

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน
	โคโลนี	บริเวณใส	
	(CS)	(CZ)	
SG4	7.80	9.50	1.22
SG5	12.60	20.30	1.61
SH1	8.00	9.80	1.25
SH3	9.00	13.60	1.51
SJ7	8.50	9.00	1.06
SJ9	12.50	18.50	1.48
DMKU 168	4.60	10.50	2.28
DMKU 170	11.50	13.60	1.13
DMKU 178	7.70	9.50	1.23
DMKU 179	6.50	10.00	1.54
DMKU 182	4.00	6.50	1.63
DMKU 189	6.80	8.90	1.30
DMKU 190	10.70	13.50	1.26
DMKU 194	7.50	9.20	1.22
DMKU 195	10.00	13.00	1.30
DMKU 196	6.70	8.50	1.27
DMKU 198	3.00	6.50	2.17
DMKU 205	5.70	10.50	1.84
DMKU 207	7.00	8.50	1.21
DMKU 208	7.60	9.00	1.18
DMKU 213	6.50	8.80	1.35
DMKU 214	8.50	10.50	1.24
DMKU 218	13.00	17.00	1.31
DMKU 219	5.00	10.00	2.00

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน
	โคโลนี	บริเวณใส	
	(CS)	(CZ)	
DMKU 238	7.20	8.00	1.11
DMKU 241	4.20	6.80	1.62
DMKU 243	10.20	11.00	1.08
DMKU 245	5.20	9.00	1.73
DMKU 248	10.50	11.00	1.05
DMKU 257	5.50	9.30	1.69
DMKU 258	10.70	12.50	1.17
DMKU 259	7.70	15.00	1.95
DMKU 260	5.50	6.00	1.09
DMKU 261	9.50	12.00	1.26
DMKU 262	6.60	11.00	1.67
DMKU 268	5.50	7.00	1.27
DMKU 269	10.70	12.50	1.17
DMKU 280	6.50	11.80	1.82
DMKU 282	8.30	2.80	2.75
DMKU 283	9.00	10.30	1.14

หมายเหตุ CS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

CZ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส

ตารางผนวกที่ ข2 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท SA6 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SA6	0	SA6	12.00	15.00	1.20
	0.40	SA6I-1	4.00	7.00	1.70
		SA6I-2	5.00	7.00	1.40
		SA6I-3	5.00	7.00	1.40
		SA6I-4	5.00	7.00	1.40
		SA6I-5	5.00	8.00	1.60
		SA6I-6	5.00	7.00	1.40
	1.00	SA6I-7	7.00	9.00	1.30
		SA6I-8	7.00	9.00	1.30
		SA6I-9	8.00	9.00	1.10
		SA6I-10	8.00	10.00	1.20
		SA6I-11	8.00	11.00	1.40
	1.20	SA6I-12	5.00	7.00	1.40
		SA6I-13	5.00	7.00	1.40
		SA6I-14	5.00	7.00	1.40
		SA6I-15	5.00	6.00	1.20
		SA6I-16	3.50	5.50	1.60
	2.00	SA6I-17	5.00	7.00	1.40
		SA6I-18	6.00	8.00	1.30
		SA6I-19	7.00	8.00	1.10
		SA6I-20	7.00	9.00	1.30
		SA6I-21	11.00	14.00	1.30
		SA6I-22	10.00	13.00	1.30

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SA6	2.00	SA6I-23	5.00	8.00	1.60
		SA6I-24	7.00	13.00	1.90
		SA6I-25	7.00	10.00	1.40
		SA6I-26	8.00	12.00	1.50
		SA6I-27	8.00	12.00	1.50
		SA6I-28	7.00	12.00	1.70
		SA6I-29	7.00	11.00	1.60
		SA6I-30	9.00	11.00	1.20
		SA6I-31	6.00	9.00	1.50
		SA6I-32	6.00	8.00	1.30
		SA6I-33	7.00	10.00	1.50
		SA6I-34	6.00	10.00	1.70
		SA6I-35	7.00	14.00	2.00
	3.00	SA6I-36	7.00	9.00	1.30
		SA6I-37	6.00	7.00	1.20
		SA6I-38	6.00	7.00	1.20
		SA6I-39	9.00	12.00	1.30
		SA6I-40	5.00	7.00	1.40
		SA6I-41	12.00	17.00	1.40
		SA6I-42	12.00	15.00	1.30
		SA6I-43	8.00	12.00	1.50
		SA6I-44	10.00	15.00	1.50
		SA6I-45	4.00	7.00	1.70
		SA6I-46	4.00	6.00	1.50

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SA6	4.00	SA6I-47	10.00	13.00	1.30
		SA6I-48	9.00	13.00	1.40
		SA6I-49	15.00	20.00	1.30
		SA6I-50	16.00	20.00	1.20
		SA6I-51	15.00	16.00	1.10

หมายเหตุ CS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

CZ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส

ตารางผนวกที่ ข3 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ SG4 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี	บริเวณใส	
			(CS)	(CZ)	
SG4	0	SG4	7.00	8.00	1.10
	0.40	SG4I-1	5.00	9.00	1.80
		SG4I-2	4.00	5.00	1.20
		SG4I-3	4.00	5.00	1.20
		SG4I-4	5.00	7.00	1.40
	0.80	SG4I-5	5.00	6.00	1.20
		SG4I-6	5.00	6.00	1.20
		SG4I-7	2.00	4.00	2.00
		SG4I-8	3.00	4.00	1.30
	1.20	SG4I-9	3.00	5.00	1.70
		SG4I-10	3.00	4.00	1.30
		SG4I-11	4.00	5.00	1.20
		SG4I-12	3.00	5.00	1.70
		SG4I-13	4.00	7.00	1.70
		SG4I-14	4.00	7.00	1.70
		SG4I-15	4.00	7.00	1.70
		SG4I-16	2.50	7.00	1.60
		SG4I-17	3.00	4.50	1.50
		SG4I-18	3.00	3.50	1.10
		SG4I-19	2.50	3.50	1.40
		SG4I-20	3.00	5.00	1.70
		SG4I-21	2.00	3.00	1.50
		SG4I-22	3.00	6.00	2.00
		SG4I-23	2.00	3.50	1.70

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SG4	1.20	SG4I-24	2.00	3.00	1.50
		SG4I-25	3.00	4.00	1.30
		SG4I-26	3.00	3.50	1.10
		SG4I-27	2.00	3.00	1.50
		SG4I-28	2.00	3.00	1.50
		SG4I-29	2.00	3.50	1.70
		SG4I-30	4.00	6.00	1.50
		SG4I-31	5.00	7.00	1.40
		SG4I-32	5.00	7.00	1.40
		SG4I-33	4.00	7.00	1.70
		SG4I-34	5.00	9.00	1.80
		SG4I-35	4.00	6.00	1.50
		SG4I-36	4.00	5.00	1.20
		SG4I-37	3.00	4.00	1.30
		SG4I-38	5.00	7.00	1.40
		SG4I-39	5.00	7.00	1.40

หมายเหตุ CS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

CZ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส

ตารางผนวกที่ ข4 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีท SJ9 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในการย่อย swollen chitin บนอาหารวุ้น chitin medium เป็นเวลา 10 วัน

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SJ9	0	SJ9	7.00	9.00	1.28
	0.40	SJ9I-1	5.10	7.20	1.41
		SJ9I-2	8.00	10.00	1.25
		SJ9I-3	8.00	11.00	1.37
		SJ9I-4	10.00	12.00	1.20
	0.80	SJ9I-5	6.00	6.40	1.06
		SJ9I-6	6.50	7.50	1.15
		SJ9I-7	11.00	12.00	1.09
		SJ9I-8	10.00	12.00	1.20
	1.00	SJ9I-20	7.00	9.00	1.28
		SJ9I-21	7.00	11.00	1.57
	1.20	SJ9I-9	7.50	10.50	1.40
		SJ9I-10	8.00	10.00	1.25
		SJ9I-11	8.00	12.00	1.50
		SJ9I-12	10.00	12.00	1.20
	1.60	SJ9I-13	5.50	7.50	1.36
		SJ9I-14	7.00	10.00	1.43
		SJ9I-15	7.00	9.00	1.28
		SJ9I-16	7.50	9.00	1.20
		SJ9I-17	6.00	8.00	1.33
		SJ9I-18	6.50	8.00	1.23
		SJ9I-19	6.00	8.00	1.33

ตารางผนวกที่ ข4 (ต่อ)

รหัส	ความเข้มรังสี (kGy)	รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)		อัตราส่วน CZ/CS
			โคโลนี (CS)	บริเวณใส (CZ)	
SJ9	3.00	SJ9I-22	6.00	8.00	1.33
		SJ9I-23	7.00	9.00	1.28
		SJ9I-24	7.00	9.00	1.28
		SJ9I-25	7.00	9.00	1.28
	4.00	SJ9I-26	6.00	8.00	1.33
		SJ9I-27	7.00	10.00	1.43
		SJ9I-28	6.00	8.00	1.33
		SJ9I-29	6.00	9.00	1.50

หมายเหตุ CS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

CZ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส

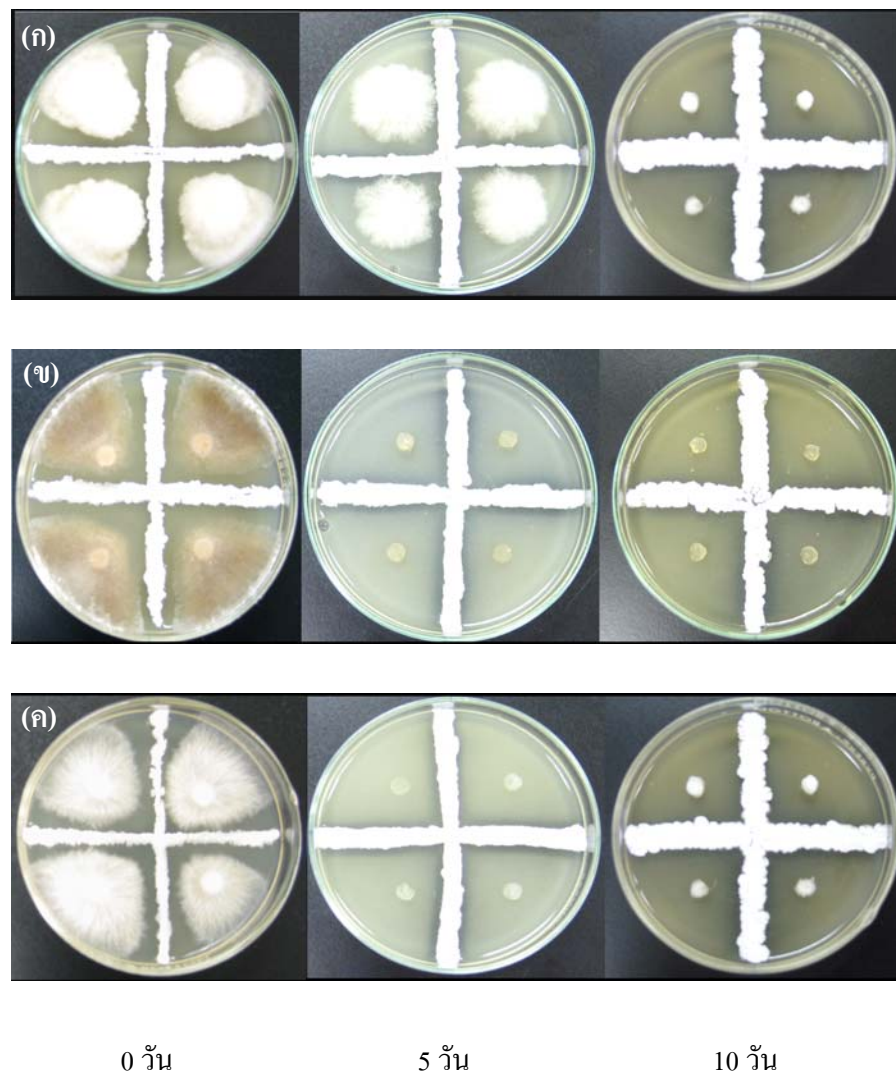
ภาคผนวก ค
ภาพประกอบการทดลอง

1. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน



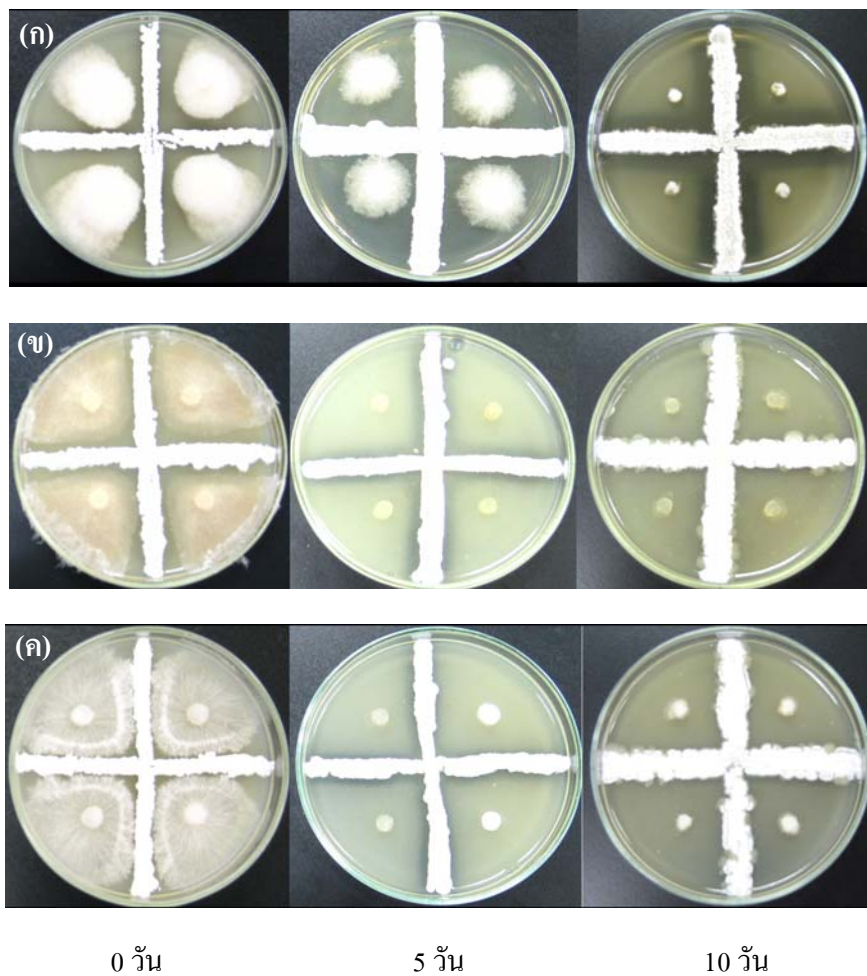
ภาพผนวกที่ ค1 ลักษณะบริเวณไฮรอลิโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารวุ้น
chitin medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช



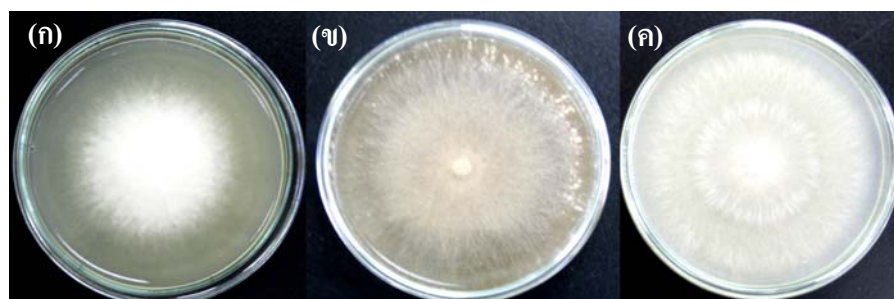
ภาพผนวกที่ ค2 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา

F. sporotrichiodes (ก), *R. solani* (ข) และ *S. rolfsii* (ค) บนอาหาร chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน

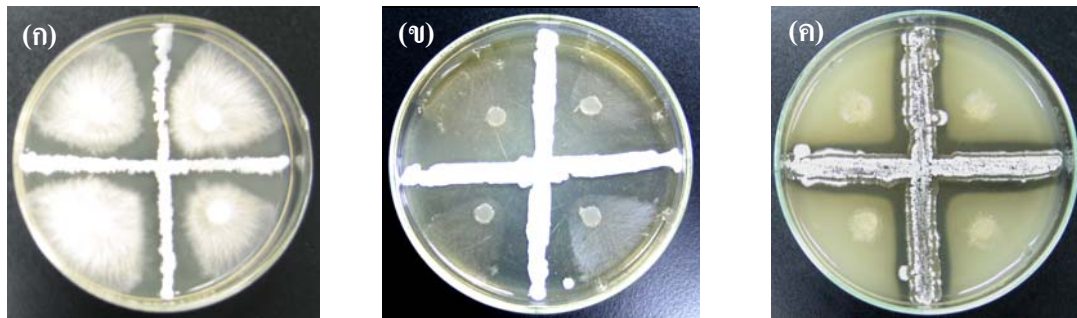


ภาพผนวกที่ ค3 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท SG5 ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา

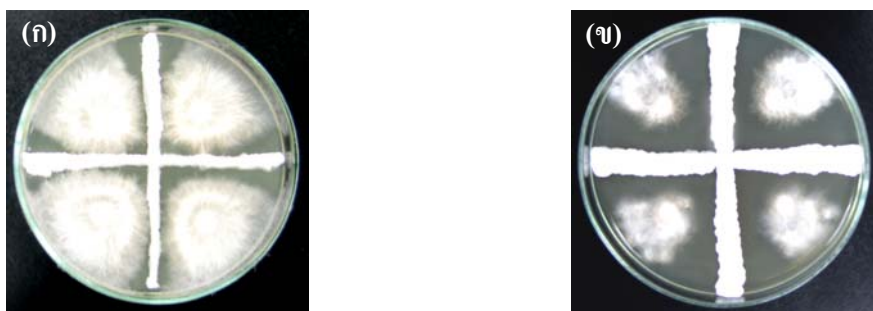
F. sporotrichiodes (ก), *R. solani* (ข) และ *S. rolfsii* (ค) บนอาหาร chitin medium เมื่อเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทพร้อมกับเชื้อราโรคพืช และเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทก่อนเพาะเชื้อราโรคพืชเป็นเวลา 5 และ 10 วัน



ภาพผนวกที่ ค4 ลักษณะเชื้อรา *F. sporotrichiodes* (ก), *R. solani* (ข) และ *S. rolfsii* (ค) ที่เจริญบนอาหาร chitin medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

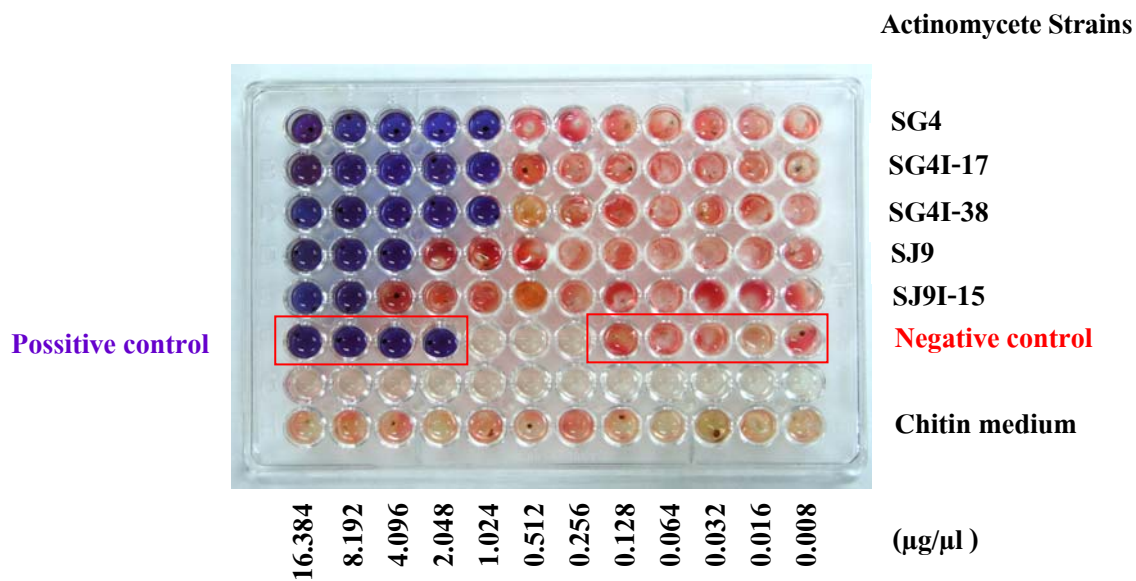


ภาพผนวกที่ ค5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์แม่ รหัส SG4 (ก), สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SG4I-17 (ข) และรหัส SG4I-38 (ค) ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหาร chitin medium



ภาพผนวกที่ ค6 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์แม่ รหัส SJ9 (ก) และ สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี รหัส SJ9I-15 (ข) ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหาร chitin medium

3. การตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากอาหารเหลือ chitin medium ที่เพาะเชื้อแอคติโนมัยสีตต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*



ภาพผนวกที่ ค7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา *S.rolfsii* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีต ทั้ง 5 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลือ chitin medium

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในเรือนปลูกพืชทดลอง



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

(ฉ)

ภาพผนวกที่ ๘ ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัสต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก

ก. ควบคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส SG4

ข. ควบคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส SG4I-17

ค. ควบคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส SG4I-38

ง. ควบคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส SJ9

จ. ควบคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส SJ9I-15

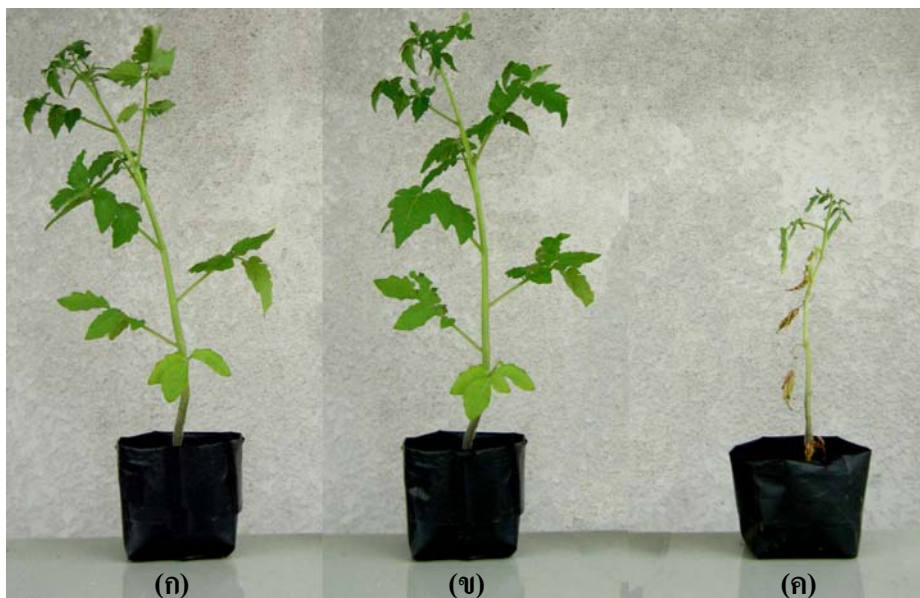
ฉ. กรรมวิธีควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfii* (control 2)



(ก) (ข) (ค) (ง) (จ) (ฉ) (ช) (ฮ)

ภาพผนวกที่ ๑๑ ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทผสมร่วมกับสารละลาย swollen chitin ต่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. rolfii* ในระดับกระถางปลูก

- ก. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ร่วมกับ SG4I-38
- ข. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ร่วมกับ SJ9
- ค. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4 ร่วมกับ SJ9I-15
- ง. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4I-38 ร่วมกับ SJ9
- จ. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SG4I-38 ร่วมกับ SJ9I-15
- ฉ. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท SJ9 ร่วมกับ SJ9I-15
- ช. ความคุมการเกิดโรคด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีทร่วมกันทุกไอโซเลท
- ฮ. กรรมวิธีควบคุมที่ใช้เฉพาะเชื้อ *S. rolfii* (control 2)



ภาพผนวกที่ ค10 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส SG4I-38 ร่วมกับสารละลาย swollen chitin (ก) และการใช้เชื้อ SG4I-38 เพียงอย่างเดียว (ข) ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. rolfsii* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่เพาะเชื้อโรคพืชเพียงอย่างเดียว (ค)

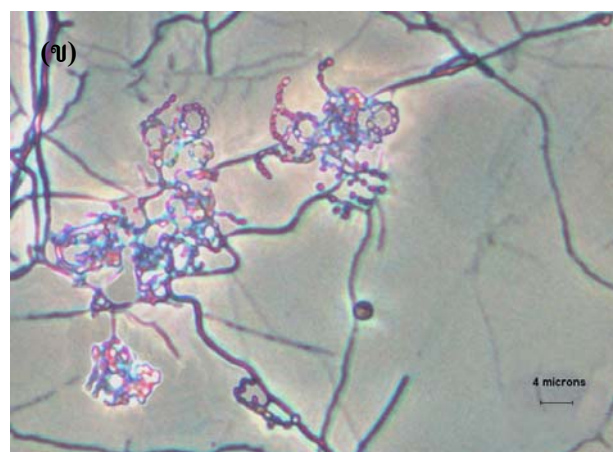


ภาพผนวกที่ ค11 อาการโรครากและโคนเน่าของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii*

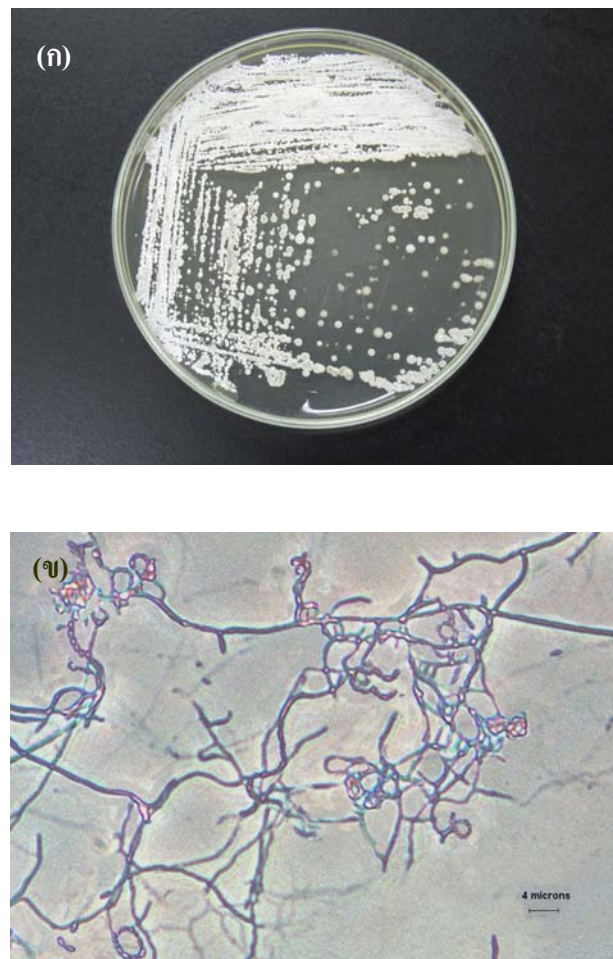


ภาพผนวกที่ ค12 สภาพแปลงปลูกพืชทดลอง

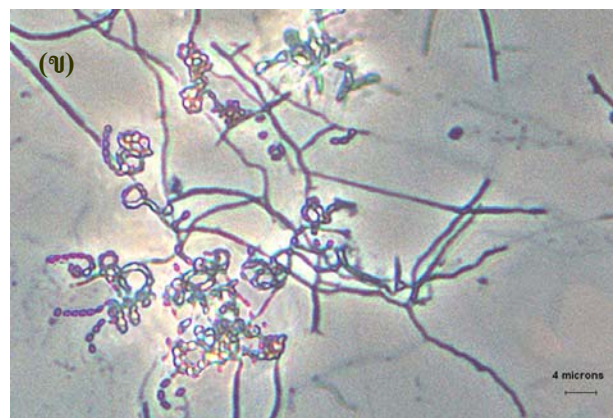
5. ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีท



ภาพผนวกที่ ค13 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)



ภาพผนวกที่ 14 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4I-17 บนจานเพาะเลี้ยง(ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)



ภาพผนวกที่ ค15 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SG4I-38 บนจานเพาะเลี้ยง(ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)



ภาพผนวกที่ ค16 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SJ9 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)



ภาพผนวกที่ ค17 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทรหัส SJ9I-15 บนจานเพาะเลี้ยง (ก) และได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวประภัสสร รักถาวร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 มกราคม 2520
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่วิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีสมุนไพร และความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-
ทุนสนับสนุนงานวิจัย	สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ
งานวิจัยที่ตีพิมพ์	Rugthaworn, P., U. Dilokkunanant, S. Sangchote, N.Piadang and V. Kitpreechavanich. 2007. A search and Improvement of Actinomycete Strains for Biological Control of Plant Pathogen. Kasesart J. (Nat Sci) . 41: 248-254.