



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากกระถินณรงค์
(*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล

Characterization and Monitoring of Endophytic Actinomycetes Isolated from Wattle tree
(*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) Using Molecular Techniques

نامผู้วิจัย นายชาคริต บุญอยู่

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อริณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากกระถินณรงค์
(*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล

Characterization and Monitoring of Endophytic Actinomycetes Isolated from Wattle tree
(*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) Using Molecular Techniques

โดย

นายชาคริต บุญอยู่

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์ศาสตร์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชาคริต บุญอยู่ 2553: การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ที่คัดแยกจาก
กระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อริณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D. 90 หน้า

คัดแยกแอกติโนมัยซีทได้ทั้งสิ้น 11 สายพันธุ์ จากรากกระถินณรงค์ที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและจังหวัด
นครปฐม เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*, *Actinoallomurus*,
Amycolatopsis, *Kribbella* and *Microbispora* เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า มี
แอกติโนมัยซีทจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ GMKU 932 สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ส่วน GMKU 937 และ
GMKU 938 สามารถยับยั้ง *Aspergillus niger* สายพันธุ์ GMKU 940 สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *Staphylococcus*
aureus, *Escherichia coli*, *Fusarium proliferatum*, *F. moniliforme* และ *A. niger* และสายพันธุ์ GMKU 944
สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus*, *Ralstonia solanacearum* และ *A. niger* เมื่อถ่ายยีน *egfp* สู่ *Streptomyces* sp.
GMKU 937 และ GMKU 944 ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลบนอาหาร MS ที่เติม $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้
เส้นใยอายุ 24 ชั่วโมง เป็นผู้รับ พบว่า สามารถส่งถ่ายยีน *egfp* และแสดงออกใน *Streptomyces* sp. GMKU 944
แต่ไม่ประสบความสำเร็จในสายพันธุ์ GMKU 937 เมื่อตรวจสอบความสามารถในการอยู่อาศัยในพืชโดยการปลูก
Streptomyces sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* เพียงชนิดเดียว และปลูกร่วมกับ *Rhizobium* sp. ผู้ต้นอ่อน
กระถินณรงค์ พบว่าเอนโคไฟต์ทั้งสองสายพันธุ์ ไม่มีผลต่อการสร้างปมราก เมื่อนำรากกระถินณรงค์มาแยกเชื้อ
สามารถแยก *Streptomyces* sp. GMKU 937 กลับมาได้ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ GMKU 937 น่าจะเป็น
เอนโคไฟต์ที่แท้จริง ส่วน *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ไม่สามารถแยกกลับออกมาได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อ
นำเนื้อเยื่อรากกระถินณรงค์ไปติดตามจากการเรืองแสง EGFP ของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ด้วย
กล้อง confocal laser scanning microscope พบว่า สามารถติดตามสายพันธุ์ GMKU 944/*egfp* ได้ โดยพบการอิง
อาศัยบริเวณท่ออาหารเป็นส่วนใหญ่ และพบบางส่วนบริเวณท่อน้ำ เมื่อตรวจสอบบริเวณผิวรากและปมรากโดย
ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า มีเส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* เจริญ
จำนวนมากแนบชิดกับผิวราก ภายในราก และปมราก แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* มี
ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกระถินณรงค์และเป็นเอนโคไฟต์ที่แท้จริง

Chakrit Bunyoo 2010: Characterization and Monitoring of Endophytic Actinomycetes Isolated from Wattle tree (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) Using Molecular Techniques.

Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Arinthip Thamchaipenet, Ph.D. 90 pages.

Eleven strains of endophytic actinomycetes were isolated from healthy roots of wattle tree (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) collected from Bangkok and Nakhonprathom provinces, Thailand. Analysis of 16S rRNA gene sequences of those strains revealed that they belong to members of the genera *Streptomyces*, *Actinoallomurus*, *Amycolatopsis*, *Kribbella* and *Microbispora*. Five strains showed antimicrobial activities against test microorganisms. Strain GMKU 932 showed activity against *Bacillus cereus* while strains GMKU 937 and GMKU 938 were active against *Aspergillus niger*. Strain GMKU 940 showed activity against *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Fusarium proliferatum*, *F. moniliforme* and *A. niger*. Strain GMKU 944 was active against *B. cereus*, *S. aureus*, *Ralstonia solanacearum* and *A. niger*. The *egfp* gene was introduced into *Streptomyces* sp. GMKU 944 and GMKU 937 by intergeneric conjugation and was successfully transferred and expressed in *Streptomyces* sp. GMKU 944 only. The residing property of both endophytes in the roots of wattle tree was verified by inoculation of *Streptomyces* sp. GMKU 937 or GMKU 944/*egfp* alone, and the mixture with *Rhizobium* sp. to germinated seeds of wattle tree. The results showed that both strains revealed no effect to nodulation. *Streptomyces* sp. GMKU 937 could be re-isolated from the seedlings, but it was unsuccessful with strain GMKU 944/*egfp*. However, *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* could be visualized through EGFP expression by confocal laser scanning microscope and found mainly colonizing at phloem and some at xylem parenchyma cells. SEM micrographs indicated mycelia of *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* covering root and nodule surfaces. These results suggested that *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* was closely associated with wattle tree and is a true endophyte.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ผศ.ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ อย่างเต็มที่ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งสละเวลาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กรรณิการ์ ดวงมาลย์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีในการวิจัยและให้คำแนะนำตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล ประธานกรรมการการสอบ และอาจารย์ ดร.ชญญา พุทธิจันทร์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกที่ให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา นันทกิจ และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์ไรโซเบียม และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ Prof. Dr. Mark Buttner, Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, UK. ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ผลาสมิดในการวิจัย

ขอบคุณสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 4503 ภาควิชาพันธุศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณนิรินทร์ยา สุดตาชาติ คุณอภันตรี ธนิตไชยสง คุณสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ คุณจันทรา อินทนนท์ และเพื่อนๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกคน

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่สนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และโอกาสทางการศึกษาของผู้วิจัย ตลอดจนให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุน ในโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (MRG-WII505S027) ร่วมกับคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชาคริต บุญอยู่
พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	83
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	18
2	พลาสติกที่ใช้ในงานวิจัย	19
3	ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง <i>E. coli</i>	27
3	สายพันธุ์แอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากกระถินณรงค์	39
4	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA จาก แอกติโนมัยสีทเอนโคไฟต์ 11 สายพันธุ์ กับลำดับเบสในฐานข้อมูลด้วย โปรแกรม EzTaxon	42
5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ต่างๆ	46
6	ประสิทธิภาพการคอนจูกันต่างสกุลระหว่าง <i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002/pIJ10257) และเส้นใยของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 944 ที่อายุ และอาหารต่างๆ	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การจัดกลุ่มของแอสคิโนแบคทีเรียโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	7
2	ความสัมพันธ์แอสคิโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	8
3	แผนที่ของพลาสมิด pIJ8655	30
4	แผนที่ของพลาสมิด pIJ10257	32
5	แอสคิโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากรากกระถินณรงค์	38
6	การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของสายพันธุ์ทั้ง 11 สายพันธุ์	43
7	การทดสอบความสามารถของแอสคิโนแบคทีเรียในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ	50
8	การตรวจสอบขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	52
9	การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	52
10	การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	53
11	การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์ โดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 10257seqF และ 10257seqR	56
12	การตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ในเอกซ์คอนจูแกนต์	57
13	บริเวณรากของกระถินณรงค์หลังจากการบ่มพืชในห้องเพาะบ่มต้นกล้าเป็นเวลา 8 สัปดาห์	59
14	การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากรากกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ	60
15	การตรวจสอบรากพืชที่ตัดตามขวางภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope	62
16	การตรวจสอบบริเวณผิวรากกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 944/ <i>egfp</i> โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	65
17	การตรวจสอบบริเวณผิวรากกระถินณรงค์ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อใดๆ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	66
18	การตรวจสอบบริเวณปมและผิวรากกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 944/ <i>egfp</i> ร่วมกับไรโซเบียม โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	67

การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากกระถินณรงค์
(*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล

Characterization and Monitoring of Endophytic Actinomycetes Isolated from
Wattle tree (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.)
Using Molecular Techniques

คำนำ

กระถินณรงค์เป็นไม้ยืนต้นที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นไม้โตเร็วที่สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง อุตสาหกรรมกระดาษ และสร้างที่อยู่อาศัยได้ (ทองพูล, 2545) กระถินณรงค์เป็นพืชอยู่ในวงศ์เดียวกับพืชตระกูลถั่วจึงพบว่ามีจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ในสกุล *Bradyrhizobium* ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ และพบว่ามีราเอนโดไฟต์ ทั้งกลุ่ม ectomycorrhiza และ endomycorrhiza ซึ่งมีบทบาทช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระถินณรงค์ และช่วยให้พืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและเชื้อก่อโรคต่างๆ (Duponnois and Plenchette, 2003; Diuof *et al.*, 2005) การปลูกกระถินณรงค์ในพื้นที่ที่เป็นดินเลวช่วยให้ดินมีคุณภาพดีขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม แอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในกระถินณรงค์ยังมีผู้รายงานน้อย แอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์หลายชนิดมีประโยชน์ต่อพืชในการต่อต้านแมลงศัตรูพืช และวัชพืช นอกจากนี้ยังสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นทั้งสารปฏิชีวนะต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ สัตว์และพืช สารต่อต้านมะเร็ง สารกดภูมิคุ้มกัน และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาวิธีการแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ในกลุ่มแอกติโนมัยสิทออกจากรากของกระถินณรงค์ และศึกษาชนิดของเอนโดไฟต์โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากนั้นจึงตรวจสอบความสามารถของแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียและราที่ก่อโรคพืช และปลูกเชื้อแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ที่ได้รับการถ่ายยีน enhanced green fluorescent protein (*egfp*) กลับเข้าสู่พืช จากนั้นจึงติดตามการเข้าอยู่อาศัยของเอนโดไฟต์ภายในเนื้อเยื่อจากการเรืองแสงของ enhanced green fluorescent protein

วัตถุประสงค์

1. คัดแยกและจำแนกแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากกระถินณรงค์โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
2. ศึกษาความสามารถของแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช
3. ถ่ายยีน *egfp* เข้าสู่แอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์โดยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation) และติดตามการเข้าอยู่อาศัยโดยการปลูกเชื้อกลับสู่กระถินณรงค์แล้วตรวจสอบจากการเรืองแสงของ enhanced green fluorescent protein (EGFP)

การตรวจเอกสาร

แอกติโนมัยสีท

1. ลักษณะของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ใน Class Actinobacteria Subclass Actinobacteridae และ Order Actinomycetales (Stackebrandt and Rainey, 1997) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย มีการสร้างเส้นใย เรียกว่า ไฮฟา (hypha) เมื่อแอกติโนมัยสีทเจริญบนอาหารแข็งจะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium หรือ vegetative mycelium) แผงลงไปในอาหาร หลายสกุลจะสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ชูขึ้นเหนือผิวอาหาร และเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสปอร์เกิดขึ้น รูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยสีทมีลักษณะหลากหลาย อาจมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว (single spore) เช่น สกุล *Micromonospora* และ *Thermomonospora* สปอร์เรียงต่อกันเป็นสาย เช่น สกุล *Streptomyces* ซึ่งสายสปอร์สามารถเรียงต่อกันเป็นหลายรูปร่าง ไม่ว่าจะเป็นเส้นตรง (rectiflexible) เป็นรูปโค้ง (retinaculiaperti) รูปเกลียว (spira) หรือเป็นกิ่งก้าน (verticillati) ผิวของสปอร์ อาจมีลักษณะเรียบ (smooth) มีขน (hairy) เป็นหนาม (spiny) หรือขรุขระ (rugose) ก็ได้ นอกจากนี้แอกติโนมัยสีทบางกลุ่มยังสร้างสปอร์อยู่ในถุงหุ้ม (sporangia) เช่น สกุล *Actinoplanes* เป็นต้น (Vobis, 1997) อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยสีทบางสกุลก็ไม่สร้างสปอร์ เช่น แอกติโนมัยสีทในกลุ่มที่เรียกว่า Nocardioform ได้แก่ สกุล *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* และ *Intrasporangium* โดยเกิดการแตกหักของเส้นใยเป็นรูปกลม (cocoid) หรือแท่ง (rod) สปอร์ของแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่มักไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) แต่บางสกุล เช่น สกุล *Sporichthya* และ *Actinosynnema* สร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (planospore หรือ zoospore) เนื่องจากมีการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) ที่สปอร์ จึงทำให้สปอร์สามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้ สำหรับลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยสีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นจะพบว่า โคโลนีเกิดจากเส้นใยอาหารที่เจริญรวมกันแน่น โคโลนีอาจมีสีแตกต่างกัน ตามสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน เช่น สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล และดำ เป็นต้น ส่วนด้านล่างของโคโลนีจะมีสีตามสีของเส้นใยอาหาร ลักษณะโคโลนีอาจพบว่า มีลักษณะรูปร่างนูน แบน หรือคล้ายแผ่นหนัง (Vobis, 1997) ขนาดของโคโลนีมีความหลากหลายเช่นกันโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท อายุ อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง แอกติโนมัยสีทสามารถสร้างสารสีเมลานินและสารสีอื่น ออกมาละลายในอาหารเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังมีการผลิตสาร geosmin (trans-1,10-dimethyl decalol) ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายดิน (earth odor) (Williams *et al.*, 1989)

แอกติโนมัยสิทโดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แอกติโนมัยสิทบางชนิด เช่น สกุล *Frankia* ต้องการอาหารสภาวะพิเศษจึงจะสามารถเจริญได้ การกระจายของแอกติโนมัยสิทในธรรมชาติพบมากที่สุดที่ดิน และแหล่งน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสกุล *Streptomyces* ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.5-8.0 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้หลากหลาย เช่น กลูโคส เปปโตน และกลีเซอรอล เป็นต้น ส่วนมากสามารถทนเกลือได้ร้อยละ 3 ขึ้นไป แต่บางสายพันธุ์อาจทนเกลือได้ถึงร้อยละ 13 (Williams *et al.*, 1989)

แอกติโนมัยสิทมีความสำคัญต่อระบบนิเวศ โดยเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยอินทรีย์สาร ได้แก่ ซากพืชและซากสัตว์ที่ย่อยสลายยาก ซึ่งทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ (Alexander, 1997) นอกจากนี้แอกติโนมัยสิทโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่น ยาปฏิชีวนะซึ่งมีจำนวนมากถึงสองในสามของยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ทุกวันนี้ รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารก่อกวนระบบภูมิคุ้มกัน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาประยุกต์ใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น สารฆ่าแมลงและสารปราบวัชพืช เป็นต้น (Goodfellow *et al.*, 1988)

2. การจำแนกแอกติโนมัยสิทในระดับสกุล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสิทในระดับสกุลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นทำได้โดยเลี้ยงแอกติโนมัยสิทบนอาหารแข็งที่มีธาตุอาหารต่ำ เช่น water agar ที่เติมสารอาหารอื่นเพียงเล็กน้อย เช่น เกซีน yeast extract หรือแป้ง แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เลนส์วัตถุที่มีระยะการทำงานสูง (long-working distance objective lens) ซึ่งจะสามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสิทได้โดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกรณีที่ต้องการศึกษารายละเอียดมากขึ้น เช่น ลักษณะของสปอร์ ก็ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) ร่วมด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาเพื่อใช้จำแนกแอกติโนมัยสิทในระดับสกุล ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย การสร้างเส้นใยอากาศ รูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะการสร้างสปอร์แบบมีถุงหุ้ม นอกจากนี้การจำแนกแอกติโนมัยสิทบางสกุลอาจดูจากโครงสร้างพิเศษอื่นๆ เช่น สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (synnemata) และการสร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้มแบบเทียม (pseudosporangium) เป็นต้น (Williams *et al.*, 1989)

ลักษณะทางเคมีของเซลล์ (cell chemistry)

การจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยใช้ลักษณะทางเคมีของเซลล์เป็นวิธีที่สะดวกและมีความถูกต้องเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมีของเซลล์ที่ศึกษา ได้แก่ ชนิดของกรดอะมิโนที่พบที่ผนังเซลล์ และน้ำตาลที่พบในเซลล์ เป็นต้น การศึกษาดังกล่าวทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ว่าประกอบด้วย diaminopimelic acid (DAP) แบบ meso- หรือ LL- หรือประกอบด้วย DAP ทั้งสองชนิด และการวิเคราะห์น้ำตาลที่พบในเซลล์ว่าประกอบด้วยน้ำตาลชนิดใดบ้าง เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงสามารถจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลได้ (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

นอกจากจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือลักษณะทางเคมีของเซลล์ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลแล้ว การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ยังสามารถจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลจนถึงสปีชีส์ได้ เนื่องจากในช่วงระหว่างปี 1940 ถึง 1950 มีการค้นพบ *Streptomyces* ที่สามารถสร้างสารเมตาโบไลต์ชนิดใหม่มากมาย โดยมักเป็น *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ด้วย แต่เมื่อจำนวนสปีชีส์เพิ่มมากขึ้นจึงยากที่จะระบุว่าเป็น *Streptomyces* ชนิดดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ใหม่หรือไม่ เนื่องจากการจำแนกสปีชีส์แบบเดิมนั้นอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ทางเคมีดังที่ได้กล่าวมาแล้ว หรืออาศัยวิถีทางชีวเคมี เช่น วิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมทั้งความสามารถในการใช้สารเคมีต่าง โดยวิธีการเหล่านี้จะมีความผันแปรตามสภาพแวดล้อมในขณะนั้นได้ วิธีการทางชีวโมเลกุล เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสม เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อองค์ประกอบของดีเอ็นเอหรือโครโมโซม (Masakazu *et al.*, 1997)

ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ หรือ rRNA เป็นอาร์เอ็นเอมีความสำคัญในกระบวนการแปลรหัส เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม ไรโบโซมของสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตมีขนาด 70S ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อย ขนาด 50S ซึ่งมี rRNA ชนิด 23S และ 5S ขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และ 120 เบส ตามลำดับ รวมอยู่กับไรโบโซมอลโปรตีน และหน่วยย่อย 30S ซึ่งมี rRNA ชนิด 16S ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ในแบคทีเรียพบว่า ยีน rRNA มี 5-10 ชุด กระจายอยู่บน

โครโมโซม (Lewin, 2000) ยีน rRNA ใน *S. griseus* เรียงลำดับ 16S-23S-5S มีโครงสร้างทุติยภูมิที่เรียกว่า “stem and loop” ประมาณ 50 ชุด (Pernodet *et al.*, 1989) ที่บริเวณส่วนปลายสุดทางด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA มีลำดับเบส 6 เบส คือ 5'-CCUCCU-3' ทำหน้าที่จับกับบริเวณลำดับเบส Shine-Dalgarno ที่บริเวณปลาย 5' ของสาย mRNA ซึ่งอยู่ก่อนถึงตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น AUG ส่วนบริเวณ 3' major domain ทำหน้าที่จับกับแอนติโคดอนของ tRNA ทั้งด้าน A-site และ P-site นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ใช้จับกับ initiation factor 3 (IF3) อีกด้วย (Lewin, 2000)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ใน *Streptomyces* พบว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 158-278 ซึ่งมีความยาว 120 คู่เบส เป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันสูงถึง 20 % ในแต่ละสปีชีส์ (Stackebrandt *et al.*, 1991) เรียกบริเวณนี้ว่าบริเวณอัลฟา หรือบริเวณที่มีความผันแปรสูง (alpha region หรือ variable region) และภายในบริเวณอัลฟายังประกอบด้วยบริเวณแกมมา (gamma region) คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 172-202 ซึ่งจะพบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ระหว่างสปีชีส์ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างได้อีกระดับหนึ่งที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1102-1122 ซึ่งเรียกว่าบริเวณเบตา (beta region) ส่วนบริเวณอื่นๆ ในยีนนอกเหนือบริเวณดังกล่าว จะพบความแตกต่างอีกประมาณ 5 % มีรายงานแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างบริเวณอัลฟาของยีน 16S rRNA พบว่าสามารถจำแนก *Streptomyces* ในแต่ละสปีชีส์ได้ (Kataoka *et al.*, 1997)

เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทที่อยู่ใน class Actinobacteria order Actinomycetales จำนวน 30 order มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง phylogenetics พบว่าการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีท ให้ผลแตกต่างจากเดิมซึ่งวิเคราะห์จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเคมีของเซลล์ (Stackebrandt and Rainey, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

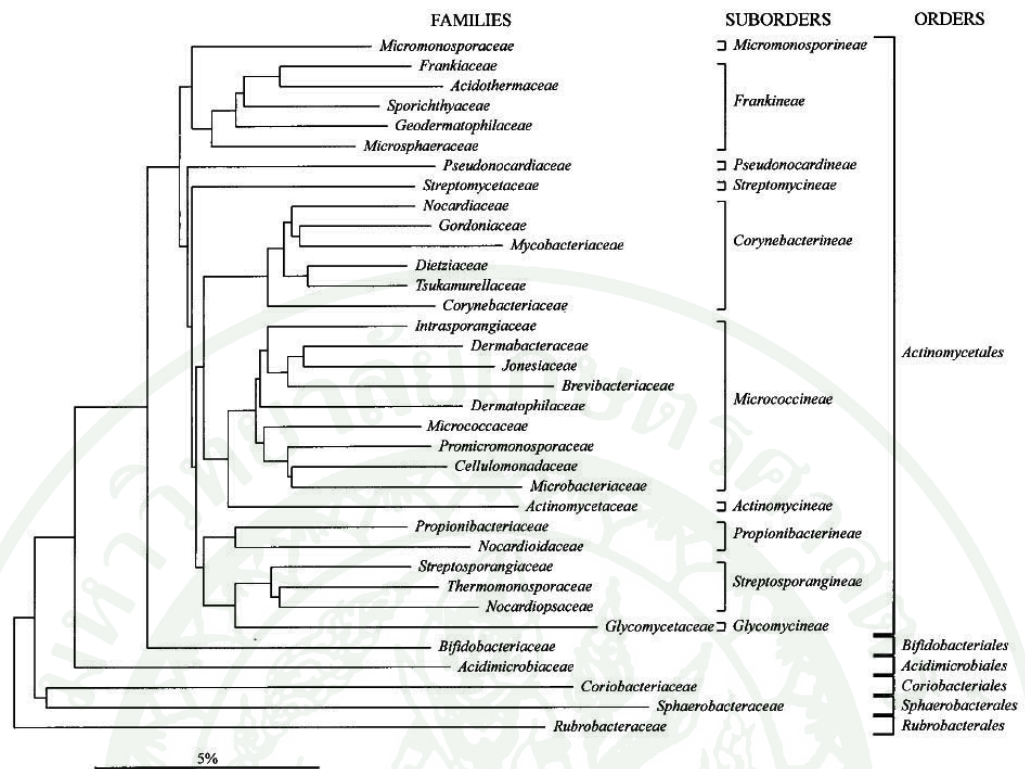
Class *Actinobacteria*

Subclass <i>Acidimicrobidae</i>	Order <i>Acidimicrobiales</i>	Family <i>Acidimicrobiaceae</i>
Subclass <i>Rubrobacteridae</i>	Order <i>Rubrobacterales</i>	Family <i>Rubrobacteraceae</i>
Subclass <i>Coriobacteridae</i>	Order <i>Coriobacteriales</i>	Family <i>Coriobacteriaceae</i>
Subclass <i>Sphaerobacteridae</i>	Order <i>Sphaerobacterales</i>	Family <i>Sphaerobacteraceae</i>
Subclass <i>Actinobacteridae</i>	Order <i>Actinomycetales</i>	

Suborder <i>Actinomycineae</i>	Suborder <i>Micrococcineae</i>	Suborder <i>Corynebacterineae</i>	Suborder <i>Micromonosporineae</i>	Suborder <i>Propionibacterineae</i>
Family <i>Actinomycetaceae</i>	Families <i>Micrococcaceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	Families <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i>	Family <i>Micromonosporaceae</i>	Families <i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
Suborder <i>Pseudonocardineae</i>	Suborder <i>Streptomycineae</i>	Suborder <i>Streptosporangineae</i>	Suborder <i>Frankineae</i>	Suborder <i>Glycomycineae</i>
Family <i>Pseudonocardaceae</i>	Family <i>Streptomyetaceae</i>	Families <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	Families <i>Frankiaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i>	Family <i>Glycomycetaceae</i>

Order *Bifidobacteriales* Family *Bifidobacteriaceae*

ภาพที่ 1 การจัดกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียที่ใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (Stackebrandt and Rainey, 1997)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์แอดิโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA
(Stackebrandt and Rainey, 1997)

แอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์

1. ความหมายของเอนโดไฟต์

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microorganism) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชหรือมีช่วงใดช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ไม่ว่าจะเป็นส่วนของราก ใบ หรือลำต้น (Azevedo *et al.*, 2000; Strobel, 2003) ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์เอนโดไฟต์กับพืชพบว่าอาจเป็นแบบ symbiosis หรือแบบ mutualism จากการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์พบว่า บางครั้งอาจเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืช หรือก่อให้เกิดโรคฉวยโอกาสในพืช (opportunistic pathogen) จุลินทรีย์เอนโดไฟต์พบทั้ง แบคทีเรียและรา ส่วนกลุ่ม mycoplasma และ achaeobacteria อาจพบได้บ้างแต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันแน่ชัด แต่เอนโดไฟต์ที่พบมากที่สุดเป็น คือ จุลินทรีย์จำพวกรา (Strobel, 2003)

2. ความหลากหลายและการกระจายตัวของเอนโดไฟต์แอกติโนมัยสิท

แอกติโนมัยสิทที่เป็นเอนโดไฟต์ที่เป็นที่รู้จักกันคืออยู่ในสกุล *Frankia* ซึ่งพบครั้งแรกที่ปมรากของพืชวงศ์สนโดย Brunchorst ในปี 1886 *Frankia* มีการอยู่อาศัยร่วมกับพืชแบบ symbiosis และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียไรโซเบียมในพืชวงศ์ถั่ว (Williams *et al.*, 1989) จากนั้นจึงมีการค้นพบแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก *Frankia* ในพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว ก็พบแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ ในรากข้าวสาลีพบว่ามีแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Nocardiodes* โดยจำแนกด้วยวิธีหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *nec1* ซึ่งเป็นยีนที่ก่อให้เกิดโรคพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ก็พบว่าแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์เหล่านี้ไม่มียีน *nec1* จึงชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคพืช (Coombs and Franco, 2003a) รายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าพืชเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนมัยสิทสูง ซึ่งแตกต่างจากการกระจายตัวของแอกติโนมัยสิทในดินตามธรรมชาติทั่วไป ซึ่งจะพบว่ามักเป็น *Streptomyces* เป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายของแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ ในข้าวสาลีที่ปลูกในพื้นที่ที่มีสภาพดินต่างกัน โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของยีน 16S rRNA โดยเทคนิค Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) พบความแตกต่างของแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์จากข้าวสาลีที่ปลูกอยู่ในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ชี้ให้เห็นว่าสภาพของดินและจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินมีผลต่อชนิดและ

จำนวนของแอกติโนมัยสีทในรากข้าวสาลี (Conn and Franco, 2004) นอกจากนี้ข้าวที่ปลูกในประเทศจีน มีรายงานว่าสามารถคัดแยก *Streptomyces* จากรากได้ (Tian *et al.*, 2004)

ในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดก็พบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ เช่น สามารถคัดแยกแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จากรากมะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004a; Tan *et al.*, 2006) รากและใบของกล้วย (Cao *et al.*, 2004b) ที่ปลูกในประเทศจีน ในมันฝรั่งยังพบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่ คือ *Kribbella solani* (Song *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดอีกด้วย (Taechowisan *et al.*, 2003) จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นแอกติโนมัยสีทมีการกระจายในพืชหลากหลายชนิดโดยไม่ได้มีความจำเพาะ ทำให้สรุปได้ว่า การอยู่อาศัยของแอกติโนมัยสีทในพืชนั้นเป็นเหตุการณ์ปกติที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แม้ว่ายังไม่มีการศึกษากลไกและประโยชน์ที่พืชกับแอกติโนมัยสีทมีส่วนร่วมอย่างแท้จริงก็ตาม (Hasegawa *et al.*, 2006)

การกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทในส่วนต่างๆ ของพืช สามารถพบได้หลายส่วน เช่น ราก ใบ และลำต้น (Hasegawa *et al.*, 2006) โดยแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จะพบเป็นปริมาณมาก และมีความหลากหลายสูงที่สุดบริเวณราก สอดคล้องกับปริมาณของแอกติโนมัยสีทในบริเวณดินรอบราก (rhizosphere) ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า แอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ไม่ได้อาศัยอยู่ในพืชชนิดนั้นๆ มาก่อนหน้าแต่อยู่อาศัยบริเวณดินรอบรากแล้วจึงเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อรากต่อไป

3. ความสำคัญของแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์

3.1 แหล่งของแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น ในดิน หรือแหล่งน้ำ แอกติโนมัยสีทที่เป็นที่รู้จักเดิมมักคัดแยกมาจากแหล่งดิน (Alexander, 1997; Okazaki, 2006) เนื่องจากภายในเนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะเป็นรากหรือใบ ล้วนมีสภาวะแตกต่างจากดิน ดังนั้น พืชจึงน่าจะเป็นแหล่งของแอกติโนมัยสีทที่หายากหรือแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ (Okazaki, 2006) แอกติโนมัยสีทสกุลใหม่ที่แยกได้จากพืชนั้น เริ่มมีรายงานในปี 1978 โดย Hasegawa ซึ่งคัดแยกจากพืชตระกูลหญ้า แอกติโนมัยสีทสกุลใหม่ดังกล่าวมีชื่อว่า *Actinosynnema* จากนั้นจึงมีรายงานการพบแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้จากพืชเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ยกตัวอย่างเช่น *Agromyces albus* ซึ่งแยกได้จากใบและลำต้นของ *Androsace* sp.

(Dorofeeva *et al.*, 2003) *Micromonospora coriariae* ซึ่งคัดแยกจาก *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006) *Pseudonocardia oroxyli* จากพืชสมุนไพรจีน *Oroxylum indicum* (Gu *et al.*, 2006) *Micromonospora lupine* และ *M. saelicesensis* จากปมรากของ *Lupinus angustifolius*. (Trujillo *et al.*, 2007) สำหรับพืชเศรษฐกิจและสมุนไพรในประเทศไทย มีรายงานการพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ เช่นกัน คือ *Kineococcus gymurae* sp. nov. คัดแยกจากรากว่านมหาภาพ (Duangmal *et al.*, 2008) *Pseudonocardia acaciae* sp. nov. คัดแยกจากรากของกระถินณรงค์ (Duangmal *et al.*, 2009) ส่วนข้าวเหนียวและข้าวหอมมะลิสามารถคัดแยก *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov. (Indananda *et al.*, 2009a) และ *Actinoallomurus oryzae* sp. nov. (Indananda *et al.*, in press) ได้ตามลำดับ

3.2 แหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารปฏิชีวนะที่ใช้กันทุกวันนี้ถึงสามในสี่ ได้มาจากแอคติโนมัยซีท และร้อยละ 80 ของยาปฏิชีวนะที่ได้จากแอคติโนมัยซีทนั้นผลิตมาจากสกุล *Streptomyces* (Baltz, 1998) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่า มีปริมาณแบคทีเรียหรือราก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จึงเป็นที่คาดหวังว่าจะเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ซึ่งนำมาใช้ทดแทนสารเดิมได้ (Igarachi, 2004)

แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์หลายชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราก่อโรคในมนุษย์ สาร munumbicins ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Mycobacterium tuberculosis* และต่อต้านปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคไข้จับสั่น *Plasmodium falciparum* สาร munumbicins นี้ผลิตโดย แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces* sp. NRRL 30562 ซึ่งแยกได้จากใบและลำต้นของพืชสมุนไพร *Kennedia nigricans* หรือ Snakevine ในประเทศออสเตรเลีย (Castillo *et al.*, 2002) แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces* ที่พบในพืชสกุล *Celataceae* สามารถผลิตสารประกอบชนิดใหม่ประเภท chloropyrrol และ chlorinated anthracyclinone ซึ่งออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อก่อโรคในกลุ่ม mycobacteria ได้ (Pullen *et al.*, 2002) สาร coronamycins ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces* ก็สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อก่อโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Cryptococcus neoformans* และ *Plasmodium falciparum* เป็นต้น (Ezra *et al.*, 2004) หรือ สาร novobiocin and cedarmycins ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ (Igarachi, 2004)

3.3 ความคุมจุลินทรีย์โรคพืช

แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราก่อโรคพืชในหลอดทดลองได้ เช่น แอคติโนมัยซีทซึ่งคัดแยกจากมะเขือเทศ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในมะเขือเทศ *Fusarium oxysporum* (Smith, 1957) และ *Rizoctonia solania* (Cao *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในมะเขือเทศ คือ *Ralstonia solanacearum* (Tan *et al.*, 2006) อีกด้วย Tian และคณะ (2004) ได้คัดแยกแอคติโนมัยซีทจำนวน 274 สายพันธุ์จากข้าว แล้วพบว่า แอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ถึง 50% สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคข้าวได้ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับ Taechowisan และ Lumyong (2003) ซึ่งคัดแยกแอคติโนมัยซีท จำนวน 59 สายพันธุ์ จากขิง เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งราและยีสต์ *Candida albicans* พบว่า ส่วนมากสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ เพื่อจะสามารถนำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้จริง Coombs และคณะ (2003b) จึงได้ทดลองคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากรากข้าวสาลี จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคของข้าวสาลี แล้วปลูกแอคติโนมัยซีทดังกล่าวกลับเข้าสู่ต้นข้าวสาลี พบว่า ต้นข้าวสาลีที่ได้รับการปลูกเชื่อมีความต้านทานต่อราก่อโรคพืชสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.4 กระตุ้นการเจริญของพืช

การเจริญของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์บางสายพันธุ์ในพืช พบว่า มีส่วนกระตุ้นทำให้พืชเจริญเติบโตดี เช่น เมื่อปลูกเชื้อ *Streptomyces* MBR-52 สู่ต้นอ่อนของกุหลาบพันปี (*rhododendron*) พบว่า ต้นอ่อนมีจำนวนรากและความยาวมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีทดังกล่าวสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยการสร้างฮอร์โมนพืชบางชนิดได้ (Meguro *et al.*, 2006) ข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนผลการทดลองของ Igarachi และคณะ (2002) ซึ่งพบว่า *Streptomyces hygroscopicus* TP-A045 สามารถผลิตสาร pteric acid A และ B ซึ่งมีคุณสมบัติออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน auxin ของพืช และสามารถกระตุ้นการงอกยาวของรากในถั่วได้ เช่นเดียวกับแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nonomuraea* และ *Pseudonocardia* ที่คัดแยกจากกฤษณาในประเทศไทย พบว่า สามารถผลิตฮอร์โมนกลุ่ม auxin คือ indole-3-acetic acid (IAA) ในหลอดทดลองและบางสายพันธุ์ยังผลิตสารที่มีคุณสมบัติจับโลหะ คือ ไซเดอโรฟออร์ (Siderophore) ซึ่งถือว่าเป็นสารที่อาจช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ (Nimnoi *et al.*, 2009)

กระถินณรงค์

1. ลักษณะและความสำคัญ

กระถินณรงค์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acacia auriculiformis* Cunn. ex Benth. มีชื่อท้องถิ่นว่า Northern black wattle (ออสเตรเลีย) หรือ wattle tree เป็นไม้ในวงศ์ Leguminosae ซึ่งจัดว่าเป็นพืชตระกูลถั่ว และเป็นไม้โตเร็วชนิดหนึ่ง มีความสูงตั้งแต่ 8 เมตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงถึง 20-30 เมตร เป็นพันธุ์ไม้ไม่ผลัดใบจึงเห็นใบเขียวชอุ่มตลอดปี มีใบเป็นพุ่มหนา ใบของกระถินณรงค์มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว หนา ใบสีเขียวเข้มและโค้งเป็นรูปเคียว ช่อดอกมีลักษณะเป็น spike ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ช่อดอกแต่ละช่อประกอบด้วยดอกเล็กๆ จำนวนมาก ดอกของกระถินณรงค์มีสีเหลืองและมีกลิ่นหอม เมื่อมีการผสมทั้งแบบข้ามต้น และการผสมเกสรแบบภายในต้น ดอกจะพัฒนากลายเป็นฝักสีเขียวเมื่อแก่เป็นสีน้ำตาลถึงดำ ในตอนแรกฝักจะเหี่ยวตรงก่อนที่จะบิดงอ ขยู่เป็นกระจุกในตอนหลัง เมล็ดกระถินณรงค์มีลักษณะกลมแบนขนาดเล็ก แต่ละฝักจะมีเมล็ดอยู่ภายใน เมล็ดอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ (ทองพูล, 2545)

กระถินณรงค์ยังนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับทำเยื่อกระดาษได้ดี ทั้งชนิดฟอกและไม่ฟอกสี เชื้อที่ผ่านการฟอกแล้วนำไปผลิตกระดาษชนิดดี เช่น กระดาษเขียนหนังสือ เพราะมีคุณภาพใกล้เคียงกับเชื้อที่ได้จากไม้ยูคาลิปตัส ซึ่งเหมาะสำหรับใช้โรงงานที่ผลิตกระดาษชนิดต่างๆ และเป็นไม้โตเร็วจึงเหมาะแก่การใช้ผลิตกระดาษเพื่อชดเชยการผลิตเยื่อกระดาษซึ่งไม่เพียงพอภายในประเทศ และเหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงเพราะให้ความร้อนสูง นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการปลูกบริเวณสวนสาธารณะ หรือที่พักอาศัยเพื่อเป็นร่มเงา และดอกของกระถินณรงค์มีกลิ่นหอมจึงมีความเหมาะสมในการปลูกให้ร่มเงา (ทองพูล, 2545)

2. เอนโดไฟต์ในกระถินณรงค์

กระถินณรงค์เป็นพืชตระกูลถั่วซึ่งมีความทนทานต่อสภาพดินที่ไม่เหมาะสมและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของดินได้ดี เนื่องจากบริเวณรากมีรา ectomycorrhiza ในสกุล *Pisolithus* โดยไมซีเลียมของ *Pisolithus* sp. ที่เจริญออกมาภายนอกรากนั้นจะช่วยพืชในการดูดซึมน้ำและอาหารซึ่งเป็นการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Duponnois and Ba, 1999) และพบว่าช่วยให้พืชมีความทนทานต่อหนอนตัวกลมที่เป็นแมลงศัตรูพืช (Duponnois et al., 2000) รา

endomycorrhiza ในสกุล *Glomus intraradices* ก็มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ กระถินณรงค์และพืชในสกุล *Acacia* เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรีย *Pseudomonas monteilii* ช่วยในการเจริญของ mycorrhiza ในพืช โดย *P. monteilii* จะกระตุ้นการผลิต สารประกอบฟีนอลิก เช่น hypaphorine ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของ mycorrhiza ให้เจริญได้ดี ยิ่งขึ้น (Duponnois and Plenchette, 2003)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียในสกุล *Bradyrhizobium* อาศัยอยู่บริเวณปมรากของกระถินณรงค์ ซึ่งจุลินทรีย์นี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ จึงส่งเสริมให้กระถินณรงค์เจริญได้เร็วและช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินบริเวณนั้น จากการศึกษาปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. และรา mycorrhiza เข้าสู่เมล็ดของกระถินณรงค์แล้วนำไปปลูก พบว่าต่างส่งเสริมการเจริญเติบโตของกระถินณรงค์ และช่วยให้พืชมีความทนทานต่อสภาพดินเค็มได้ (Diuof *et al.*, 2005)

การติดตามการเข้าอยู่อาศัยของเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อพืช

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับพืช อาทิ แบคทีเรียก่อโรคพืช (phytopathogenic bacteria) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียบริเวณรากพืช (rhizospheric bacteria) สามารถศึกษาและติดตามการบุกรุก (infection), การเจริญ (colonization) และตำแหน่งของแบคทีเรียภายในเนื้อเยื่อพืช (localization) ได้โดยการถ่ายยีนรายงาน เช่น ยีน *gus* หรือ *lacZ* สูแบคทีเรียเหล่านี้ แล้วปลูกเชื้อกลับเข้าสู่พืช จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชไปย้อมด้วยซับสเตรท เช่น 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GlcA) หรือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) แล้วจึงตรวจสอบตำแหน่งของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืชจากจุดสีที่เกิดขึ้น (Sessitsch *et al.*, 1998)

การติดตามแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในพืชอาจทำได้โดยการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สนใจสู่ต้นอ่อนของพืช จากนั้นจึงนำพืชไปปลูกแล้วตรวจสอบการอยู่อาศัยของแอคติโนมัยสิทโดยคัดแยกแอคติโนมัยสิทโดยเทคนิคทำให้ผิวของพืชปลอดเชื้อ (Coombs and Franco, 2003a) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถระบุตำแหน่งการเจริญของแอคติโนมัยสิทในเนื้อเยื่อพืชและยังไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของแอคติโนมัยสิทอื่นๆได้ Sardi *et al.* (1992) จึงติดตามแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในรากมะเขือเทศโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบการเจริญของเส้นใยของแอคติโนมัยสิทบริเวณพื้นผิว

รากแต่ยังไม่สามารถยืนยันความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างแอกติโนมัลลิตกับพืชได้ Suzuki *et al.* (2005) ประสบความสำเร็จในการติดตามแอกติโนมัลลิตเอนโดไฟต์ในใบของกุหลาบพันธุ์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านร่วมกับเทคนิค histochemistry พบการบุกรุกของแอกติโนมัลลิตเข้าทางปากใบและเจริญในเนื้อเยื่อใบ จึงสามารถอธิบายและยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนมัลลิตเอนโดไฟต์กับพืชได้

ยีน green fluorescent protein (*gfp*) เป็นยีนที่พบในแมงกระพรุน *Aequorea victoria* ผลิตโปรตีนขนาด 27 kDa มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ด้วยตัวเองภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหรือแสงสีฟ้า โดยไม่ต้องอาศัยซับสเตรทหรือ co factor ใดๆ จึงถูกนำมาใช้เป็นยีนรายงานที่มีความไวสูง สามารถนำมาติดตามการแสดงออกของยีนในเซลล์ที่มีชีวิตได้ (Chalfie *et al.*, 1994; Tsien, 1998) และสามารถนำมาใช้ติดตามการบุกรุกและการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชในระยะต่างๆ ของการพัฒนาในพืช เช่น การติดตามการบุกรุกและการพัฒนาของราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* ในมะเขือเทศ (Lagopodi *et al.*, 2002) การติดตามการแพร่ขยายของแบคทีเรียก่อโรคพืช *Xylophilus ampelinus* ในเนื้อเยื่อขององุ่น (Grall and Manceau, 2003) และการบุกรุกของแบคทีเรีย *Erwinia amylovora* ในเนื้อเยื่อใบของแอปเปิ้ล (Bogs *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังใช้ติดตามการบุกรุก การเจริญและตำแหน่งของเอนโดไฟต์ภายในเนื้อเยื่อพืชในระยะการเจริญต่างๆ ได้ เช่น ติดตามเอนโดไฟต์กลุ่มไรโซเบียมในรากถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*) ซึ่งสามารถติดตามการเจริญของเอนโดไฟต์ในทุกระยะการเจริญของพืชนี้ได้ (Gage *et al.*, 1996) การติดตามไรโซเบียมใน *Arabidopsis* และในมันฝรั่ง (Hallmann *et al.*, 2001) รวมทั้ง ไรโซเบียมและ *Agrobacterium* ในรากข้าวสาลี (Sharma *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีน *gfp* ในการติดตามเอนโดไฟต์แบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เช่น *Pantoea* sp. และ *Ochrobactrum* sp. ในข้าว (Verma *et al.*, 2004) *Bacillus megaterium* C4 ในรากข้าวและข้าวโพด (Liu *et al.*, 2006)

การใช้ยีน *gfp* เป็นยีนรายงานใน *Streptomyces* ในระยะแรกได้มีการทดลองถ่ายยีนนี้สู่ *S. coelicolor* แต่พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากลำดับเบสของยีน *gfp* มีลักษณะเป็น A-T rich (38% G+C) ซึ่งแตกต่างกับลักษณะของโครโมโซม *S. coelicolor* ซึ่งเป็น G-C rich (74% G+C) และเกิดจากการเลือกใช้โคดอน (codon usage) ใน *Streptomyces* เนื่องจากยีน *gfp* ประกอบด้วยโคดอน TTA 3 โคดอน ซึ่งใน *Streptomyces* เลือกใช้โคดอนดังกล่าวนี้ต่ำมากจึงมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน (Leskiw *et al.*, 1991) ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาโดยการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ประมาณ 190 ตำแหน่งภายในยีน *gfp* ส่งผลให้เกิดโปรตีนที่มีความสามารถเรืองแสงได้มากกว่าเดิมและการแสดงออกของยีนสูงขึ้น จึงเรียกยีนกลายนี้ว่า enhanced green fluorescent protein (*egfp*) ซึ่งมี

excitation wavelength ที่ 488 นาโนเมตรและมี emission wavelength ที่ 507 นาโนเมตร ยีน *egfp* สามารถนำมาใช้เป็นยีนรายงานในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (Haas *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1996) และพบว่ายีน *egfp* สามารถแสดงออกใน *Streptomyces* ได้ เนื่องจากมีการกำจัดโคดอนที่ไม่เหมาะสมออกไป (Sun *et al.*, 1999)

ยีน *egfp* สามารถนำมาใช้ในการติดตามแอกติโนไมยซีทเอนโคไฟต์ในพืชได้ เช่น ติดตามการบุกรุกของแอกติโนไมยซีทเอนโคไฟต์สกุล *Streptomyces* ในข้าวสาลี โดยการถ่ายพลาสมิด pIJ8641 ซึ่งประกอบด้วย *egfp* โดยวิธีคอนจูกันต่างสกุลถ่ายพลาสมิดจาก *E. coli* สู่อะคิโนไมยซีท *Streptomyces* และพบว่าการแสดงออกของยีน *egfp* ใน *Streptomyces* จากนั้นเมื่อปลูกเชื้อกลับเข้าสู่เมล็ดข้าวสาลีแล้วนำไปปลูก พบว่าสามารถติดตามการบุกรุก การเจริญและตำแหน่งของเอนโคไฟต์ในระยะการพัฒนาวงข้าวสาลีได้ จากการเรืองแสงของโปรตีนชนิดนี้ (Coombs and Franco, 2003)

การถ่ายพลาสมิดสู่ *Streptomyces* โดยวิธีคอนจูกันต่างสกุล

การทำคอนจูกันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด มีรายงานครั้งแรกโดย Trieu-Cuot และคณะ (1987) จากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการทำคอนจูกันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* ได้สำเร็จ (Mazodier *et al.*, 1989) และพัฒนาจนสามารถส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* ได้หลากหลายสายพันธุ์ (Bierman *et al.*, 1992; Fouces *et al.*, 2000) และสามารถส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แอกติโนไมยซีทสกุลอื่นๆ ได้ เช่น *Amycolatopsis* (Stegmann *et al.*, 2001), *Actinoplanes* (Heinzelmann *et al.*, 2003), *Nonomuraea* (Stinchi *et al.*, 2003) และ *Saccharopolyspora* (Matsushima *et al.*, 1994) เป็นต้น

การศึกษาคอนจูกันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* ในอดีตอาศัย shuttle plasmid ที่มีจุดเริ่มต้นการจำลองของดีเอ็นเอ (origin of replication) ของ *E. coli* และ *Streptomyces* ซึ่งทำให้ พลาสมิดชนิดนี้สามารถจำลองตัวเองได้ใน *E. coli* และ *Streptomyces* การส่งถ่ายพลาสมิดจะอาศัย *oriT* จากพลาสมิด RK2 (IncP) ซึ่งอยู่บน shuttle plasmid และอาศัยการทำงานของยีน *tra* จากพลาสมิด RP4 ที่อยู่ใน *E. coli* ดังนั้นสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ใช้ในการทำคอนจูกันต่างสกุลจะเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *tra* จากพลาสมิด RP4 อยู่บนโครโมโซม เช่น *E. coli* S17-1 (Mazodier *et al.*, 1989) หรือเป็น *E. coli* ที่มี self-transmissible plasmid เช่น สายพันธุ์ ET12567 ที่มีพลาสมิด pUB307 (Flett *et al.*, 1997) หรือสายพันธุ์ ET12567 ที่มีพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็น non-

transmissible plasmid (Sia *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า การเลือกใช้สายพันธุ์ *E. coli* ที่มีการเติมหมู่เมธิลที่ ดีเอ็นเอ เช่น *E. coli* S17-1 จะมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* ต่ำกว่าการเลือกใช้ *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิล (มีจีโนไทป์เป็น *dam⁻* และ *dcm⁻*) ได้แก่ *E. coli* ET12567 เนื่องจาก *Streptomyces* มีกลไกป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยทำลายดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมธิล (Flett *et al.*, 1997)

ปัจจุบันพลาสมิดที่ใช้ในการคอนจูเกชันล้วนแต่เป็นพลาสมิดที่ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ (non-replicative plasmid) ใน *Streptomyces* แต่สามารถจำลองตัวเองได้ใน *E. coli* เนื่องจากประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองตัว (*ori*) ของ *E. coli* พลาสมิดเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ *Streptomyces* แล้วจะเข้าไปรวมกับโครโมโซมโดยการเกิด site specific recombination ของตำแหน่ง attachment site (*attP*) ของพลาจ ๐C31 ที่อยู่บนพลาสมิดนั้นๆ กับตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซมของ *Streptomyces* (Bierman *et al.*, 1992)

การทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* สามารถทำได้โดยใช้สปอร์ (Mazodier *et al.*, 1989; Kitani *et al.*, 2000) หรือใช้ไมซีเลียมของ *Streptomyces* (Bierman *et al.*, 1992; Phornphisutthimas *et al.*, 2010) โดยการผสมสปอร์หรือไมซีเลียมกับเซลล์ *E. coli* ผู้ให้ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคัดเลือกผู้รับที่มีพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (exconjugant) โดยใช้ยาปฏิชีวนะตามชนิดของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะบนพลาสมิดนั้นๆ (Kieser *et al.*, 2000) จากการศึกษาพบว่าการทำคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ของ *Streptomyces* จะต้องมีการกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยบ่มสปอร์ที่อุณหภูมิเหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดคอนจูเกชันได้ (Mazodier *et al.*, 1989; Bierman *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดคอนจูเกชัน เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (Bierman *et al.*, 1992; Kitani *et al.*, 2000; Phornphisutthimas *et al.*, 2010) และสถานะที่ใช้ในการทำคอนจูเกชันในเชื้อแต่ละชนิด ทำให้ต้องมีการศึกษาปรับปรุงวิธีการให้เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด (Kitani *et al.*, 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	wild-type	ATCC 6275
<i>Bacillus cereus</i>	wild-type	ATCC 11778
<i>Candida albicans</i>	wild-type	BCC 5390
<i>E. coli</i>	wild-type	ATCC 8739
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS</i> Km ^r (<i>tra</i> Cm ^r)	MacNeil <i>et al.</i> (1992); Sia <i>et al.</i> (1996)
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>Sup E44hsdR17 recA1 endA1 gyrA thi</i> <i>relA1 lac-F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ M15 Tn10(<i>tet</i> ^r)]	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	wild-type	สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
<i>Fusarium moniliforme</i>	wild-type	สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
<i>Fusarium proliferatum</i>	wild-type	DOAC 0842
<i>Helminthosporium oryzae</i>	wild-type	สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
<i>Ralstonia solanacearum</i>	wild-type	สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
<i>Rhizobium</i> sp. strain DASA 36075	wild-type	กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง การเกษตร กรมวิชาการเกษตร
<i>Rhizoctonia solani</i>	wild-type	DOAC 1406
<i>Staphylococcus aureus</i>	wild-type	ATCC 25923
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycine</i>	wild-type	สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ตารางที่ 2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
pIJ8655	ColE1 replicon <i>oriT attP int Apr^r Thio^r egfp</i>	Sun <i>et al.</i> (1999)
pIJ10257	ColE1 replicon <i>oriT attP int Apr^r Thio^r</i>	John Innes Centre, UK

หมายเหตุ Km = kanamycin, Cm = chloramphenicol, Apr = apramycin, Tet = tetracyclin, Thio = thiostrepton, egfp = enhanced green fluorescent protein

2. สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซื้อจากบริษัท Amresco (USA), APS Finechem (Australia), Becton Dickinson (USA), Fluka (Switzerland), Himedia (India), Hispanlab (Spain), Macherey-Nagel (Germany), Merck (Germany), Scharlau (Spain), Sigma (Germany) เอนไซม์ไลโซไซม์จากบริษัท Amresco (USA) และ Fluka (Switzerland) เอนไซม์ RNaseA จากบริษัท Amresco (USA) เอนไซม์ T4 DNA ligase เอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder) จากบริษัท Fermentas (USA)

3. การคัดแยกแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากกระถินณรงค์

3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเก็บรักษา

เก็บส่วนรากและใบของกระถินณรงค์จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน กรุงเทพมหานคร, วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขต ศาลายา จังหวัดนครปฐม และสวนรถไฟ กรุงเทพมหานคร ส่วนของรากและใบก่อนนำมาศึกษา ทันทิ หรือบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาศึกษา

3.2 การแยกแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากตัวอย่างพืช

การแยกเอนโดไฟต์จากรากพืชตัดแปลงจากวิธีการของ Coombs and Franco (2003a) และวิธีการของ Cao *et al.* (2004a) โดยแช่รากในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 0.1% Tween20 ในขวด รูปชมพู่ แช่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อชะล้างอนุภาคดินบริเวณราก (rhizosphere) จากนั้นแช่รากใน เอธานอล 95% แช่เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่รากในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 1% NaOCl และ 0.1% Tween20 แช่ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ล้างรากด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่มี 0.1% tween20 3 ครั้ง นำน้ำล้างรากครั้งสุดท้ายมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหาร starch casein agar (SCA, 1L: 10 g soluble starch, 0.3 g vitamin free casein, 2 g KNO₃, 2 g K₂HPO₄, 0.05 g MgSO₄, 0.02 g CaCO₃, 0.01 g FeSO₄, 15 g agar; Küster and Williams, 1964) ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร penicillin G 2.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร amphotericin B 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ cyclohexamide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์

นำส่วนของรากมาตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใส่ลงในโถงที่ผ่านการฆ่า เชื้อแล้ว เติมน้ำละลาย ¼ Ringer (0.9 % NaCl, 0.042 % KCl, 0.048 % CaCl₂, 0.02 % NaHCO₃) 2-3 มิลลิลิตร บดรากด้วยโถงให้ส่วนรากแตก จากนั้นดูดส่วนของสารละลายดังกล่าวเกลี่ย บน อาหาร SCA ที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้น บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์ เก็บโคโลนี แอกติโนมัยสีทที่เจริญขึ้นมาเกลี่ยบนอาหาร Mannitol soybean agar (MS, 1L: 20 g soybean, 20 g mannitol, 20 g agar) จนเชื้อบริสุทธิ์

ส่วนของรากที่ผ่านการบดแล้ว นำมาวางบนอาหาร SCA ที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้น และบนอาหาร water agar (1.5% agar) ที่เติมยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับอาหาร SCA บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์ เก็บโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่เจริญขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร MS จนเชื้อบริสุทธิ์

3.3 การเก็บรักษาแอคติโนมัยสีท

เก็บเชื้อมาลงบนอาหาร MS บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เมื่อเชื้อเจริญดีจึงชุบสปอร์และไม่ซีเลียมลงในสารละลายกลีเซอรอล 20% เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1 การศึกษาสปอร์ สีเส้นใย และสารสีที่ละลายน้ำ

เลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร malt extract-yeast extract agar (ISP2) และอาหาร oatmeal agar (ISP3) (Shirling and Gottlieb, 1966) สังเกตการเจริญ บันทึกรูปร่างโคโลนี สีของสปอร์ สีเส้นใยอาหาร รวมทั้งสีของสารสีที่ละลายน้ำ

4.2 การศึกษาการสร้างสารสีเมลานิน

เลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP7 (Shirling and Gottlieb, 1966) ชนิดที่เติม tyrosine และไม่เติม tyrosine นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ บันทึกการสร้างสารสีสีดำบนอาหาร ISP7 ที่เติม tyrosine และไม่เติม tyrosine ตามลำดับ

5. การจำแนกแอกติโนมัยสียโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วน

5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสีย

เลี้ยงแอกติโนมัยสียในอาหารเหลว ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไมซีเลียมมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Kieser *et al.* (2000) โดยเติม lysis solution (0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0) ที่มีไลโซไซม์ เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ RNaseA เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง โดยจะใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงระหว่างบ่ม 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม 2 % sodiumdodecylsulfate (SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ของเหลวผสมกันทันที เติมน้ำตาลละลาย ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนถ่ายลงสู่หลอดใหม่ (อาจทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ถ้ามีตะกอนโปรตีนระหว่างชั้นมาก) เติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่า ของปริมาตรสารละลายที่ดูดได้ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่า ผสมโดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดสารละลายออกให้หมด ทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ตามความเหมาะสม แล้วจึงตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้าต้องการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานจะเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

5.2 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer [0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% glycerol] ในอัตราส่วน 5:1 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder) โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อมในเอซีเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง BioDoc-It System (UVP, USA)

5.3 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน 16S rRNA

การเพิ่มปริมาณของยีนจะใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีท คือ ไพรเมอร์ STR1F (5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3') และ STR1530R (5'-AAGGAGATCCAG CCGCA-3') (Kataoka *et al.*, 1997) สารเคมีที่ใช้ทำ PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร (50 ng DNA template, 1xPCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP mixture, 0.125 pM primer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase, 10 % dimethyl sulfoxide) สภาวะที่ใช้ทำ PCR ดังนี้

รอบที่ 1	94 องศาเซลเซียส 4 นาที
รอบที่ 2 ถึง 35	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	55 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที
รอบสุดท้าย	94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	55 องศาเซลเซียส 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส 4 นาที

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีการในข้อ 5.2

5.4 การหาลำดับเบสบริเวณปลาย 5' ของยีน 16S rRNA

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในข้อ 5.3 ไปทำให้บริสุทธิ์โดย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany) โดยใช้วิธีการตามคู่มือ แล้วจึงส่งไปหาลำดับเบสโดยตรงที่ Macrogen (Korea) โดยใช้ไพรเมอร์ STR1F

5.5 การหาลำดับเบสแบบสมบูรณ์

การหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA แบบครบทั้งยีน โดยการหาลำดับเบสด้วยไพรมอร์ STR1F, STR1530R, ATT025 (5'-GATTAGATACCCTGGTAGTCCA-3') และ ATT026 (5'-TGGACTACCAGGGTATCTAATC-3') แล้วรวมลำดับเบสเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)

5.6 การจำแนกแอกติโนมัยสีทจากลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วน และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

นำลำดับเบสที่ได้รับในรูปของ ABI format มาอ่านด้วยโปรแกรม CHROMAS เพื่ออ่านโครมาโตแกรมที่ได้ ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส จากนั้นจึงตัดลำดับเบสบริเวณส่วนต้นและปลายที่มีความไม่ชัดเจนออกให้เหลือแต่บริเวณที่มีความน่าเชื่อถือ จากนั้นจึงนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ type strain ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn และ EzTaxon (Chun *et al.*, 2007)

เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของตัวอย่างกับแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันโดยการทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.83 (Thomson *et al.*, 1994) โดยลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความคล้ายคลึงกับตัวอย่างนั้นสืบค้นจากฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nih.gov) จากนั้นนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) โดยคำนวณตามวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1986) ด้วยค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

6. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

6.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC11778 และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC8739 ตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรคพืช ซึ่งได้รับจาก สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* ทำให้

เกิดโรคใบจุดนูน (bacterial pustule) ในถั่วเหลือง, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ทำให้เกิดโรคเน่าและ (soft rot) ในผักและพืชในกลุ่มหัวหอมและ *Ralstonia solanacearum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ในมะเขือเทศ

จุลินทรีย์ที่เป็นตัวแทนของราและยีสต์ ได้แก่ *Aspergillus niger* ATCC 6275 และ *Candida albicans* BCC 5390 ตามลำดับ ตัวแทนของราก่อโรคพืช ได้แก่ *Helminthosporium oryzae* เชื้อสาเหตุโรคเมล็ดต่างในข้าว, *Fusarium moniliforme* เชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าในอ้อย, *Fusarium proliferatum* DOAC0842 เชื้อสาเหตุโรคเมล็ดเน่าในข้าวโพด และ *Rhizoctonia solani* DOAC1406 เชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในมะเขือเทศ

6.2 การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับทดสอบ

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth (NB, 1L: 3.0 g beef extract, 5.0 g peptone) เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง จนมีความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.25 สำหรับราทดสอบจะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA; Himedia, India) เป็นเวลา 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

6.3 การทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

การตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียดัดแปลงจากวิธี plate diffusion method (Collins, 1989) โดยเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร MS, ISP2 และ ISP3 ให้เต็มจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สำหรับแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม *Streptomyces* และเวลา 2 สัปดาห์ สำหรับแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม non-*Streptomyces* นำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะแอคติโนมัยสีทที่เพาะเลี้ยงไว้แล้วนำมาวางบนอาหาร nutrient agar (NA; NB ที่เติมวุ้น 1.5%) จากนั้นจึงราดด้วยแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ นำ paper disc ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 1 มิลลิกรัมต่อหนึ่ง paper disc เป็นตัวควบคุม นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจสอบผลโดยดูจากวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

การตรวจสอบความสามารถในการต่อต้านยีสต์ทำได้เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น แต่จะทดสอบบนอาหาร PDA การตรวจสอบความสามารถในการต่อต้านรา ทำได้โดยเลี้ยงแอคติโนมัย-

สื่อทบนอาหาร PDA โดยการปลูกเชื้อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สำหรับแอสกีโนไมซีตในกลุ่ม *Streptomyces* และเวลา 2 สัปดาห์ เจริญราดทดสอบที่เจริญบนอาหาร PDA ในข้อ 6.2 ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนอาหาร NA ที่ปลูกเชื้อแอสกีโนไมซีตไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจสอบผลโดยดูจากการยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น และนำราทดสอบไปวางบนอาหาร NA ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อแอสกีโนไมซีตเพื่อเป็นตัวควบคุม

7. การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อการถ่ายยีน *egfp* สู่อาสกีโนไมซีตเอนโดไฟต์

7.1 วิธีพื้นฐานสำหรับ *E. coli*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli* ใช้ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

7.1.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

การเลี้ยง *E. coli* บนจานอาหารแข็งทำได้โดยเชื้อลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LA; 1L: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar, pH 7.2) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

การเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเติมเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว อัตราส่วน 1:100 โดยใช้อาหารเหลว LB (สูตรเหมือน LA แต่ไม่เติม agar) นำไปเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

เมื่อเลี้ยง *E. coli* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ โดยเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมด้วยความเข้มข้นดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง *E. coli*

Antibiotic stock solution (mg/ml)	Final concentration in media (µg/ml)		
	Agar	Broth	Overlay (µg/plate)
hygromycin B (50)	50	25	-
chloramphenicol (25 in ethanol)	50	25	-
kanamycin (50)	50	25	-
nalidixic acid (25)	25 (500)	-	25 (500)

7.1.2 การสกัดพลาสมิด

ใช้วิธี alkaline lysis with SDS ของ Sambrook and Russell (2001) โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลาข้ามคืน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บเซลล์ เทอาหารทิ้ง จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์ใน Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10-15 นาที เติมน้ำ Solution II [0.2 M NaOH, 1%(w/v) SDS] ที่เตรียมสำหรับใช้ทันที 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาทันทีจนของเหลวผสมกันดี แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปเติมน้ำ Solution III (3 M potassium acetate, 5 M glacial acetic acid) ที่เย็นจัด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ของเหลวผสมกันดี แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายถ่ายใส่หลอดใหม่ เติมน้ำฟอสเฟต: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาประมาณ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมด ตั้งไว้ให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ที่มี RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ตามความเหมาะสม เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

7.1.3 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell)

ทำตามวิธีของ Chung *et al.* (1989) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.3-0.4 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติม Transformation and storage solution [TSS; 10 % (w/v) polyethylene glycol (PEG) MW = 8000, 5 % dimethylsulphoxide (DMSO), 50 mM MgCl₂, in LB, pH 6.5] ที่เย็นจัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ในสารละลาย นำ ไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ แล้วกระจายเซลล์ ใน TSS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร ถ้ายังไม่นำไปใช้ให้เก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

7.1.4 การทรานฟอร์มเมชัน

ใช้วิธี heat-shock (Sambrook and Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิด 1-10 ไมโครลิตรในคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ผสมเบาๆ ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 20 นาที จึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำ กลับไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เติมหาอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงแบ่งเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงอาหาร LA ซึ่งมียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสมเพื่อคัดเลือก โดยใช้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะตามตารางที่ 3 จากนั้นบ่มจานอาหารที่เกลี่ยด้วยเซลล์แล้วที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญไปตรวจสอบการได้รับพลาสมิดต่อไป

7.2 เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

ใช้ชุดอุปกรณ์ QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Germany) ทำ ตามวิธีการในคู่มือ โดยตัดอะกาโรสเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำฟลอร์ QG ปริมาตรประมาณ 3 เท่าของเจล นำ ไปปั่นที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ

10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด โดยต้องพลิกหลอดไปมาเป็นครั้งคราว ดูดสารละลายทั้งหมด ใส่ลงใน QIAquick spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำ ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมนัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดของเหลวทั้งหมด จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมนัฟเฟอร์ EB ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตามความเหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที หรืออาจนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

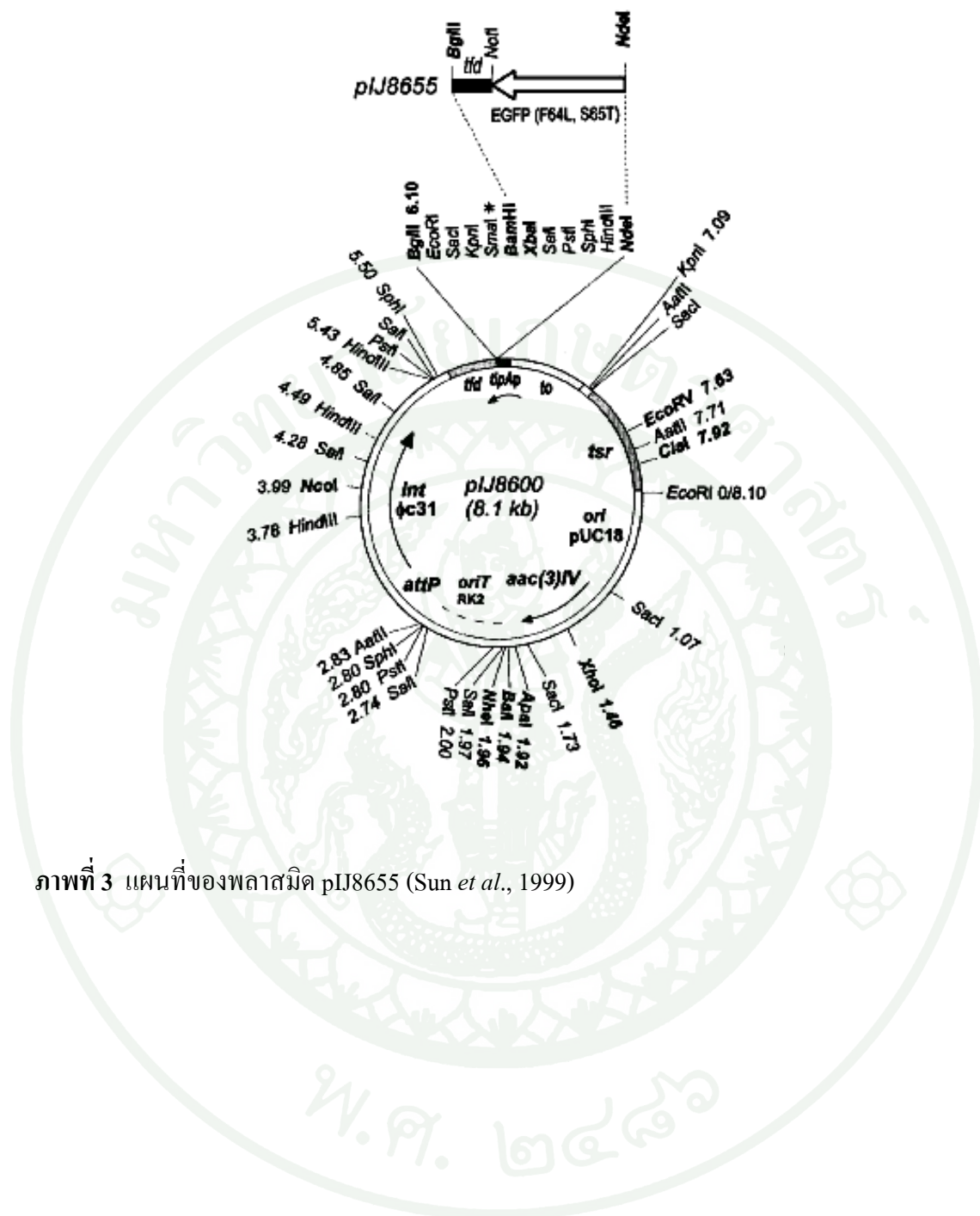
7.2.2 การตัดและเชื่อมดีเอ็นเอ

การตัดดีเอ็นเอ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยเตรียมส่วนผสม และบ่มตามสภาวะที่แนะนำ ในคู่มือ

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสม จะนำสารละลายดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 7.2.1 เชื่อมต่อโดยใช้อัตราส่วนของพลาสมิดต่อชิ้นดีเอ็นเอ เท่ากับ 1:5 ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย T4 DNA ligase 1 ยูนิต และ 5x Ligation buffer 4 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ข้ามคืน เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทรานสฟอร์มเมชันตามวิธีการข้อ 7.1.4

7.3 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อถ่ายยีน *egfp*

ตัดพลาสมิด pIJ8655 (ภาพที่ 3; Sun *et al.*, 1999) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* ด้วยวิธีการตามข้อ 7.2.2 นำไปแยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *egfp* ออกจากอะกาโรสเจลตามวิธีการในข้อ 7.2.1 จากนั้นจึงนำไปเชื่อมกับพลาสมิด pIJ10257 (ภาพที่ 4; ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบัน John Innes Centre, UK.) ที่ตัดด้วย *NdeI* และ *HindIII* เช่นเดียวกัน โดยใช้สภาวะในการเชื่อมดีเอ็นเอตามข้อ 7.2.2 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพิเทนเซลล์ของ *E. coli* XL1-blue ตามวิธีการในข้อ 7.1.3 และ 7.1.4 ตั้งชื่อพลาสมิดสายผสมที่สร้างขึ้นว่า pIJ10257*egfp*



ภาพที่ 3 แผนที่ของพลาสมิด pIJ8655 (Sun *et al.*, 1999)

เลี้ยงแอกติโนมัยสัเทอนโดไฟต์บนอาหารแข็ง MS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จนเจริญดี แล้วจึงเชื้อโคโลนีของแอกติโนมัยสัเทอนโดไฟต์ลงบนอาหารแข็ง MS ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ hygromycin B เพื่อเป็นตัวควบคุม และลงบนอาหาร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของแอกติโนมัยสัเท

8.1.2 การเตรียม *E. coli* เซลล์ผู้ให้ (donor)

ถ่ายพลาสมิด pIJ10257 จาก *E. coli* ET12567 (pUZ8002) โดยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันตามข้อ 7.1.4 แล้วในน้ำ *E. coli* ดังกล่าวเลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ hygromycin B (คัดเลือก pIJ10257) kanamycin (คัดเลือก *Tn9* ที่ทำให้ *E. coli* มีจีโนมไทป์เป็น *dam*) และ chloramphenicol (คัดเลือก pUZ8002) ความเข้มข้น ตามวิธีการข้อ 7.1.1 เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะเช่นเดิม แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม จนมีค่าดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 (OD₆₀₀) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 (ประมาณ 3 ชั่วโมง) นำเชื้อที่ได้ 5 มิลลิลิตร ไปล้างด้วยอาหาร LB ปริมาตรเท่ากัน 2 ครั้ง ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

8.1.3 การเตรียมแอกติโนมัยสัเทอนโดไฟต์ เซลล์ผู้รับ (recipient)

ชุดสปอร์และเส้นใยของแอกติโนมัยสัเทอนโดไฟต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ลงในอาหารเหลว ISP2 ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ที่ใส่ขวดคลดสปริง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อเป็นหัวเชื้อ จากนั้นจึงปลูกหัวเชื้อ ด้วยความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10% v/v ลงในอาหารเหลว ISP2 ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ที่ใส่ขวดคลดสปริง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์เมื่อมีอายุ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

8.1.4 การคอนจูเกชัน

ผสมผู้ให้และผู้รับอย่างละ 500 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แวนลอยตะกอนในอาหาร LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตามความ

เหมาะสมด้วยอาหาร LB ก่อนเกลี่ยของผสมลงบนจานอาหารแข็ง ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อจานอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

เมื่อส่งถ่ายพลาสมิดที่ด้านยาปฏิชีวนะ hygromycin B จะเททับจานอาหารที่บ่มแล้วด้วยสารละลาย 1 มิลลิตร ที่มี hygromycin B ปริมาณตามการศึกษาในข้อ 8.1.1 และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัม เพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่ได้รับพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (exconjugant) และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 3-5 วัน นำโคโลนีของเชื้อเจริญไปป้ายลงบนอาหารแข็ง MS ที่มียาปฏิชีวนะ hygromycin B และ nalidixic acid ความเข้มข้นตามตารางที่ 3 ซ้ำอีก 1-2 รอบ เพื่อตรวจสอบยืนยันผลการด้านยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดที่ได้รับรวมทั้งกำจัด *E. coli* ที่อาจหลงเหลืออยู่

8.1.5 การศึกษาผลอายุของเส้นใยและชนิดของอาหาร

ทำคอนจูแกนซ์ตามวิธีการในข้อ 8.1.4 ศึกษาผลของอายุของเส้นใยที่ใช้ต่อประสิทธิภาพของคอนจูแกนซ์ โดยใช้เส้นใยของแอกติโนมัยสีทในการทำคอนจูแกนซ์ แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิดเพื่อศึกษาผลของชนิดของอาหาร โดยใช้อาหารแข็ง MS ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ อาหารแข็ง ISP4 [1 L: 10 g soluble starch, 1 g KH_2PO_4 anhydrous, 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g $CaCO_3$, 1 ml trace element (1 L: 1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 20 g agar, pH 7.2; Shirling and Gottlieb, 1966] ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ และอาหารแข็ง tryptone soya agar (TSA; Oxoid) ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์

8.1.6 การคำนวณหาประสิทธิภาพของการเกิดคอนจูแกนซ์

คำนวณจากอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดกับจำนวนเซลล์ที่ใช้ทั้งหมด โดยนับโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดจากจานอาหารคัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนต์ และจำนวนเซลล์ที่ใช้ทั้งหมดคำนวณได้จากการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญ จากการเจือจางเส้นใยที่ใช้ในการทำคอนจูแกนซ์แล้วเกลี่ยลงบนอาหาร MS ISP4 หรือ TSA (Oxoid) ที่มี $MgCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

8.2 การถ่ายพลาสมิดสายผสมสู่แอคติโนมัยสีทโดยวิธีคอนจูกันต่างสกุล

ถ่ายพลาสมิดสายผสม pIJ10257*egfp* สู่แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์โดยวิธีคอนจูกันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ10257*egfp*) เป็นผู้ให้และสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์เป็นผู้รับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 8.1

8.3 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูกัน

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเอกซ์คอนจูกันตามวิธีการในข้อ 5.1 แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีน *egfp* โดยวิธีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 10257seqF (5'-ACGTCCATGCGAGTGTCC-3') และไพรเมอร์ 10257seqR (5'-CCAAACGGCATTGAGCGTC-3') (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบัน John Innes Centre, UK.) โดยใช้สารเคมีสภาวะในการทำพีซีอาร์ตามข้อ 5.3 และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ wild-type และพลาสมิด pIJ10257*egfp* เป็นตัวควบคุม

8.4 การตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ในเอกซ์คอนจูกัน

เลี้ยงเอกซ์คอนจูกันบนอาหารเหลว ISP2 ที่เติมยาปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นตามการศึกษาในข้อ 8.1.1 ในขวดรูปชมพู่ที่ใส่ขวดพลาสติก เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำเส้นใยที่เจริญในอาหารเหลวไปตรวจสอบภายใต้กล้อง fluorescent microscope (Olympus BX-51)

9. การปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์กลับสู่พืช

9.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อปลูกถ่ายเข้าสู่พืช

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหาร ISP2 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ส่วนเชื้อ *Rhizobium* sp. strain DASA36075 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ควบคุม เลี้ยงในอาหาร yeast extract manitol broth (YMB, 1L: 5 g manitol, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g NaCl, 0.5 g yeast extract) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน

9.2 การปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์กลับสู่พืช

การปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์กลับเข้าสู่พืช ร่วมกับจุลินทรีย์ไรโซเบียม ใช้วิธีการของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีการของ Somasegaran and Hoben (1994) โดยการนำเมล็ดกระถินณรงค์และ ถั่วเซอราด (Macrottilium atropureum) ซึ่งเป็นพืชควบคุม (ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร) แช่ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ด จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงแช่เมล็ดไว้ในน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายเมล็ดมาวางบนสำลีที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออยู่ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน จึงนำเมล็ดที่งอกแล้วมาวางบน plastic growth pouches ขนาด 5 x 8 นิ้ว (Somasegaran and Hoben, 1994) ที่มีสารละลาย N-free Nutrient (Broughton and Dillworth, 1971) แล้วหยดเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนรากของเมล็ดพืชแต่ละชนิด โดยแบ่งเป็นพืชแต่ละชนิดเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มแรกปลูกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่สองปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่สามปลูกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีท จากนั้นจึงนำพืชทั้งหมดที่อยู่ใน plastic growth pouches บ่มที่ห้องเพาะบ่มต้นกล้า อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ความสำเร็จในการปลูกเชื้อไรโซเบียมสามารถตรวจสอบได้โดยสังเกตจากการเกิดปมบริเวณรากพืช และเก็บส่วนของรากพืชทุกชนิดมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

10. การติดตามแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ภายในพืช

10.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากรากพืชที่ผ่านการปลูกเชื้อ

นำรากพืชที่ผ่านการปลูกเชื้อตามข้อ 9.2 มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการในข้อ 1.2 โดยการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจะใช้อาหาร SCA ที่เดิมยาปฏิชีวนะในข้อ 1.2 และอาหาร Yeast extract manitol agar (YMA, 1L: 5 g manitol, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g NaCl, 0.5 g yeast extract, 10 ml congo red, 15 g agar) สำหรับการคัดแยกไรโซเบียม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์ สังเกตโคโลนีของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทที่เจริญขึ้น

10.2 การตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ของแอดิโนไวรัสในเนื้อเยื่อพืช

นำรากพืชที่ผ่านการปลูกเชื้อตามข้อ 9.2 มาตัดตามยาวและขวางด้วย Cryo microtome (LEICA CM1800) ความหนาของเนื้อเยื่อ 20-25 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อรากไปศึกษาการเรืองแสงของ EGFP ภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000, Japan) ที่ศูนย์วิเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ โดยใช้ excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP และใช้ excitation wavelength 360-370 นาโนเมตร และ emission wavelength 420-460 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการเรืองแสง fluorescent ของเนื้อเยื่อพืช

10.3 การตรวจสอบการเจริญของแอดิโนไวรัสบริเวณผิวรากพืชโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตรวจสอบบริเวณผิวรากและปมรากของต้นอ่อนพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อในข้อ 9.2 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์กล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

11. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2549 - เมษายน 2553

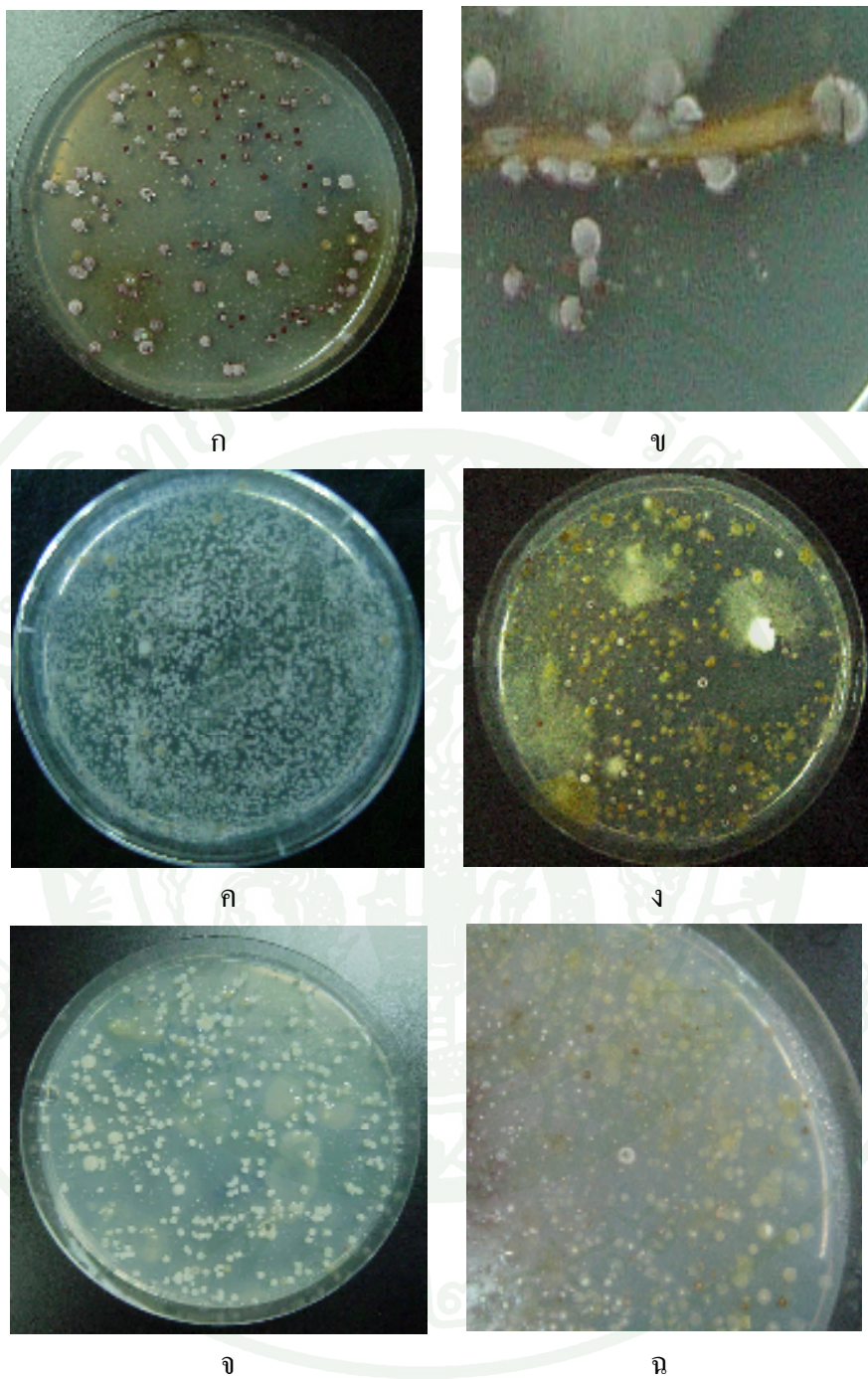
ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากกระถินณรงค์

เมื่อบ่มจานเพาะเชื้อที่วางรากกระถินณรงค์ที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว และจานเพาะเชื้อที่เคลือบด้วยสารละลาย $\frac{1}{4}$ Ringer จากการบดราก ของตัวอย่างรากที่เก็บจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เป็นเวลา 5-7 วัน พบโคโลนีแอกติโนมัยสีทหลากหลายชนิดในจานเพาะเชื้อที่เคลือบด้วย สารละลาย $\frac{1}{4}$ Ringer จากการบดราก (ภาพที่ 5 ก) นอกจากนี้ยังมีโคโลนีของแอกติโนมัยสีทเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อรากและบริเวณอาหารรอบๆ เนื้อเยื่อราก (ภาพที่ 5 ข) เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เช่น ลักษณะโคโลนี ลักษณะการสร้างสปอร์ และระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ (Goodfellow and Cross, 1984) คาดว่า แอกติโนมัยสีทดังกล่าวเป็นกลุ่ม *Streptomyces* ได้แก่ สายพันธุ์ GMKU 937, GMKU 940 จำนวน 1.77×10^2 C.F.U. ต่อ มิลลิตรต่อน้ำหนักพืชสดหนึ่งกรัม และ 1.96×10^2 C.F.U. ต่อ มิลลิตรต่อน้ำหนักพืชสดหนึ่งตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับ การคัดแยกจากรากกระถินณรงค์ที่เก็บจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร เมื่อบ่มจานเพาะเชื้อที่เคลือบสารละลาย $\frac{1}{4}$ Ringer จากการบดรากพบว่า ต้องใช้เวลาการบ่มมากกว่า 14 วัน จึงจะพบโคโลนีของแอกติโนมัยสีทเกิดขึ้น (ภาพที่ 5 ค) ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า เป็นแอกติโนมัยสีทในกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ซึ่งทำให้ต้องใช้เวลาในการเจริญนานกว่าสายพันธุ์ที่เป็น *Streptomyces* แอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ คือ GMKU931 ซึ่งพบเพียงชนิดเดียว มีปริมาณ 2.25×10^5 C.F.U. ต่อ มิลลิตรต่อน้ำหนักพืชสดหนึ่งกรัม ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากบริเวณอื่นๆ ทำให้คาดได้ว่า แอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ เป็นแอกติโนมัยสีทกลุ่มหลัก (majority) ที่อาศัยอยู่ในรากพืชบริเวณนี้ เมื่อตรวจจานเพาะเชื้อที่วางรากพืช พบว่า ไม่พบโคโลนีของแอกติโนมัยสีท เนื่องจากมีการเจริญของแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มคลุมบริเวณราก

ตัวอย่างรากที่เก็บจากบริเวณอื่นๆ คือ มหาวิทยาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นคนละบริเวณกับที่กล่าวข้างต้น สวนรถไฟ กรุงเทพมหานครและมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม พบว่า พบโคโลนีของแอกติโนมัยสีทซึ่งได้จากการบดราก อยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* และกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 5 ง จ และ ฉ ตามลำดับ) ซึ่งสามารถสรุปได้ ตามตารางที่ 3



ภาพที่ 5 แอคตินอมัยซีที่คัดแยกได้จากรากกระถินณรงค์ (ก) และ (ข) ม.เกษตรศาสตร์
กำแพงแสน (ค) และ (ง) ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน (จ) สวนรถไฟ (ฉ) ม.มหิดล ศาลายา

ตารางที่ 3 สายพันธุ์แอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากกระถินณรงค์

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะการแยกเชื้อ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซีท	C.F.U./ml/น้ำหนักพืช สด 1 กรัม
ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน (1)*	บดราก	GMKU 931	2.25×10^5
ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน (2)*	บดราก	GMKU 932	3.08
		GMKU 936	1.54×10
ม. เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน	วางราก, บดราก	GMKU 937	1.77×10^2
		GMKU 940	1.96×10^2
สวนรถไฟ กรุงเทพฯ	บดราก	GMKU 938	1.49×10^3
		GMKU 939	68
ม. มหิดล ศาลายา จ.นครปฐม	บดราก	GMKU 941	1.56×10^2
		GMKU 942	1.7×10^2
		GMKU 943	1.15×10^2
		GMKU 944	1.33×10^2

*หมายเหตุ ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน (1) และ (2) เก็บตัวอย่างคนละบริเวณ

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาเลี้ยงบนอาหาร MS จนเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า สามารถแยกแอคติโนมัยซีทจากรากของกระถินณรงค์ได้ทั้งหมดจำนวน 11 สายพันธุ์ โดยตั้งชื่อว่าสายพันธุ์ GMKU xxx ซึ่งยืมมาจาก Genetics-Microbiology Kasetsart University การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของรัชนี้ (2552) ซึ่งสามารถคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากรากของกระถินณรงค์ ที่เก็บจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และกำแพงแสน (แต่เป็นคนละบริเวณกับการศึกษาครั้งนี้) พบแอคติโนมัยซีททั้งหมด 10 สายพันธุ์ และการศึกษาของ Duangmal *et al.*, 2009 ซึ่งพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่จากกระถินณรงค์เช่นกัน คือ *Pseudonocardia acaciae* sp. nov.

การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากใบพืช พบว่า ไม่สามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้ เนื่องจากมีการเจริญของรา หรือแบคทีเรียชนิดอื่น หรือเนื่องจากแอคติโนมัยซีทบริเวณใบ อาจมีปริมาณน้อย เช่น การศึกษาของ Tian *et al.* (2004) ซึ่งแยกแอคติโนมัยซีทจากรากและใบของข้าวที่ปลูกในประเทศไทย พบว่า แอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากรากมีปริมาณและความหลากหลายสูงกว่าบริเวณใบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Indananda *et al.* (2009b) ซึ่งคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากใบและ

รากของพืชสมุนไพรในประเทศไทย 20 ชนิด พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวนทั้งหมด 59 สายพันธุ์ คัดแยกได้จากรากเป็นส่วนใหญ่ จำนวน 48 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 81 ส่วนแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากใบพบเพียง 11 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 19 จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ารากเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทสูง และคาดได้ว่าแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์เดิมน่าจะอยู่อาศัยบริเวณดินรอบรากพืช (rhizosphere) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทสูง แล้วจึงเข้าอยู่อาศัยในรากพืช (Sardi *et al.*, 1992)

การคัดแยกแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากรากพืชในทุกตัวอย่างมักพบแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะเมือกเยิ้ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของรัชนี (2552) ซึ่งคัดแยกแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากรากกระถินณรงค์และพืชตระกูลถั่วอื่นๆ เช่น กระถินบ้าน แคน จามจุรี ชงโค ทองหลาง นนทรี ประดู่ มะขาม มะขามเทศ ราชพฤกษ์ และหางนกยูง เป็นต้น ซึ่งจะพบแบคทีเรียลักษณะเมือกเยิ้ม ย้อมติดสีแกรมลบ และมีรูปร่างท่อน ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซเบียมซึ่งพบในปมรากพืชตระกูลถั่ว และยังพบการเจริญของรา ซึ่งจะทำให้การคัดแยกแอคติโนมัยสีททำได้ยาก เนื่องจากรามีการเจริญที่รวดเร็วกว่าแอคติโนมัยสีท (Cao *et al.*, 2004) โดยเฉพาะแอคติโนมัยสีทในสกุลที่ไม่ใช่ *Streptomyces* อาจจะต้องใช้เวลาในการบ่มงานเพาะเชื้อมากกว่า 14 วันขึ้นไป การเติมยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือ ampicillin และ penicillin G ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา คือ amphotericin B และ cyclohexamide พบว่าสามารถใช้คัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งอื่นๆ เช่น nalidixic acid (Cao *et al.*, 2004; Taechowisan *et al.*, 2003; Nimnoi *et al.*, 2009) ketoconazole (รัชนี, 2552) และ nystatin (Taechowisan *et al.*, 2003) พบว่า สามารถนำมาใช้คัดแยกแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา อาจส่งผลต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ได้ (Cao *et al.*, 2004a) การแช่ส่วนของตัวอย่างพืชในสารละลาย 10% (v/w) NaHCO_3 เป็นเวลา 10 นาที พบว่า สามารถลดอัตราการเจริญของราได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cao *et al.* (2004a) และ Tan *et al.* (2006) เนื่องจากการแช่ตัวอย่างพืช สารละลาย 10% (v/w) NaHCO_3 จะทำให้มีสภาพเป็นด่าง ซึ่งไม่เหมาะกับการเจริญของรา

การคัดแยกแอคติโนมัยสีทโดยใช้อาหาร SCA พบว่า สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งกลุ่มที่เป็น *Streptomyces* และ กลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของรัชนี (2552) Nimnoi *et al.* (2009) และ Indananda *et al.* (2009) นอกจากนี้อาจใช้อาหารอื่นๆ ในการคัดแยกแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ได้ เช่น ใช้อาหาร Humic acid vitamin agar (Nimnoi *et al.*, 2009) หรือ S medium (Tian *et al.*, 2004) การใช้อาหาร water agar (WA) ในการคัดแยกแอคติโนมัย-

สปีทอนโดไฟต์จากรากกระถินณรงค์ พบว่า ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากอาหารดังกล่าวขาด สารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของแอกติโนมัยสีท ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Castillo *et al.* (2002) ซึ่งสามารถคัดแยก *Streptomyces* จากลำต้นของ snakevine โดยใช้อาหาร WA ได้

เมื่อสังเกตงานเพาะเชื้อที่เปลี่ยนน้ำกลั่นที่ล้างรากครั้งสุดท้าย พบว่า ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดใดๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา และแอกติโนมัยสีท เจริญบนอาหาร แสดงว่าการใช้สารละลาย เอทานอล 95 % และสารละลาย 1% NaOCl มีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของพืช ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cao *et al.* (2004a) Tian *et al.* (2004) และ Nimnoi *et al.* (2009) โดยระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างพืชอาจจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับขนาดและสภาพของตัวอย่างพืช นอกจากนี้ การใช้เอทานอล 70% เพียงอย่างเดียว ก็พบว่า สามารถทำให้ผิวของตัวอย่างพืชปลอดเชื้อได้เช่นกัน (Ezra *et al.*, 2004)

2. การจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

2.1 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และการหาลำดับเบสบริเวณปลาย 5'

เมื่อใช้ไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR ในแอกติโนมัยสีททั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดสอดคล้องกับขนาดของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย (Lewin, 2000) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R ซึ่งออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน 16S rRNA ใน *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ (Kataoka *et al.*, 1997) สามารถนำมาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ในแอกติโนมัยสีทในกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ได้อีกด้วย

2.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 5' กับลำดับเบสของ type strain ในฐานข้อมูล

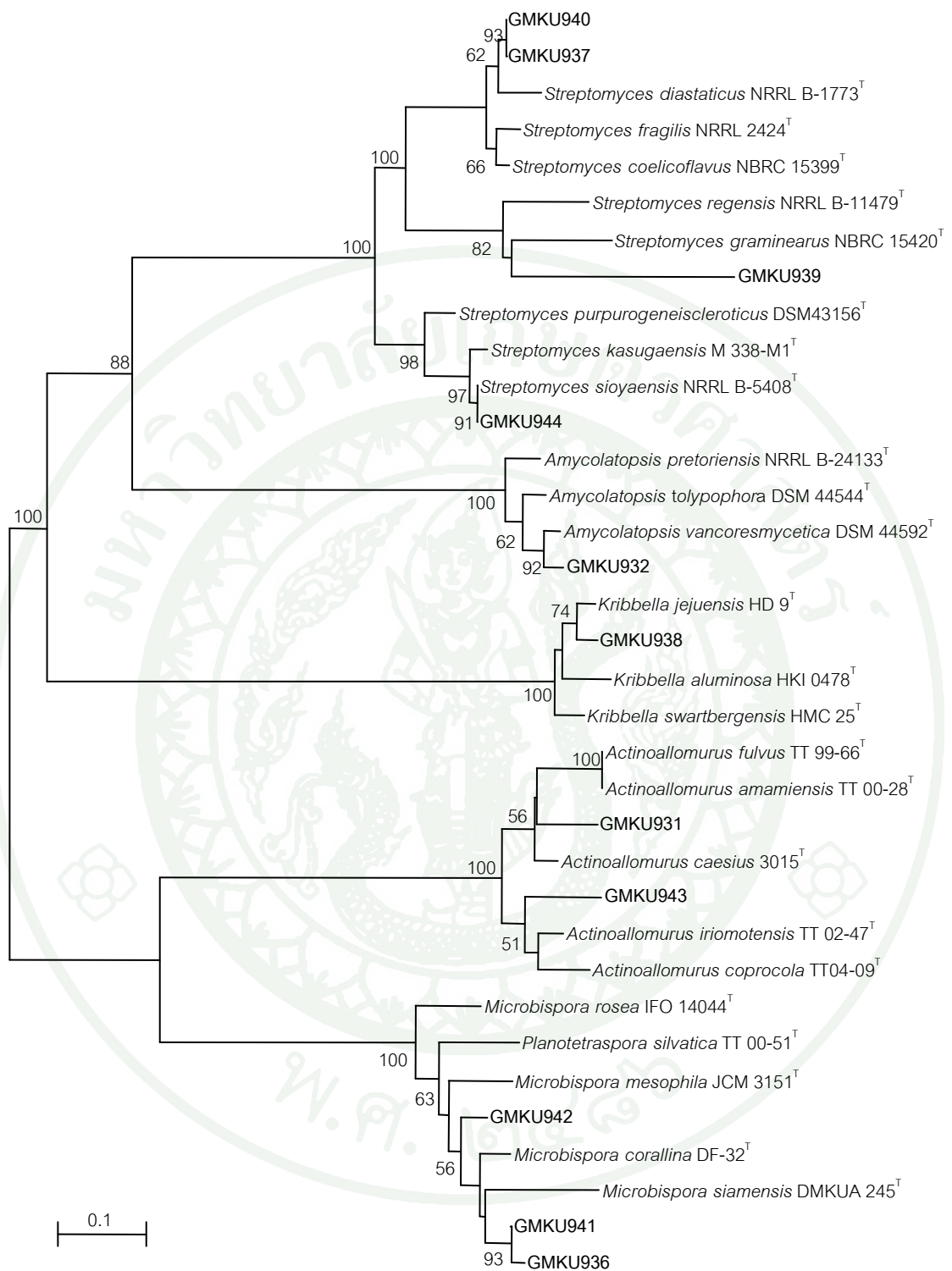
เมื่อนำขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ไปหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ STR1F พบว่า ได้ลำดับเบสประมาณ 600 คู่เบส (ภาคผนวก) เมื่อมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn ที่ www.ncbi.nih.gov/blast และโปรแกรม EzTaxon พบว่า แอกติโนมัยสีท 4 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Streptomyces* และ 7 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* หรือแอกติโนมัยสีทที่หายาก (rare actinomycete) ได้แก่ สกุล *Actinoallomurus* 2 สายพันธุ์ *Amycolatopsis* 1

สายพันธุ์ *Kribella* 1 สายพันธุ์ *Microbispora* 3 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสบริเวณปลาย 5' ของยีน 16S rDNA สามารถนำมาจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลหรือสปีชีส์ได้ เนื่องจากลำดับเบสบริเวณนี้มีบริเวณที่มีความแปรผันสูง หรือเรียกว่า บริเวณอัลฟา (Stackebrandt *et al.*, 1991) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tataoka *et al.* (1997) ซึ่งรายงานว่ ลำดับเบสบริเวณอัลฟาของยีน 16S rRNA สามารถนำมาใช้จำแนก *Streptomyces* ในระดับสปีชีส์ได้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างกับแอกติโนมัยสีทที่มีความคล้ายคลึงกันโดยการทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.83 โดยลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความคล้ายคลึงกับตัวอย่างนั้นสืบค้นจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 โดยคำนวณตามวิธี neighbor-joining ด้วยค่า bootstrap 1,000 ครั้ง พบว่ามีให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn และ EzTaxon

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA จากแอกติโนมัยสีทเอนโคไฟต์ 11 สายพันธุ์ กับลำดับเบสในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Eztaxon

สายพันธุ์	สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด (accession no.)	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
GMKU 931	<i>Actinoallomurus caesius</i> A3015 ^T (AB364589)	99
GMKU 932	<i>Amycolatopsis tolypomycina</i> DSM 44544 ^T (AJ508241)	99
GMKU 936	<i>Microbispora corallina</i> DF-32 ^T (AB018046)	97
GMKU 937	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (AB184650)	99
GMKU 940	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (AB184650)	99
GMKU 938	<i>Kribbella jejuensis</i> HD9 ^T (AY253866)	99
GMKU 939	<i>Streptomyces regensis</i> NRRL B-11479 ^T (DQ026649)	96
GMKU 941	<i>Microbispora mesophila</i> JCM 3151 ^T (AF002266)	98
GMKU 942	<i>Microbispora mesophila</i> JCM 3151 ^T (AF002266)	98
GKMU 943	<i>Actinoallomurus coprocola</i> TT04-09 ^T (AB364579)	99
GMKU 944	<i>Streptomyces sioyaensis</i> NRRL B-5408 ^T (DQ026654)	100



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของสายพันธุ์ทั้ง 11 สายพันธุ์ โดยคำนวณตามวิธี neighbor-joining ด้วยค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

2.3 การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA แบบสมบูรณ์

เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* คือ GMKU 931, GMKU 932 และ GMKU 943 มาหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ STR1F, STR1530R, ATT025 และ ATT026 นำลำดับเบสรวมโดยโปรแกรม CAP3 พบว่า สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งสี่ชนิดดังกล่าวในการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA แบบสมบูรณ์ได้ โดยไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R จะจำเพาะกับบริเวณปลาย 5' และ 3' ของยีนตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ ATT025 และ ATT026 จะจำเพาะกับบริเวณกลางยีน

เมื่อนำลำดับเบสแบบสมบูรณ์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ GMKU 931 (ภาคผนวก) มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแอกติโนมัยสีทที่มีความคล้ายคลึงกับตัวอย่างนั้น สืบค้นจากฐานข้อมูล GenBank โดยการทำการ multiple alignment และสร้าง phylogenetic tree พบว่า GMKU 931 มีการแยกตัวออกจากกลุ่ม *Actinoallomurus* อื่นๆ เมื่อนำไปศึกษาเพิ่มเติม เช่น ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และการเปรียบเทียบกับแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงด้วย DNA-DNA hybridization โดย Thamchaipenet *et al.* (2010) พบว่าเป็นแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ ให้ชื่อว่า *Actinoallomurus acaciae* sp. nov.

2.4 ความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์

จากการจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า แอกติโนมัยสีทที่คัดแยกจากพืชมีความหลากหลายสูง คือ พบทั้งกลุ่มที่เป็น *Streptomyces* และ กลุ่มแอกติโนมัยสีทที่หายาก ซึ่งแตกต่างกับความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทในแหล่งดิน ซึ่งจะพบ *Streptomyces* เป็นส่วนมาก (Williams *et al.*, 1989) การพบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ ซึ่งอยู่ในสกุล *Streptomyces* และสกุลที่หายาก สอดคล้องกับการศึกษาของรัชนี (2552) ซึ่งคัดแยกแอกติโนมัยสีทจากรากกระถินณรงค์ แล้วพบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Microbispora* เช่นเดียวกับการคัดแยกแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ในพืชอื่นๆ ก็พบแอกติโนมัยสีทสกุลที่หายากหลายสกุล เช่น ในข้าวสาลีที่ปลูกในประเทศออสเตรเลีย พบแอกติโนมัยสีทในสกุล *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Norcardioidies* (Coombs *et al.*, 2004) ถั่วที่ปลูกในประเทศจีน พบแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptoverticillium* และ *Streptosporangium* (Cao *et al.*, 2004) พืชสมุนไพรและไม้ยืนต้นที่ปลูกในประเทศไทย พบแอกติโนมัยสีทในสกุล *Microbispora*, *Nocardia* และ *Micromonospora* (Taechowisan *et al.*, 2003) เป็นต้น

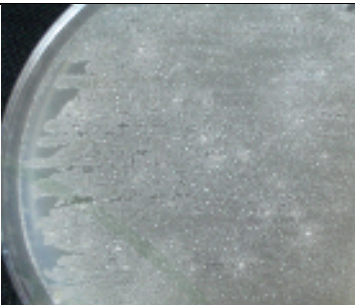
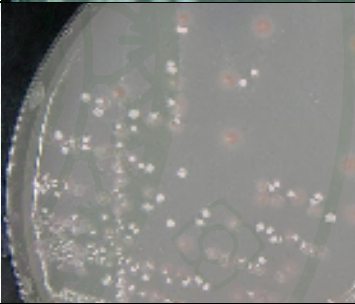
เมื่อเปรียบเทียบแอสโคไมซีตที่คัดแยกจากกระถินณรงค์ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ พบว่า ตัวอย่างที่เก็บจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน พบแอสโคไมซีตในสกุล *Actinoallomurus*, *Amycolatopsis* และ *Microbispora* ส่วนตัวอย่างที่เก็บในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พบแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* ตัวอย่างที่เก็บจากสวนรถไฟ พบแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* และ *Kribbella* และตัวอย่างที่เก็บจากมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา พบแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces*, *Actinoallomurus* และ *Microbispora* แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ของแอสโคไมซีตเอนโดไฟต์ไม่ได้จำเพาะกับพืช แต่ความหลากหลายจะขึ้นอยู่กับสภาพ ปริมาณแร่ธาตุ และความเป็นกรดด่างของดินโดยรอบที่พืชนั้นๆ เจริญขึ้น (Conn and Franco, 2004; Tian *et al.*, 2004) นอกจากนี้ปัจจัยทางชีวภาพอื่นๆ เช่น อายุของพืช, ชนิดของเนื้อเยื่อพืช และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างยังส่งผลต่อความหลากหลายของแอสโคไมซีตเอนโดไฟต์อีกด้วย (Araújo *et al.*, 2001; Adams and Klopper, 2002; Zinniel *et al.*, 2002)

แอสโคไมซีตสายพันธุ์ GMKU 931 พบว่า เป็นแอสโคไมซีตสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Duangmal *et al.* (2009) ซึ่งพบแอสโคไมซีตสายพันธุ์ใหม่ซึ่งคัดแยกจากกระถินณรงค์เช่นกัน คือ *Pseudonocardia acaciae* sp. nov. แสดงให้เห็นว่ากระถินณรงค์เป็นแหล่งค้นพบแอสโคไมซีตที่หายากและแอสโคไมซีตสายพันธุ์ใหม่อีกด้วย

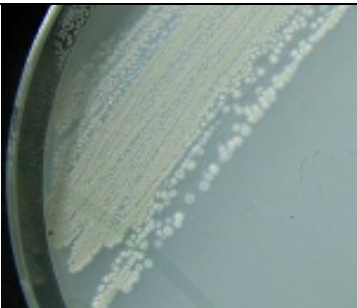
3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อศึกษาการสร้างสารสีเมลานิน บนอาหาร ISP7 พบว่า ไม่มีสายพันธุ์แอสโคไมซีตที่สามารถสร้างสารสีเมลานินได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ คือ ลักษณะโคโลนี สีของสปอร์ สีของเส้นใยอาหาร และสารสีที่ละลายน้ำ ของแอสโคไมซีตสายพันธุ์ต่างๆ แสดงในตารางที่ 5

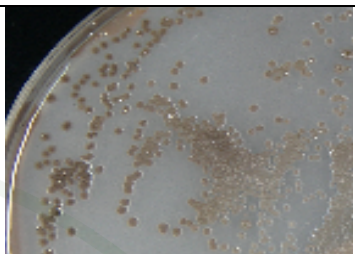
ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหาร ISP3		ลักษณะ
GMKU 931	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : เหลืองอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 932	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : ขาว	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 936	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : ส้ม	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 937	สปอร์ : เทา	เส้นใยอาหาร : แดง	
	สารสี : น้ำตาลแดง		
GMKU 938	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : เหลืองอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหาร ISP3		ลักษณะ
GMKU 939	สปอร์ : เทา	เส้นใยอาหาร : น้ำตาลอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 940	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : ชุ่มฉ่ำอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 941	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : น้ำตาลอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 942	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : น้ำตาลอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		
GMKU 943	สปอร์ : ขาว	เส้นใยอาหาร : เหลืองอ่อน	
	สารสี : ไม่สร้าง		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหาร ISP3	ลักษณะ
GMKU 944	สปอร์ : ไม่สร้าง เส้นใยอาหาร : น้ำตาล สารสี : น้ำตาลอ่อน	

4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

4.1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

เมื่อนำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ 11 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าให้ผลการยับยั้งทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) คือ สายพันธุ์ GMKU 932 สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ATCC11778 สายพันธุ์ GMKU 940 สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ คือ *B. cereus* ATCC11778 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *E. coli* ATCC8739 สายพันธุ์ GMKU 944 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778, *S. aureus* ATCC25923 และแบคทีเรียก่อโรคพืช *Ralstonia solanacearum* ซึ่งทำให้เกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ อย่างไรก็ตามแอคติโนมัยซีททั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืช คือ *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* และ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ได้

แอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ GMKU 932 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้เพียงชนิดเดียว GMKU 940 และ GMKU 944 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ แสดงว่าแอคติโนมัยซีทสองสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างสารเมแทบอลิไทต์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด และแต่ละชนิดมีกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกัน จึงมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด

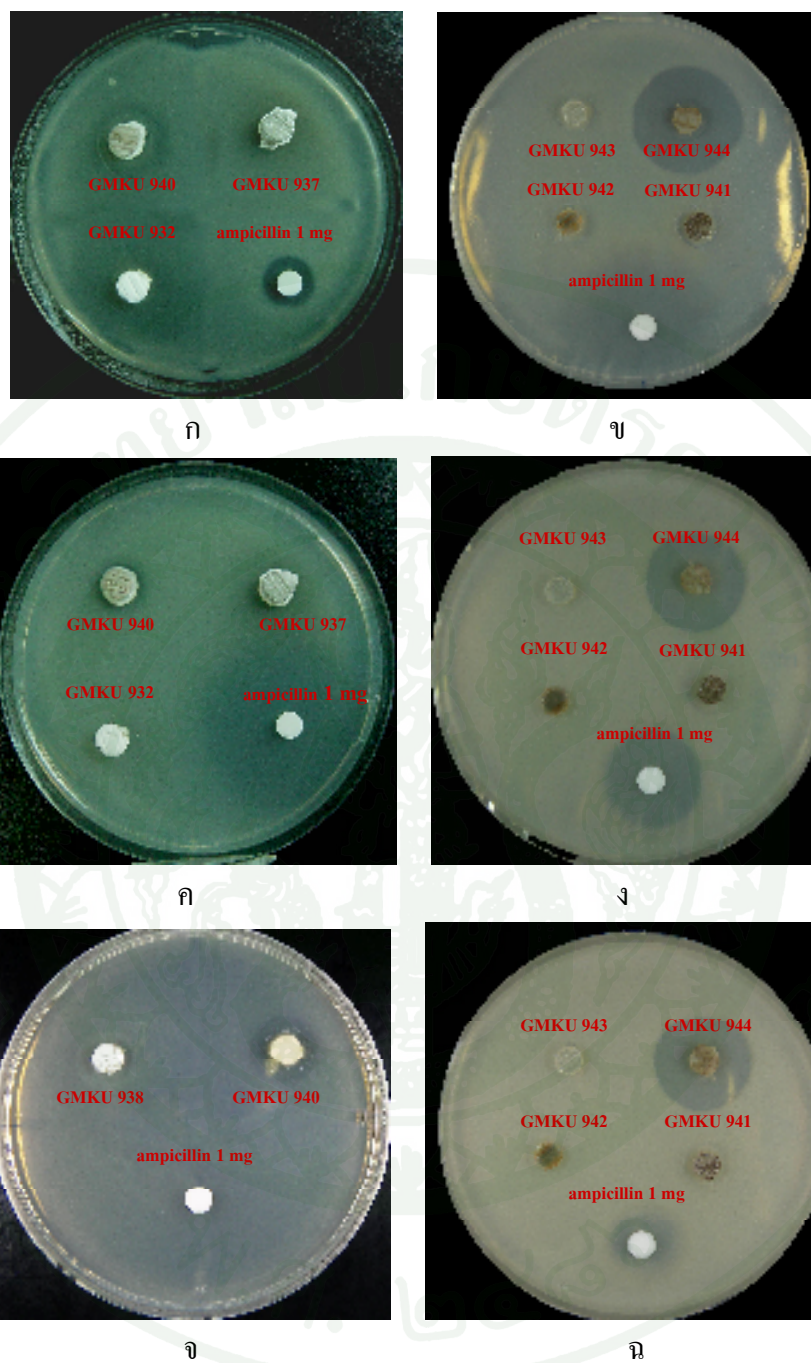
เมื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียทดสอบของแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร MS, ISP2 และ ISP3 พบว่า ชนิดของอาหารมีผลต่อการออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียทดสอบ เนื่องจาก ความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิไทต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แกลือและฟอสเฟตอนินทรีย์ สารตั้งต้น สารยับยั้ง เป็นต้น (Iwai and Omura, 1982)

นอกจากนี้องค์ประกอบของอาหารยังมีผลต่อความกว้างของวงใสในการทดสอบด้วย เช่น องค์ประกอบของอาหารที่มีแคลเซียม แมกนีเซียมและเหล็ก จะมีผลต่อฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline และ gentamicin เกลือโซเดียมคลอไรด์ มีผลลดการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside แต่เพิ่มประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะกลุ่ม fusidic acid ส่วนคาร์โบไฮเดรตจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะกลุ่ม nitrofurantoin และ ampicillin (Collins *et al.*, 1989)

4.2 ความสามารถในการยับยั้งราทดสอบ

จากผลการตรวจสอบเชื้อ จำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวน 4 สายพันธุ์ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบได้ คือ GMKU 937, GMKU 938, GMKU 940 และ GMKU 944 สามารถต้านเชื้อรา *A. niger* ได้ นอกจากนี้สายพันธุ์ GMKU 940 ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช คือ *Fusarium proliferatum* DOAC 0842 และ *Fusarium moniliforme* อย่างไรก็ตาม แอคติโนมัยสีททั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถยับยั้ง *Candida albicans*, *Heminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* ได้

แอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโรคพืชได้ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ (biolcontrol agent) ป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเกิดโรค รวมทั้งส่งเสริมการเจริญแก่ต้นพืช และเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีได้ เช่น มีรายงานว่า *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากรากมะเขือเทศ สามารถส่งเสริมการเจริญและช่วยให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *Rhizoctonia solani* ในมะเขือเทศได้ (Cao *et al.*, 2004) นอกจากนี้ *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 ที่แยกได้จากรากขิง สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในกล้วยและโรคเหี่ยวในข้าวสาลีได้ ตามลำดับ (Taechowisan and Lumyong *et al.*, 2003)



ภาพที่ 7 การทดสอบความสามารถของแอคติโนไมซีตในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

(ก) และ (ข) *Bacillus cereus* ATCC 11778

(ค) และ (ง) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

(จ) *Escherichia coli* ATCC 8739

(ฉ) *Ralstonia solanacearum*

5. การถ่ายยีน enhanced green fluorescent protein (*egfp*) สู่อะคิโนมัยซีทเอนโดไฟต์

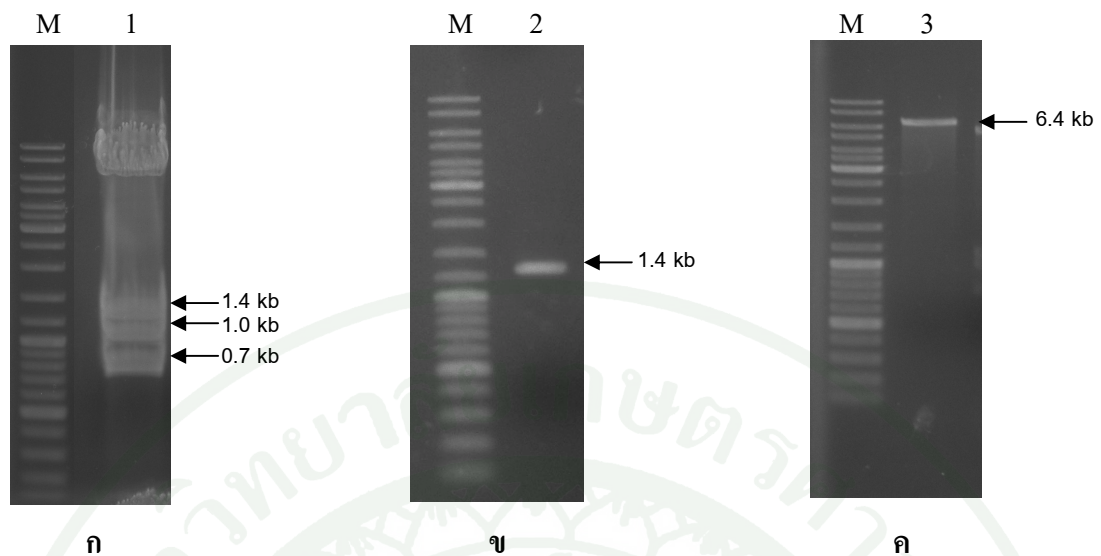
5.1 การสร้างพลาสมิด pIJ10257*egfp*

การติดตามความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยของอะคิโนมัยซีทเอนโดไฟต์ภายในเนื้อเยื่อพืชจากการเรืองแสงของโปรตีน enhanced green fluorescent (enhanced green fluorescent protein; EGFP) โดยการสร้างพลาสมิดสายผสมที่ประกอบด้วยยีน *egfp* จากพลาสมิด pIJ8655 (Sun *et al.*, 1999) เชื่อมเข้าหลังปลาย 3' ของ *ermE* promoter บนพลาสมิด pIJ10257 ซึ่งเป็น constitutive promoter ของ *Streptomyces* นอกจากนี้ pIJ10257 ยังมีคุณสมบัติเป็น conjugative vector ทำให้สามารถถ่ายเข้าสู่อะคิโนมัยซีทได้ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลได้

สกัดพลาสมิด pIJ8655 และ pIJ10257 ตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* จากนั้นจึงตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.7, 1.0 และ 1.4 กิโลเบส (ภาพที่ 8 ก) ตัดเจลบริเวณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นยีน *egfp* แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 8 ข)

เมื่อตัดพลาสมิด pIJ10257 ด้วยเอนไซม์สองชนิดข้างต้น จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.4 กิโลเบส (ภาพที่ 8 ค) จากนั้นจึงเชื่อมต่อดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบสที่ทำให้บริสุทธิ์ข้างต้นเข้ากับ pIJ10257 แล้วจึงนำพลาสมิดสายผสมทรานส์ฟอร์มเมชันสู่ *E. coli* XL-1blue ต่อไป

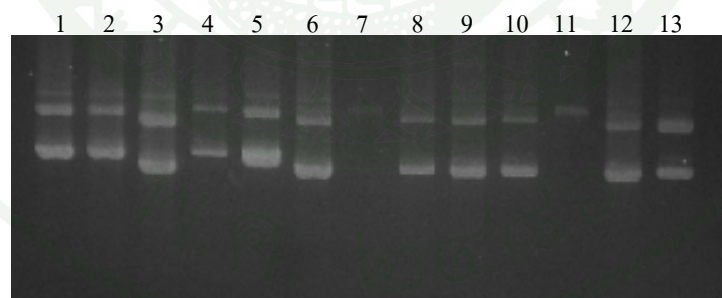
เมื่อนำทรานส์ฟอร์มเม้นต์มาตรวจสอบโดยการสกัดพลาสมิด แยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับพลาสมิด pIJ10257 (ภาพที่ 9) เลือกพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ pIJ10257 (ภาพที่ 9; หมายเลข 1 และ 2) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.4 และ 1.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pIJ10257 และยีน *egfp* ตามลำดับ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่า พลาสมิดที่ตรวจสอบเป็นพลาสมิดสายผสมที่ต้องการ ตั้งชื่อพลาสมิดสายผสมว่า pIJ10257*egfp*



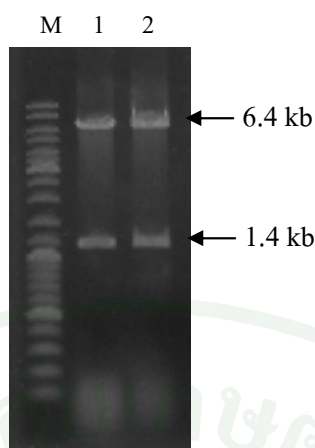
ภาพที่ 8 การสร้างพลาสมิด pIJ10257*egfp* โดยตัดชิ้นยีน *egfp* จาก pIJ8655 เพื่อนำมาเชื่อมกับ pIJ10257

- (ก) การตัดพลาสมิด pIJ8655 ด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* (ช่องที่ 1)
- (ข) การตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส จากภาพ ก แล้วทำให้บริสุทธิ์ (ช่องที่ 2)
- (ค) การตัดพลาสมิด pIJ10257 ด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII* (ช่องที่ 3)

M คือ 1 kb DNA ladder mix



ภาพที่ 9 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส; หมายเลข 1-12 คือ พลาสมิดที่สกัดจากโคลนของ *E. coli* หลังจากการทรานส์ฟอร์เมชัน; หมายเลข 13 คือ พลาสมิด pIJ10257



ภาพที่ 10 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pIJ10257egfp ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ; M คือ 1 kb DNA ladder mix; 1 และ 2 คือ พลาสมิดจากภาพที่ 9 หมายเลข 1 และ 2 ตามลำดับ ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *HindIII*

5.2 ประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุล

เมื่อศึกษาความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ hygromycin B ของ *Streptomyces* sp. GMKU 937 และ GMKU 944 พบว่า ปริมาณของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้คัดเลือก เอกซ์คอนจูแกนส์ คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 1000 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ ศึกษาประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ10257) เป็นผู้ให้ และ *Streptomyces* sp. GMKU 937 และ GMKU 944 เป็นผู้รับ โดยใช้เส้นใยสายพันธุ์ GMKU 937 และ GMKU 944 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 อายุ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำคอนจูเกชันแล้วจึงราดทับด้วย hygromycin B 1000 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ พบว่า สายพันธุ์ GMKU 937 ไม่สามารถเกิดคอนจูเกชันได้ ส่วนสายพันธุ์ GMKU 944 พบว่าการคอนจูเกชันบนอาหาร MS และ ISP4 ต้องบ่มจานเพาะเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังการราดด้วยยาปฏิชีวนะ จึงจะสามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเอกซ์คอนจูแกนส์ได้ สำหรับการทำคอนจูเกชันบนอาหาร TSA (Oxoid) ต้องบ่มจานเพาะเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วันหลังการราดด้วยยาปฏิชีวนะ จึงจะสามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเอกซ์คอนจูแกนส์ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ พบว่ามีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 10^{-3} ถึง 10^{-5} เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ (colony forming unit; CFU) (ตารางที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบอายุของเส้นใยพบว่า อายุเส้นใย 24 ชั่วโมงจะมีประสิทธิภาพการคอนจูเกชันสูงสุด คือ มีประสิทธิภาพอยู่ที่ 10^{-3} เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ และจะค่อยๆ ลดลง

เล็กน้อยเมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้เส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944 ประสบความสำเร็จ เนื่องจากสายพันธุ์ GMKU 944 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ MS, TSA (Oxoid) หรือ ISP 4 จะสร้างสปอร์น้อยหรือไม่สร้างเลย จึงไม่สามารถนำมาทำคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์เป็นผู้รับได้ การศึกษานี้สอดคล้องกับ Phornphisutthimas *et al.* (2010) ซึ่งประสบความสำเร็จในการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600) และ เส้นใยของ *S. rimosus* โดยพบว่ามีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 10^{-3} ถึง 10^{-7} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ ซึ่งผลดังกล่าวไม่แตกต่างกับการใช้สปอร์เป็นผู้รับ และพบว่า ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันจะลดลงเมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นอีกด้วย ผลการศึกษาดังกล่าวยังมีค่าใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการคอนจูเกชันโดยใช้เส้นใย *S. peucetius* ซึ่งให้ค่าอยู่ที่ 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (Paranthaman and Dharmalingum, 2003) ในขณะที่ *S. natalensis* ไม่สามารถเกิดคอนจูเกชันโดยใช้เส้นใยเป็นผู้รับได้ (Enriquez *et al.* 2006) เช่นเดียวกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ GMKU 937 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันด้วยวิธีดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Streptomyces* และลักษณะการกระจายของเส้นใยเมื่อเจริญในอาหารเหลว (Phornphisutthimas *et al.*, 2010)

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของอาหาร คือ MS, ISP4 และ TSA (Oxoid) ที่เติม $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า ประสิทธิภาพการคอนจูเกชันไม่แตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Phornphisutthimas *et al.* (2010) ที่พบว่า การคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้เส้นใยของ *S. rimosus* เป็นผู้รับ จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้อาหาร TSA (Oxoid) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร MS และ ISP4 ส่วนการการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้สปอร์ของ *S. ipomoeae* และ *Kitasatospora setae* เป็นผู้รับ ให้ประสิทธิภาพสูงสุดบนอาหาร ISP4 คือ 10^{-5} และ 10^{-8} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ ตามลำดับ (Guan and Pettis, 2009; Choi *et al.*, 2004) ซึ่งประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันบนอาหารชนิดต่างๆ อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Streptomyces* นั้นด้วย นอกจากนี้ การเติม $MgCl_2$ พบว่ายังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุลอีกด้วย แม้ว่าจะไม่ทราบกลไกการส่งเสริมอย่างแน่ชัดก็ตาม

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการคอนจูกันต่างสกลระหว่าง *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ10257) และเส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944 ที่อายุและอาหารต่างๆ

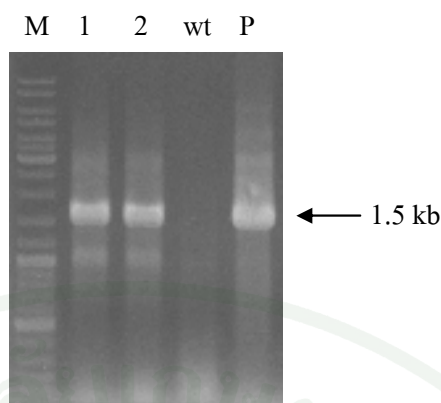
อายุของเส้นใย (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการคอนจูกัน		
	MS + 10 mM MgCl ₂	ISP4 + 10 mM MgCl ₂	TSA + 10 mM MgCl ₂
24	1.35×10^{-3}	2.18×10^{-3}	1.58×10^{-3}
36	2.17×10^{-3}	3.67×10^{-3}	3.40×10^{-3}
48	6.10×10^{-3}	3.66×10^{-4}	5.15×10^{-5}

5.3 การถ่ายพลาสมิด pIJ10267egfp สู่ *Streptomyces* โดยวิธีคอนจูกันต่างสกล

จากการทำคอนจูกันถ่ายพลาสมิด pIJ10257egfp สู่ *Streptomyces* สายพันธุ์ GMKU 944 โดยใช้เส้นใยอายุ 24 ชั่วโมง และทำคอนจูกันบนอาหาร MS ที่เติม MgCl₂ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ hygromycin B เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อในการคัดเลือก พบโคโลนีของเอ็กคอนจูกันเกิดขึ้นเมื่อบ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นจึงย้ายไปคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะ hygromycin B และกรดนาลิติซิก สำหรับในการใช้พลาสมิด pIJ10257egfp เพื่อถ่ายยีน egfp สู่ *Streptomyces* นั้น พลาสมิดจะเกิดการแทรกตัวแบบ site-specific recombination ของตำแหน่ง attachment site บนพลาสมิด (*attP*) กับตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซม โดยอาศัยเอนไซม์ integrase จากยีน *int* ของฟาจ ϕ C31 ซึ่งอยู่บนพลาสมิด pIJ10257 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.4 การตรวจสอบเอ็กคอนจูกัน

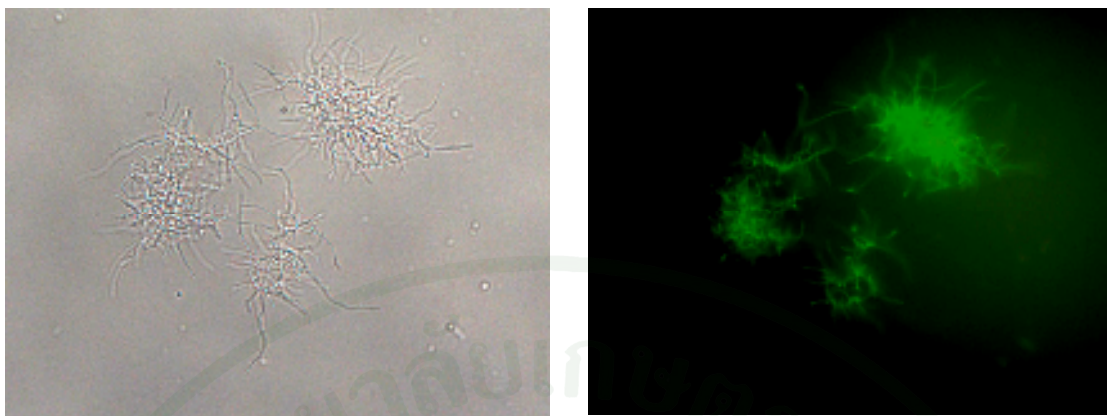
เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอเอ็กคอนจูกันไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 10257seqF และ 10257seqR ซึ่งจำเพาะกับบริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิด pIJ10257 ซึ่งพบว่าผลเป็นไปตามคาดหวัง คือ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นยีน *egfp* ที่เชื่อมอยู่ระหว่างบริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิด pIJ10257 เมื่อตรวจสอบพลาสมิด pIJ102657egfp ซึ่งเป็น positive control พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบสได้ ส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอของ GMKU 944 ที่ไม่มีพลาสมิดนั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวได้ (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่า เอ็กคอนจูกันดังกล่าวมีพลาสมิด pIJ10257egfp ไปแทรกจริงโดยตั้งชื่อว่าสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU944/egfp



ภาพที่ 11 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์ โดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 10257seqF และ 10257seqR; M คือ 1 kb DNA ladder mix; 1 และ 2 คือ เอกซ์คอนจูแกนส์ wt คือ สายพันธุ์ GMKU 944 ที่ไม่มีพลาสมิด P คือ พลาสมิด pIJ10257egfp

5.5 การตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ในเอกซ์คอนจูแกนส์

เมื่อเลี้ยงเอกซ์คอนจูแกนส์ในอาหารเหลว ISP2 ที่เติมยาปฏิชีวนะ hygromycin B แล้ว นำเส้นใยไปตรวจสอบภายใต้กล้อง fluorescent microscope พบว่า มีการเรืองแสงสีเขียวของ EGFP (ภาพที่ 12) แสดงให้เห็นว่า มีการแสดงออกของยีน *egfp* ใน *Streptomyces* sp. GMKU944 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sun *et al.* (1999) ซึ่งได้ถ่ายยีน *egfp* สู่ *S. coelicolor* A3(2) โดยวิธีคอนจูแกนส์ต่างสกุลแล้วพบว่า มีการแสดงออกของ *egfp* ใน *S. coelicolor* A3(2) แสดงให้เห็นว่ายีน *egfp* มีความเหมาะสมกับ *Streptomyces* ซึ่งแตกต่างกับยีน *gfp* ที่พบว่าไม่สามารถแสดงออกใน *Streptomyces* ได้เนื่องจากมี rare codon ของ *Streptomyces* (Leskiw *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน *egfp* ยังสามารถแสดงออกได้ใน *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆ ได้ เช่น *S. rimosus* R7 (Phomphisutthimas *et al.*, 2010) เป็นต้น การแสดงออกของยีน *egfp* บนพลาสมิด pIJ10257egfp นั้นถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *ermE* ซึ่งเป็น constitutive strong promoter ใน *Streptomyces* ทำให้ยีน *egfp* มีการแสดงออกตลอดเวลาโดยไม่ต้องอาศัยตัวกระตุ้น (inducer) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Coombs and Franco (2003) ซึ่งสร้างพลาสมิดเพื่อถ่ายยีน *egfp* สู่ *Streptomyces* โดยใช้โปรโมเตอร์ *ermE* เป็นตัวควบคุม พบว่า *Streptomyces* มีการแสดงออกของยีน *egfp* ตลอดเวลาโดยไม่ต้องอาศัยตัวกระตุ้นเช่นกัน



ภาพที่ 12 การตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ในเอกซ์คอนจูแกนต์

(ก) Bright field กำลังขยาย 500x

(ข) Blue light excitation โดยมี excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร กำลังขยาย 500x

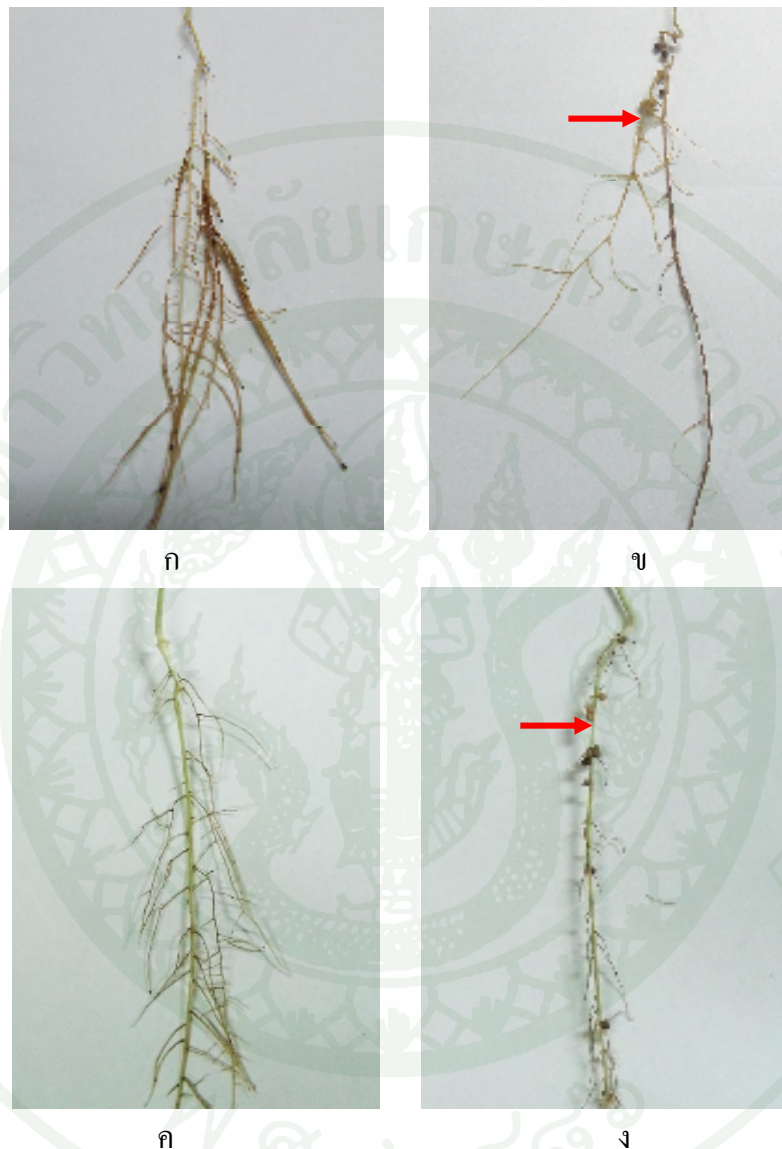
6. การติดตามแอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อพืช

6.1 การปลูกแอกติโนมัยสิทกลับสู่ต้นอ่อนกระถินณรงค์ร่วมกับจุลินทรีย์ไรโซเบียม

ปลูกเชื้อแอกติโนมัยสิทกลับสู่ต้นอ่อนกระถินณรงค์ โดยแบ่งเป็นพืชแต่ละชนิดเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มแรกปลูกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่สองปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่สามปลูกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* เมื่อปมพืชเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พืชที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ในทุกกลุ่มการทดลองมีลักษณะที่ปกติ และไม่มีการแสดงอาการของโรคพืชเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* ไม่ได้เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช เมื่อตรวจสอบการเกิดปมบริเวณรากพืช พบว่า กลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* เพียงอย่างเดียว ไม่มีการเกิดปมบริเวณรากพืช (ภาพที่ 13 ก และ ค ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างปมบริเวณรากพืชได้ ในขณะที่กลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียวหรือกลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับ *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* พบการสร้างปมบริเวณรากจำนวนมาก (ภาพที่ 13 ข และ ง ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปมที่เกิดขึ้นไม่ว่าจะปลูกไรโซเบียมเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ *Streptomyces* sp. GMKU 937 หรือ GMKU 944/*egfp* มีปริมาณและขนาดของปมใกล้เคียงกัน แสดงว่า *Streptomyces* sp. GMKU ทั้งสองไม่มีผลต่อการสร้างปมของกระถินณรงค์

เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากรากพืชที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU937 เพียงอย่างเดียว พบว่า สามารถคัดแยก *Streptomyces* sp. GMKU937 กลับออกมาได้ ทั้งในอาหาร SCA และ YMA (ภาพที่ 14 ก และ ข) ส่วนพืชที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 937 ร่วมกับไรโซเบียม พบว่า สามารถคัดแยก *Streptomyces* sp. GMKU937 ในอาหาร SCA และ YMA และพบโคโลนีของไรโซเบียมในอาหาร YMA (ภาพที่ 14 ค และ ง) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU937 เป็นเอนโดไฟต์ที่แท้จริงและยังสามารถอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มไรโซเบียมได้ ส่วนกลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว พบว่า ไม่สามารถคัดแยกแอกติโนมัยสิทได้ แสดงให้เห็นว่า แอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ที่พบในรากพืชไม่ได้อาศัยอยู่ในเมล็ดพืชตั้งแต่แรก แต่เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณดินรอบรากพืชแล้วจึงเข้าไปอยู่อาศัยในรากพืช ส่วนการคัดแยกรากพืชที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อกลับมาได้ เนื่องจากแอกติโนมัยสิทสายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีปริมาณน้อยในราก หรือเนื่องจากการ

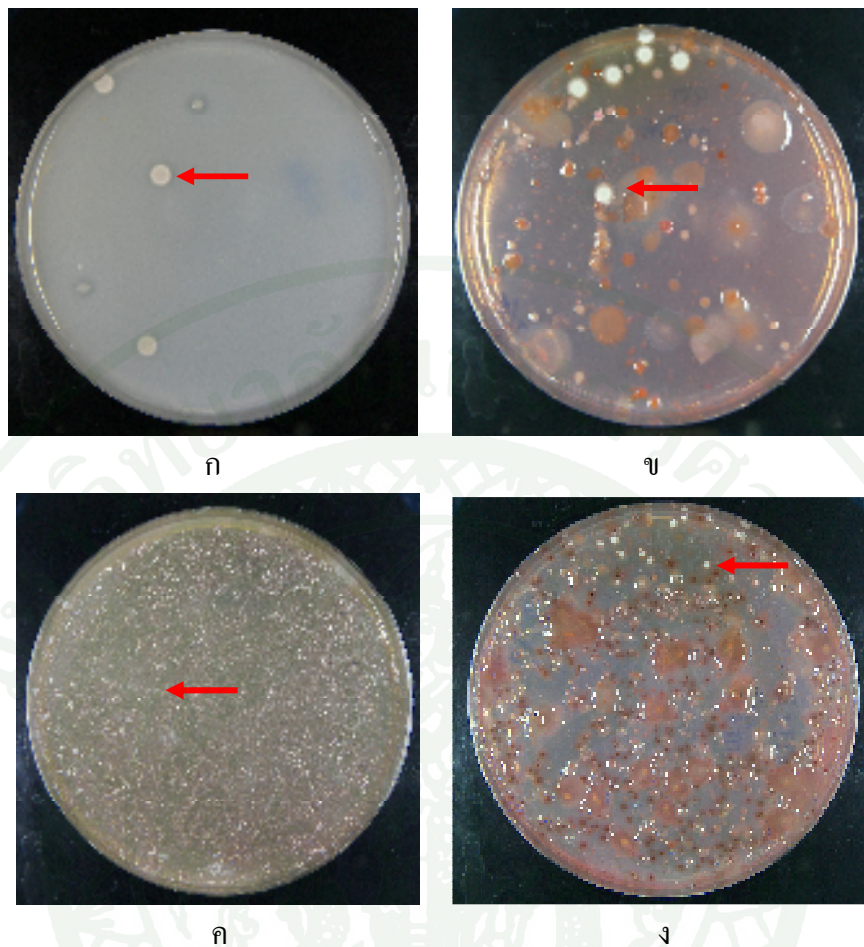
เจริญของไรโซเบียมซึ่งสามารถเจริญได้เร็วกว่า *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* จนเต็มจานเพาะเชื้อ จึงไม่สามารถตรวจพบ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* จากการแยกเชื้อบนอาหารได้



ภาพที่ 13 รากของกระถินณรงค์หลังจากการบ่มพืชในห้องเพาะบ่มดินกล้าเป็นเวลา 8 สัปดาห์

- (ก) รากกระถินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 เพียงอย่างเดียว
- (ข) รากกระถินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 ร่วมกับไรโซเบียม
- (ค) รากกระถินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* เพียงอย่างเดียว
- (ง) รากกระถินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ร่วมกับไรโซเบียม

หมายเหตุ ลูกศรชี้ คือ บริเวณที่เกิดปมราก



ภาพที่ 14 การแยกเชื้อจุลินทรีย์รากกระดินณรงค์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

- (ก) การแยกเชื้อจุลินทรีย์รากกระดินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 บนอาหาร SCA
- (ข) การแยกเชื้อจุลินทรีย์รากกระดินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 บนอาหาร YMA
- (ค) การแยกเชื้อจุลินทรีย์รากกระดินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 ร่วมกับไรโซเบียมบนอาหาร SCA
- (ง) การแยกเชื้อจุลินทรีย์รากกระดินณรงค์ที่ปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 937 ร่วมกับไรโซเบียมบนอาหาร YMA

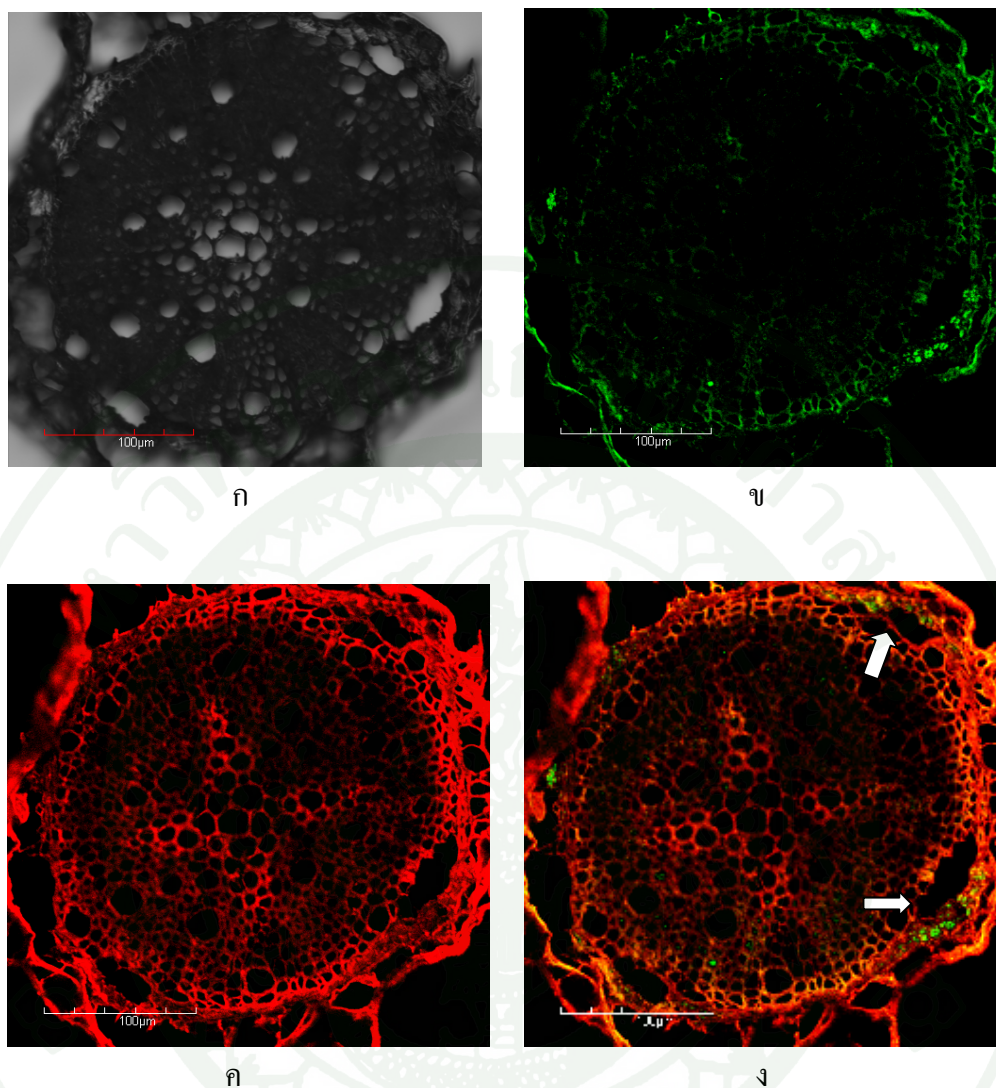
หมายเหตุ ลูกศรชี้ แสดงถึงโคโลนีของ *Streptomyces* sp. GMKU 937

6.2 การติดตามแอกติโนมัสมิทธิในเนื้อเยื่อพืชจากการเรืองแสงของ EGFP

ตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ใน *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope โดยใช้ excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร พบว่าเส้นใยของ GMKU 944/*egfp* มีการเรืองแสงสีเขียวของ EGFP และเมื่อใช้ excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร พบว่า เส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ไม่มีการเรืองแสง fluorescent สีแดง (ผลไม่ได้แสดง)

เมื่อนำรากของต้นอ่อนกระถินณรงค์ที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ไปตัดตามขวางให้มีความหนา 20-25 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อรากไปตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP ภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope โดยใช้ excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการเรืองแสงของ EGFP พบว่ามีการเรืองแสงสีเขียวทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณโครงสร้างของเซลล์พืช (ภาพที่ 15 ข) ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างของเซลล์พืชสามารถเรืองแสงได้ด้วยตัวเองอยู่แล้ว (autofluorescent) ซึ่งให้ผลที่แตกต่างจากการศึกษาของ Coombs and Franco (2003) ซึ่งรายงานว่เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อรากของข้าวสาลีด้วย confocal laser scanning microscope โดยใช้ความยาวคลื่นเท่ากัน พบว่า โครงสร้างรากของข้าวสาลีไม่มีการเรืองแสงสีเขียวเกิดขึ้น

เมื่อใช้ excitation wavelength 360-370 นาโนเมตร และ emission wavelength 420-460 นาโนเมตร พบว่า โครงสร้างพืชมีการเรืองแสงสีแดง (ภาพที่ 15 ค) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Coombs and Franco (2003b) ซึ่งรายงานว่เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อรากของข้าวสาลีด้วย confocal laser scanning microscope ด้วยความยาวคลื่นดังกล่าว พบว่า โครงสร้างพืชมีการเรืองแสงสีแดงเช่นกัน เมื่อนำภาพที่ได้จากการถ่ายด้วยความยาวคลื่นที่ต่างกันทั้งสองภาพดังกล่าวข้างต้นมาซ้อนกันโดยใช้โปรแกรม Olympus Fluoroview version 7.1b พบว่า มีกลุ่มเรืองแสงสีเขียวหลายกลุ่ม ที่ไม่มีการเรืองแสงสีแดง (ภาพที่ 15 ง) บริเวณดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่า น่าจะเป็นกลุ่มของเส้นใย *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ที่เจริญในเนื้อเยื่อพืช เนื่องจาก เส้นใย *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ไม่สามารถเรืองแสงสีแดงได้ โดยจะพบกลุ่มของเส้นใยกระจายบริเวณท่ออาหาร (phloem) โดยส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่ แอกติโนมัสมิทธิเอนโดไฟต์อยู่ร่วมอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช โดยได้รับสารอาหารจากพืช นอกจากนี้ยังสามารถกลุ่มเส้นใยที่เรืองแสงไม่มากนักได้บริเวณท่อน้ำที่ยังมีชีวิตอยู่ (xylem parenchyma) อีกด้วย (ภาพที่ 15 ง)



ภาพที่ 15 ภาพตัดขวางของรากกระถินณรงค์ภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope

(ก) Bright field

(ข) การตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียว ที่ excitation wavelength 465-496 นาโนเมตร และ emission wavelength 515-555 นาโนเมตร

(ค) การตรวจสอบการเรืองแสงสีแดง ที่ excitation wavelength 360-370 นาโนเมตร และ emission wavelength 420-460 นาโนเมตร

(ง) การซ้อนภาพ (ข) และ (ค)

หมายเหตุ บริเวณลูกศรชี้ คือ บริเวณที่คาดว่าจะเป็ *Streptomyces* sp. GMKU 944/egfp

เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อรากที่ตัดตามยาว พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกับรากพืชที่ตัดตามขวาง คือ โครงสร้างพืชมีการเรืองแสงสีแดงและสีเขียวได้ เมื่อนำภาพทั้งสองมาซ้อนกัน ไม่สามารถตรวจพบบริเวณที่คาดว่าจะเส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ได้

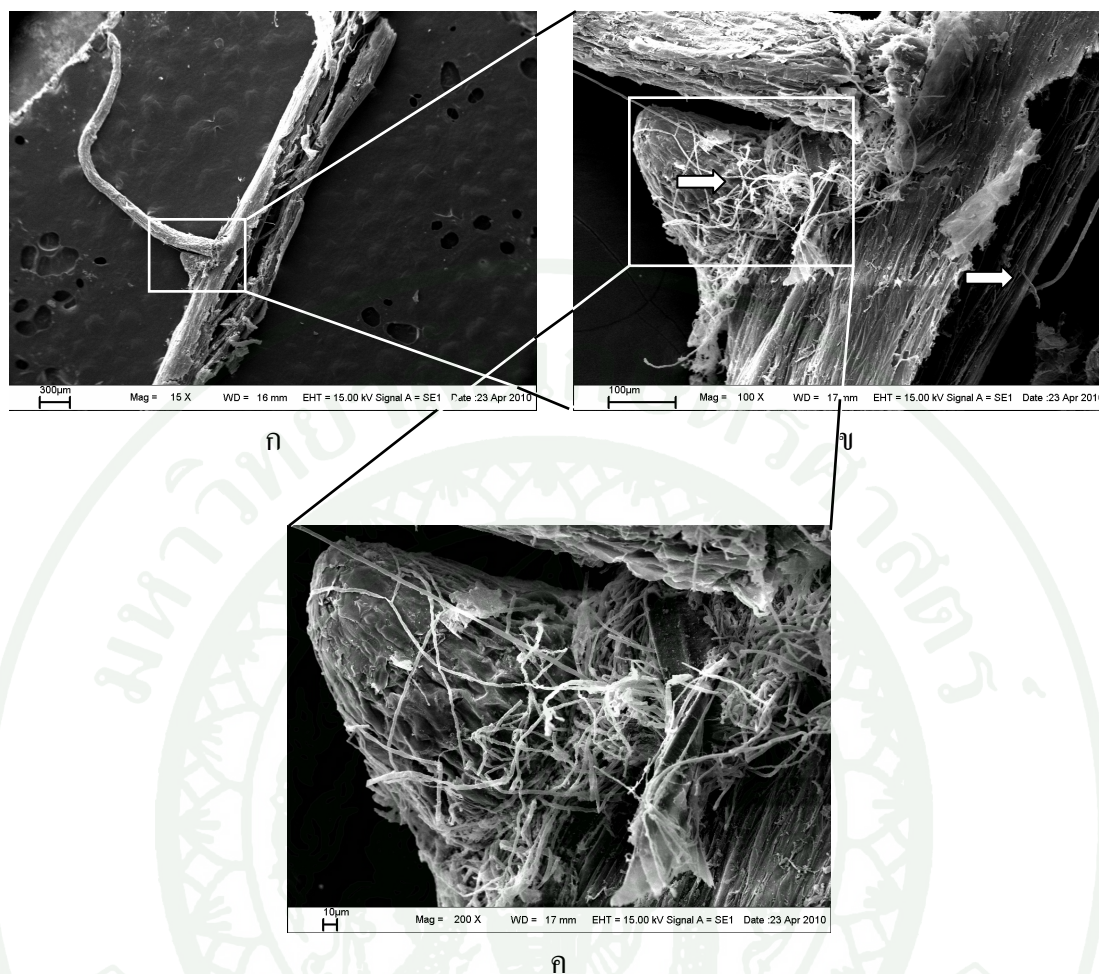
Coombs and Franco (2003) ได้ถ่ายยีน *egfp* สู่ *Streptomyces* ที่เป็นเอนโคไฟต์ในข้าวสาลี แล้วศึกษาการเจริญในต้นอ่อนข้าวสาลีโดยติดตามจากการเรืองแสงสีเขียวของ EGFP พบการเรืองแสงสีเขียวของ *Streptomyces* ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอ (plumule) อายุ 1 วัน โดยมีการเจริญของ *Streptomyces* ติดกับบริเวณผนังเซลล์ภายในเอ็มบริโอ เมื่อต้นอ่อนอายุ 3 วัน พบว่า มีการเรืองแสงสีเขียวภายในเอ็มบริโอมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า มีการเจริญของ *Streptomyces* นอกจากนี้ ยังพบการเจริญลักษณะเป็น microcolony บริเวณรากอ่อนอีกด้วย จากรายงานดังกล่าวแสดงว่า การใช้ EGFP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการติดตามแอกติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ในข้าวสาลีได้ อย่างไรก็ตาม โครงสร้างพืชหลายๆ ชนิด อาจพบการเรืองแสงสีเขียวด้วยตัวเองได้ ซึ่งจะเป็นอุปสรรคในการติดตามโดยใช้ EGFP ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *egfp* ในแอกติโนมัยซีทให้มากขึ้น เช่น การเพิ่มจำนวนชุดของยีน *egfp* ให้มีจำนวนชุดมากขึ้น เป็นต้น หรืออาจใช้โปรตีนเรืองแสงชนิดอื่น เช่น yellow fluorescent protein (YFP) และ enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) เป็นต้น (Stuurman *et al.*, 2000) นอกจากนี้ อาจใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) มาติดตามการเจริญของแอกติโนมัยซีทในพืชได้ เช่น Minamiyama *et al.* (2003) ติดตามการเข้าอยู่อาศัยของ *S. galbus* ในกุหลาบพันปี โดยใช้ SEM พบว่า สามารถตรวจพบเส้นใยของ *S. galbus* เข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อใบของกุหลาบพันปีผ่านทางปากใบได้ และ Suzuki *et al.* (2005) ได้ระบุตำแหน่งการเจริญของ *S. galbus* ในเนื้อเยื่อใบของกุหลาบพันปีโดยใช้ TEM ร่วมกับเทคนิค histochemistry ซึ่งพบเส้นใยของ *S. galbus* อยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space)

6.3 การตรวจสอบการเจริญของแอกติโนมัยซีทบริเวณผิวราก

เมื่อนำรากกระถินณรงค์ที่มีอายุ 2 เดือนหลังการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ไปตรวจสอบบริเวณผิวรากโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า บริเวณผิวรากมีเส้นใยของแอกติโนมัยซีทเจริญแบบชิดกับเนื้อเยื่อผิวราก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณระหว่างรากแขนงและรากแก้วจะพบเส้นใยของแอกติโนมัยซีทเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 16) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบบริเวณภายในเนื้อเยื่อรากที่แตกออกเนื่องจากการเตรียมตัวอย่าง ยังพบเส้น

ใยของแอคติโนมัยสีทเจริญภายในเนื้อเยื่อราก (ภาพที่ 16 ข) แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 944 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับกระถินณรงค์โดยสามารถเจริญได้ดีบริเวณผิวรากพืช และมีเส้นใยบางส่วนสามารถเจริญภายในเนื้อเยื่อพืชได้ โดยแอคติโนมัยสีทอาจได้รับประโยชน์จากพืชโดยได้รับน้ำ และย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วเพื่อเป็นแหล่งอาหาร หรือได้รับสารประกอบบางชนิดจากพืชซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท ในขณะที่ตรวจสอบผิวรากพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อใดๆ พบว่า ไม่มีเส้นใยของแอคติโนมัยสีทเจริญบริเวณผิวรากเลย (ภาพที่ 17) แสดงให้เห็นว่า เมล็ดพืชที่นำมาศึกษาไม่ได้มีแอคติโนมัยสีทอาศัยอยู่ และข้อมูลนี้ยังสนับสนุนสมมติฐานที่คาดว่าแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ไม่ได้ถ่ายทอดทางเมล็ด แต่น่าจะอยู่อาศัยในดินรอบรากมาก่อนซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทสูงแล้วจึงเข้าอยู่อาศัยในรากพืชและเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ต่อไป (Sardi *et al.*, 1992)

เมื่อตรวจสอบรากพืชที่ได้รับการปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ร่วมกับจุลินทรีย์ไรโซเบียม พบว่า มีการเจริญของเส้นใยแอคติโนมัยสีทบริเวณผิวรากเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 18) นอกจากนี้ยังพบเส้นใยแอคติโนมัยสีทจำนวนมากเจริญครอบคลุมบริเวณผิวของปมรากกระถินณรงค์อีกด้วย (ภาพที่ 16 ค) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tokala *et al.* (2002) เมื่อปลูกเชื้อ *S. lydicus* WYEC108 ซึ่งคัดแยกได้จากดินรอบรากร่วมกับไรโซเบียมในถั่วลิสงเตา แล้วนำรากและปมรากไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า มีเส้นใยของ *S. lydicus* WYEC108 เจริญอยู่บริเวณผิวรากโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณผิวของปมราก แสดงให้เห็นความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างแอคติโนมัยสีทบริเวณดินรอบรากและพืช นอกจากนี้ยังพบว่า ปมรากที่มีเส้นใยของ *S. lydicus* WYEC108 จะมีขนาดใหญ่กว่าและมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงกว่า พืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ *S. lydicus* WYEC108 ซึ่งคาดได้ว่า แอคติโนมัยสีทจากดินรอบรากน่าจะมีส่วนช่วยในการเข้าอยู่อาศัยและการเจริญของไรโซเบียมบริเวณรากพืช อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ยังไม่พบความแตกต่างของการเจริญของพืชและการสร้างปมรากพืชระหว่างกลุ่มที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว หรือกลุ่มที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับ *Streptomyces* sp. GMKU 944 สำหรับการติดตามการเจริญของเส้นใย *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ภายในปมรากนั้น อาจจะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



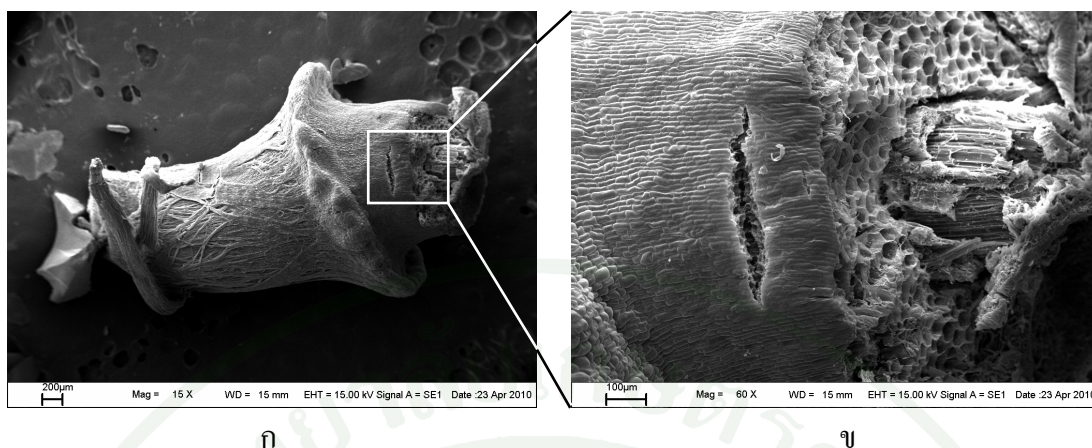
ภาพที่ 16 การตรวจสอบบริเวณผิวรากกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 944/egfp โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(ก) กำลังขยาย 15 เท่า

(ข) กำลังขยาย 100 เท่า

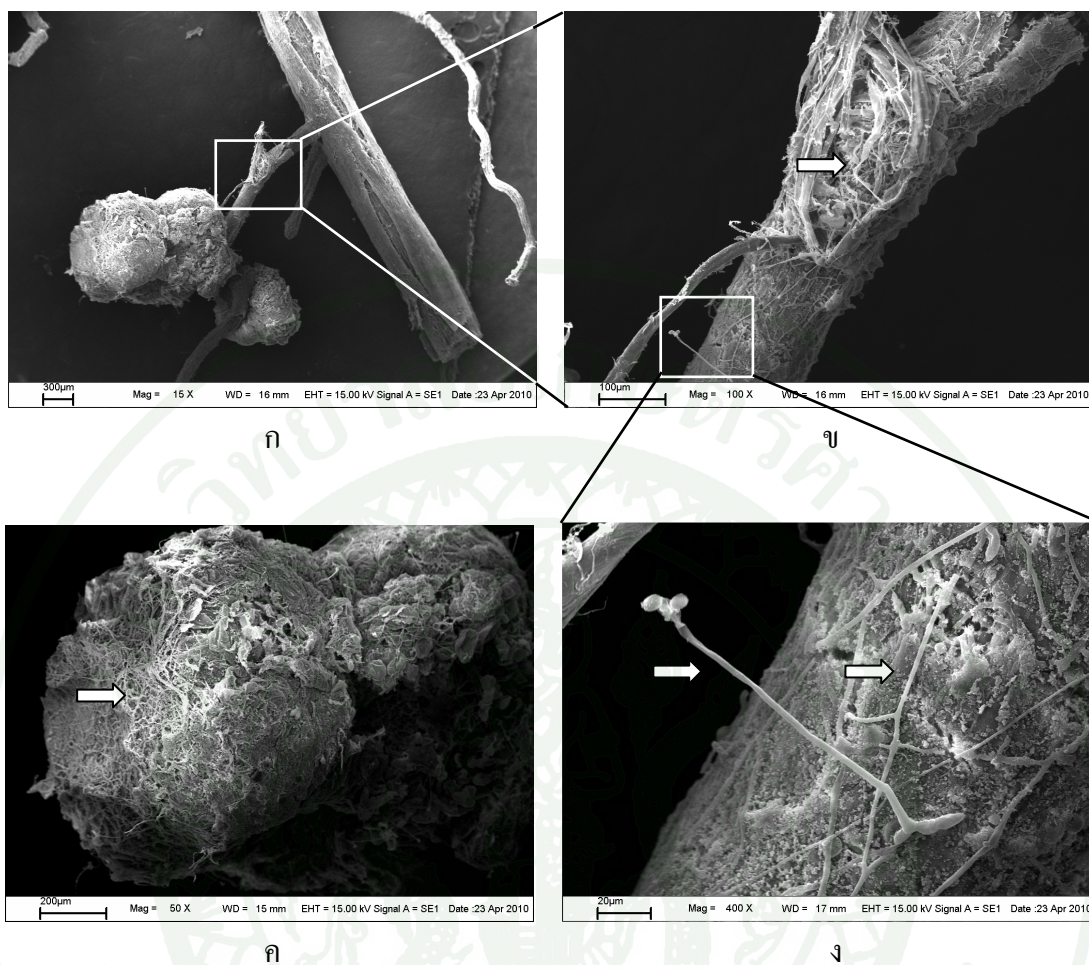
(ค) กำลังขยาย 200 เท่า

หมายเหตุ ลูกศรชี้ คือ เส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/egfp



ภาพที่ 17 การตรวจสอบบริเวณผิวหนังกระดิ่งที่ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อใดๆ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
(ก) กำลังขยาย 15 เท่า
(ข) กำลังขยาย 60 เท่า

กลไกการเข้าอยู่อาศัยของ GMKU 944/*egfp* ในรากของกระดิ่งนั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาโดยติดตามการเจริญของ GMKU 944/*egfp* โดยใช้ EGFP และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่า GMKU 944/*egfp* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชและสามารถเข้าอยู่อาศัยพืชได้ โดยการเข้าอยู่อาศัยเกิดจากการเลื้อยเข้าอยู่อาศัยบริเวณเนื้อเยื่อพืชที่อ่อนหรือเกิดบาดแผล (Tokala *et al.*, 2002) หรือแอคติโนมัย-ลิตอนโคไฟต์บางสายพันธุ์อาจสามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชแล้วจึงเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชต่อไป เช่น การติดตามการเข้าอยู่อาศัยของ *S. galbus* ในใบของกุหลาบพันปี พบว่า บริเวณผิวใบที่มีการเจริญของเส้นใย *S. galbus* จะมีชั้น wax บางกว่าผิวใบบริเวณอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า *S. galbus* น่าจะสามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายชั้น wax ให้บางลงเพื่อประโยชน์ในการเข้าอยู่อาศัยได้ (Suzuki *et al.*, 2005)



ภาพที่ 18 การตรวจสอบบริเวณปมและผิวรากกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูก *Streptomyces* sp.

GMKU 944/egfp ร่วมกับไรโซเบียม โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- (ก) รากกำลังขยาย 15 เท่า
- (ข) รากกำลังขยาย 100 เท่า
- (ค) ปมราก กำลังขยาย 50 เท่า
- (ง) รากกำลังขยาย 400 เท่า

หมายเหตุ ลูกศรชี้ คือ เส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/egfp

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแอสโคไมซีตจากพืชอาหารสัตว์จากกากของกระบวนการผลิตอาหาร starch casein agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin, penicillin G, amphotericin B และ cyclohexamide เพื่อยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นและเราพบว่าแอสโคไมซีตได้ทั้งสิ้น 11 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาลำดับเบสบริเวณส่วนปลาย 5' ของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank และสร้าง phylogenetic tree พบว่า มี 4 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Streptomyces* คือ สายพันธุ์ GMKU 937, GMKU 939, GMKU 940 และ GMKU 944 และอีก 7 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม rare actinomycete ได้แก่สกุล *Actinoallomurus* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GMKU 931 และ GMKU 943 *Amycolatopsis* 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GMKU 932 *Kribella* 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GMKU 938 และ *Microbispora* 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GMKU 936, GMKU 941 และ GMKU 942

เมื่อนำแอสโคไมซีต 11 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าให้ผลการยับยั้งทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GMKU 932 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 สายพันธุ์ GMKU 940 สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ คือ *B. cereus* ATCC11778, *S. aureus* ATCC25923 และ *E. coli* ATCC8739 สายพันธุ์ GMKU 944 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778, *S. aureus* ATCC25923 และแบคทีเรียก่อโรคพืช *R. solanacearum* เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา พบว่ามีแอสโคไมซีตจำนวน 4 สายพันธุ์ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบได้ คือ สายพันธุ์ GMKU 937, GMKU 938, GMKU 940 และ GMKU 944 โดยสามารถยับยั้ง *A. niger* ได้ นอกจากนี้สายพันธุ์ GMKU 940 ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช คือ *F. proliferatum* DOAC 0842 และ *F. moniliforme* ได้อีกด้วย

การศึกษากายภาพและสรีรวิทยาของเชื้อสายต่างสกุลโดยใช้เส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 937 และ GMKU 944 เป็นผู้รับ พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU 937 ไม่สามารถส่งถ่ายพลาสมิดด้วยวิธีดังกล่าวได้ ส่วน *Streptomyces* sp. GMKU 944 ให้ประสิทธิภาพในการเกิดคอนจูเกชันสูงสุดเมื่อใช้เส้นใยอายุ 24 ชั่วโมง โดยมีค่า 10^{-3} เอกซ์คอนจูเกนต์ต่อผู้รับ เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของอาหารพบว่า ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดคอนจูเกชัน เมื่อถ่ายยีน *egfp* สู่ *Streptomyces* sp. GMKU 944 โดยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลบนอาหาร MS ที่เติม $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เส้นใยอายุ 24 ชั่วโมง พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU 944 สามารถถ่ายยีนได้สำเร็จและมีการแสดงออกของ EGFP

เมื่อปลูกแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์สายพันธุ์ GMKU 937 และ สายพันธุ์กลายของ GMKU 944 ที่ได้รับการถ่ายยีน *egfp* สู่ต้นอ่อนกระถินณรงค์ร่วมกับไรโซเบียม พบว่า เมื่อพืชมีอายุสองเดือน สามารถตรวจพบการสร้างปมที่รากได้ แต่กระถินณรงค์ที่ปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพียงชนิดเดียว พบว่า ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างปมในรากพืชได้ และพบว่าการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทไม่ส่งผลต่อการเจริญของต้นอ่อนกระถินณรงค์ เมื่อนำรากดังกล่าวมาตัดแยกแอคติโนมัยซีทบนอาหาร พบว่า สามารถแยก *Streptomyces* sp. GMKU 937 ได้ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ GMKU 937 เป็นเอนโคไฟต์ที่แท้จริง แต่ไม่สามารถคัดแยก *Streptomyces* sp. GMKU 944 กลับมาได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำรากพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 944 ไปตัดตามขวางแล้วตรวจดูการเรืองแสงสีเขียวของ EGFP ด้วยกล้อง confocal laser scanning microscope พบว่า มีกลุ่มเรืองแสงสีเขียวในเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง บริเวณท่ออาหาร (phloem) และ ท่อน้ำ (xylem parenchyma) ซึ่งกลุ่มเรืองแสงดังกล่าว คือ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ที่อาศัยในโครงสร้างพืช เมื่อนำรากพืชดังกล่าวไปตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า บริเวณผิวรากมีการเจริญของเส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* จำนวนมาก นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบกระถินณรงค์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* ร่วมกับไรโซเบียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดก็พบเส้นใยของ *Streptomyces* sp. GMKU 944/*egfp* เจริญบริเวณผิวรากและผิวของปมรากจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 944 น่าจะเป็นเอนโคไฟต์ที่แท้จริงและมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับกระถินณรงค์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ทองพูล วรรณโพธิ์. 2545. ไม้ป่าเศรษฐกิจ. นาคาอินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ.

รัชนี้ มิ่งมา. 2552. แอคติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Adams, P.D. and J.W. Kloepper, 2002. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Soil**. 240: 181-189.

Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc., New York.

Araújo, W.L., W. Maccheroni, Jr, C.I. Aguilar-Vildoso, P.A.V. Barroso, H.O. Saridakis and J.L. Azevedo. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can. J. Microbiol**. 47: 229-236.

Azevedo, J.L., W. Maccheroni Jr., J.O. Pereira and W.L. Araujo. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron. J. Biotechnol**. 3: 40-62.

Baltz, R. H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. **Trends Microbiol**. 6: 76-83.

Bascom-Slack, C. A., C. Ma, E. Moore, B. Babbs, K. Fenn, J. S. Greene, B. D. Hann, J. Keehner, E. G. Kelley-Swift, V. Kembaiyan, S. J. Lee, P. Li, D. Y. Light, E. H. Lin, M. A. Schorn, D. Vekhter, L. Boulanger, W. M. Hess, P. N. Vargas, G. A. Strobel and S. A. Strobel. 2009. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. **Microb. Ecol**. 58: 374-383.

- Bierman, M., R. Logan, K.O' Brien, E. T. Seno., R. Nagaraja Rao. and B.E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. **Gene** 116: 43–49.
- Bogs, J., K. Richter, W. S. Kim, S. Jock and K. Geider. 2004. Alternative methods to describe virulence of *Erwinia amylovora* and host-plant resistance against fireblight. **Plant Pathology**. 53:80-89.
- Broughton, W.J. and M.J. Dillworth. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Bioch J**. 125: 1075-1080.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan and S. Zhou. 2004a. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Lett. Appl. Microbial**. 39: 425-430.
- Cao, L., Z. Qiu, X. Dai, H. Tan, Y. Lin and S. Zhou. 2004b. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 20: 501-504.
- Castillo, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M.A. Condrón, D.B. Teplow, D. Stevens, and D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology** 148: 2675-2685.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prashar. 1994. GFP as a marker for gene expression. **Science** 263: 802-805.
- Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 57: 2259-2261.

- Chung, C.T., S.L. Niemela and R.H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 86: 2172-2175.
- Collins, C. H., P. M. Lyne and J. M. Grange. 1989. **Collins and Lyne's Microbiological Methods**. Butterworth & Co (Publishers) Ltd, Oxford.
- Conn, V.M. and C.M.M. Franco. 2004. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 6407-6413.
- Coombs, J. T. and C. M. M. Franco. 2003a. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5603-5608.
- _____ and _____. 2003b. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 4260-4262.
- _____, P. P. Michelsen and C. M. M. Franco. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biol. Control.** 29: 359-366.
- Cormack, B.P., R.H Valdiva., and S. Falkow. 1996. FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene.** 173: 33-38.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., and M. A Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 3899-3905.
- Diouf, D., R. Duponnois, A.T. Ba, M. Neyra and D. Lesueur. 2005. Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. **Funct. Plant Biol.** 32: 1143-1152.

- Dorofeeva, L. V., V. I. Krausova, L. I. Evtushenko and J. M. Tiedje. 2003. *Agromyces albus* sp. nov., isolated from a plant (*Androsace* sp.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 1435-1438.
- Duangmal K., A. Thamchaipenet, I. Ara, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2008. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 2439-2442.
- Duangmal, K., A. Thamchaipenet, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2009. *Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59: 1487-1491.
- Duponnois, R. and A.M. Ba. 1999. Growth stimulation of *Acacia mangium* Willd by *Pisolithus* sp. in some Senegalese soils. **For. Ecol. Manage.** 199: 209-215. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- _____, H. Founoune, D. Lesueur, J. Thioulouse and M. Neyra. 2000. Ectomycorrhization of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in Glasshouse conditions: effect on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. **Aust. J. Ecp. Agr.** 40: 443-450.
- Duponnois, R. and C. Plenchette. 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. **Mycorrhiza.** 13: 85-91.
- Ezra D., U. F. Castillo, G. A. Strobel, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, M. A. M. Condrón, D. B. Teplow, J. Sears, M. Maranta, M. Hunter, B. Weber and D. Yaver. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology** 150: 785-793.

- Flett, F., V. Mersinias and C. P. Smith. 1997. Height efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. **FEMS Microbiol. Lett.** 155: 223-229.
- Fouces, R., M. Rodriguez, E. Mellado, B. Diez and, J.L. Barredo. 2000. Conjugation and transformation of *Streptomyces* species by tylosin resistance. **FEMS Microbiol. Lett.** 186: 319-325.
- Gage, D.J., T. Bobo and S.R. Long. 1996. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa (*Medicago sativa*). **J. Bacteriol.** 178: 7159-7166.
- Goodfellow, M. and T. Cross. 1984. Classification. In The biology of the Actinomycetes ed. Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S.T. Academic Press, London.
- _____, S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology.** Academic Press, London.
- Grall, S. and C. Manceau. 2003. Colonization of *Vitis vinifera* by a green fluorescence protein-labeled, *gfp*-marked strain of *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1904-1912.
- Gu, Q., H. Luo, W. Zheng, Z. Liu. and Y. Huang. 2006. *Pseudonocardia oroxyli* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from surface-sterilized *Oroxylum indicum* root. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2193-2197.
- Haas, J., E. Park and B. Seed. 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. **Curr. Biol.** 6: 315-324.
- Hallmann, J., A. Quadts-Hallmann, W.G. Miller, R.A. Sikora, and S.E. Lindow. 2001. Endophytic Colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. **Phytopathology.** 91: 415-422.

- Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interaction with host plants. **Actinomycetologica** 20: 72-81.
- Hasegawa, T., M. P. Lechevalier and H. A. Lechevalier. 1978. A new genus of the *Actinomycetales*, *Actinosynnema* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 28: 304-310.
- Heinzelmann, E., S. Berger, O. Puk, B. Reichenstein, W. Wohlleben and D. Schwartz. 2001. A glutamate mutase is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 447-457.
- Igarashi, Y., T. Iwashita, T. Fujita, H. Naoki, T. Yamakawa, R. Yoshida and T. Furumai. 2002. Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. II. Physico-chemical properties and structure determination. **J. Antibiot.** 56: 705-706.
- _____. 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. **Actinomycetologica** 18: 63-66.
- Indananda, C., A. Matsumoto, Y. Inahashi, Y. Takahashi, K. Duangmal and A. Thamchaipenet. 2009a. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pseudonocardiaceae* isolated from roots of Thai glutinous rice plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 1141 - 1146.
- Indananda, C., K. Duangmal, S. Peyachokanagul and A. Thamchaipenet. 2009b. Endophytic actinomycetes isolated from Thai medicinal plants as producer of antimicrobial and plant growth promoting agents. Proceeding of 35th Congress on Science and Technology of Thailand.

Indananda, C., A. Thamchaipenet, A. Matsumoto, K. Duangmal and Y. Takahashi. 2010.

Actinoallomurus oryzae sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from root of Thai jasmine rice plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** (in press) doi: 10.1099/ijs.0.022509-0.

Iwai, Y. and S. Omura. 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. **J. Antibiot.** 35: 123-141.

Kataoka, M., K. Ueda, T. Kudo, T. Seki and T. Yoshida. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiol. Lett.** 151: 249-255.

Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood. 2000. **Practical Streptomyces Genetics**. The John Innes Foundation, Norwich.

Kitani, S., M.J. Bibb, T. Nihira and Y. Yamada. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. **J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 535-538.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform.** 5: 150-163

Küster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature** 202: 928-929.

Lagopodi, A. L., A. F. J. Ram, G. E. M. Lamers, P. J. Punt, C. A. M. J. J. Van den Hondel, B. J. J. Lugtenberg and G.V. Bloemberg. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Mol. Plant Microbe Interact.** 15: 172-179.

- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier, 1970. **The Actinomycetales**. Gustav Fischer Publication, Jenua.
- Leskiw, B., M.J. Bibb and K.F. Chater. 1991. The use of a rare codon specifically during development. **Mol. Microbiol.** 5: 2861-2867.
- Lewin, B. 2000. **Gene VII**. Oxford University Press, Inc., New York.
- Liu, X., H. Zhao and S. Chen. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Curr. Microbiol.** 52: 186-190.
- Masakazu, E., T. Seki, K. Ueda, T. Kudo and T. Yoshida. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in genus *Streptomyces*. **FEM Microbiol. Lett.** 151: 249-255.
- Matsushima, P., M. C. Broughton, J. R. Turner and R. H. Baltz. 1994. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. **Gene** 146, 39-45.
- Mazodier, P., R. Petter and C. Thompson. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. **J. Bacteriol.** 171: 3583-3585.
- Meguro, A., Y. Ohmura, S. Hasegawa, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. **Actinomycetologica** 20: 1-9.
- Minamiyama, H., M. Shizumi, T. Furamai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh. 2003. Mutipication of isolate R-5 *Streptomyces galbus* on rhodendron leaves and its production of cell wall degradaing enzymes. **J. Gen. Plant Pathol.** 69: 65-70.

- Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2009. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 193-203.
- Okazaki, T. 2006. Intrigued by actinomycete diversity. **Actinomycetologica.** 20: 15-22.
- Pernodet, L.L., F. Boccard, M.T. Alegre, J. Gagnat and M. Guerinéau. 1989. Organization and nucleotide sequences analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *S. ambofaciens*. **Gene** 79: 33-46.
- Phornphisutthimas, S., N. Sudtachat, C. Bunyoo, P. Chotewutmontri, B. Panijpan and A. Thamchaipenet. 2010. Development of an intergeneric conjugal transfer system for rimocidin-producing *Streptomyces rimosus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 50: 530–536.
- Pullen, C., P. Schmitz, K. Meurer, D.D.V. Bamberg, S. Lohmann, S.D.C. Franca, I. Groth, B. Schlegel, U. Mollmann, F. Gollmick, U. Grafe and E. Leistner. 2002. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta** 216: 162-167.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sardi, P., M. Saracchi, S. Quaroni, B. Petrolini, E. Borgonovi and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2691-2693.
- Seghers, D., L. Wittebolle, E. M. Top and W. Verstraete. 2004. Impact of agricultural practices on *Zea mays* L. endophytic community. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 1475-1482.

- Sessitsch, A., G. Hardarson, W.M. de Vos and K.J. Wilson. 1998. Use of marker genes in competition studies *Rhizobium*. **Plant Soil**. 204: 35-45.
- Sharma, P. K., S. Sarita and J. Prell. 2005. Isolation and characterization of an endophytic bacterium related to *Rhizobium/Agrobacterium* from wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Curr. Sci.** 89: 608-610.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 16: 313-340.
- Sia, L.A., D.M. Kuehner and D.H. Figurski. 1996. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of conjugative plasmid is required. **J. Bacteriol.** 178: 1457-1464.
- Smith, G. E. 1957. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* by a species of *Micromonospora* isolated from tomato. **Phytopathology** 47: 429-432.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. **Method in legume rhizobium technology**. Springer-Verlag, New york.
- Song, J., B-Y. Kim, S-B. Hong, H-S. Cho, K. Sohn, J. Chun and J-W. Suh. 2004. *Kribbella solani* sp. nov. and *Kribbella jejuensis* sp. nov., isolated from potato tuber and soil in Jeju, Korea. **Int. j. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1345-1348.
- Stackebrandt, E., D. Witt, C. Kemmerling, R. Kroppenstedt and W. Liesack. 1991. Designation of Streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1468-1477.
- _____ and F. Rainey. 1997. Proposal for new hierachic classification system, actinobacteria classis nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 479-491.

- Stegmann, E., S. Pelzer, K. Wilken and W. Wohlleben. 2001. Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer. **J. Biotechnol.** 92: 195-204.
- Stinchi, S., S. Azimonti, S. Donadio, and M. Sosio. 2003. A gene transfer system for the glycopeptide producer *Nonomuraea* sp. ATCC39727. **FEMS Microbiol. Lett.** 225: 53-57.
- Strobel, G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect.** 5: 535-544.
- Stuurman, N., C. P. Bras, H. R. M. Schlaman and A. H. M. Wijnjes. 2000. Use of green fluorescent protein variants expressed on stable broad host range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Mol. Plant-Microbe interact.** 13: 1163-1169.
- Sun, J., G.H. Kelemen, J.M. Fernandez-Abalos and M.J. Bibb. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology** 145: 2221-2227.
- Suzuki, T. M. Shimizu, A. Meguro, S. Hasegawa, T. Nishimura and H. Kunoh. 2005. Visualization of infection of an endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissuecultured rhododendron. **Actinomycetologica** 19: 7-12.
- Taechowisan, T. and S. Lumyong. 2003. Activity of endophytic actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galanga* against phytopathogenic fungi. **Ann. Microbiol.** 53: 291-298.
- _____, J. F. Peberdy and S. Lumyong. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 19: 381-385.

- Takahashi, Y. and S. Omura. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compound. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 49: 145-154.
- Tan, H.M., L. X. Cao, Z. F. He, G. J. Su, B. Lin and S. N. Zhou. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 1275-1280.
- Thamchaipenat, A., C. Indananda, C. Bunyoo, K. Duangmal, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 554-559.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Tian, X. L., L. X. Cao, H. M. Tan, Q. G. Zeng, Y. Y. Jia, W. Q. Han and S. N. Zhou. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 303-309.
- 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.
- Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin and P. Courvalin. 1987. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram positive bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.** 48: 289-294.
- Trujillo, M. E., R. M. Kroppenstedt, C. Ferná'ndez-Molinero, P. Schumann and E. Marti'nez-Molina. 2007. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2799-2804.

- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. **Annu. Rev. Genet.** 67 :509-544.
- Verma, S.C., A. Singh, S.P. Chowdhury and A.K. Tripathi. 2004. Endophytic colonization ability of two deep water rice endophytes, *Pantoea sp.* and *Ochrobactrum sp.* using green fluorescent protein reporter. **Biotechnol. Lett.** 26: 425-429.
- Vobis, G. 1997. Morphology of actinomycetes, pp. 180-191. **Atlas of Actinomycetes.** Asakura Publishing, Japan.
- Williams, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt, J. G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Zinniel, D.K., P. Lambrecht, N.B.Harris, Z. Feng, D. Kuczmariski, P. Higley, C.A. Ishimaru, A. Arunakumari, R.G. Barletta and A.K. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2198-2208.



ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย

GMKU 931 complete sequence 1362 bp

```

1   GCAAGTCGAG CGGAAAGGCC CTTGCGGGTA CTCGAGCGGC GAACGGGTGA
51  GTAACACGTG AGTAACCTGC CCTTGGCTCT GGGATAAGCC CGGGAAACTG
101 GGTCTAATAC CGGATATGAC CACTGGACGC ATGTTCTTGG TGGTGGAAAG
151 TTTTTCGGCT GGGGATGGAC TCGCGGTCTA TCAGCTTGTT GGTGGGGTGA
201 TGGCCTACCA AGGCGACGAC GGATAGCCGG CCTGAGAGGG TGACCGGCCA
251 CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA
301 ATATTGCGCA ATGGGCGGAA GCCTGACGCA GCGACGCCGC GTGGGGGATG
351 AAGGCCTTCG GGTTGTAAAC CTCTTTCACC ACCGACGAAG CTAACGTGAC
401 GGTAGGTGGG GAAGAAGCGC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
451 TACGTAGGGC GCAAGCGTTG TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGAGCTCGTA
501 GGTGGTTTGT CGCGTCTGCC GTGAAAACCC GAGGCTTAAC CTCGGGCTGG
551 CGGTGGATAC GGGCAGACTA GAGGTAGGTA GGGGAGAACG GAATTCCCGG
601 TGTAGCGGTG AAATGCGCAG ATATCGGGAG GAACACCGGT GCGAAGGCG
651 GTTCTCTGGG CCTTACCTGA CGCTGAGGAG CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC
701 AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGTTGGG CGCTAGGTGT
751 GGGGTCTTTC CACGGACTCC GTGCCGGAGC TAACGCATTA AGCGCCCCGC
801 CTGGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC
851 CGCACAAGCG GCGGAGCATG TTGCTTAATT CGACGCAACG CGAAGAACCT
901 TACCAAGGTT TGACATCACC GGAAAACTCG CAGAGATGCG GGGTCCTTTT
951 GGGCCGGTGA CAGGTGGTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
1001 TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TCGTTCCATG TTGCCAGCAC
1051 GTAGTGGTGG GGACTCATGG GAGACTGCCG GGGTCAACTC GGAGGAAGGT
1101 GGGGATGACG TCAAGTCATC ATGCCCCCTA TGTCTTGGGC TGCAAACATG
1151 CTACAATGGC CGGTACAAAG GGCTGCGAAA CCGTGAGGTG AAGCGAATCC
1201 CGGAAAGCCG GTCTCAGTTC GGATTGGGGT CTGCAACTCG ACCCCATGAA
1251 GTCGGAGTCG CTAGTAATCG CAAATCAGCA ACGCTGCGGT GAATACGTTT
1301 CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACGTC ACGAAAGTCG GCAACACCCG
1351 AAGCCGGTGG CC

```

GMKU 932 complete sequence 1368 bp

```

1   GTGCTTAACA CATGCAAGGT CGAACGCTGA ACCGCCTTCG GGCTGGGGAT
51  GAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT AATCTGCCCT GCACTCTGGG
101 ATAAGCCTTG GAAACGAGGT CTAATACCGG ATATCACCTT TCTAGGCATC
151 TAGATTGGTT GAAAGTTCTG GCGGTGCAGG ATGAACCCGC GGCTATCAG
201 CTTGTTGGTG GGGTAGTGGC CTACCAAGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG
251 AGAGGGTGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
301 GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCGA
351 CGCCGCGTGA GGGATGACGG CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCGCCAGGG
401 ACGAAGCGCA AGTGACGGTA CCTGGATAAG AAGCACCGGC TAACTACGTG
451 CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCGA GCGTTGTCCG GATTTATTGG
501 GCGTAAAGAG CTCGTAGGCG GTTTGTGCGC TCGGCCGTGA AATCTCCACG
551 CTTAACGTGG AGCGTGCGGT CGATACGGGC AGACTTGAGT TCGGTAGGGG
601 AGACTGGAAT TCCTGGTGTA GCGGTGAAAT GCGCAGATAT CAGGAGGAAC
651 ACCGGTGGCG AAGGCGGGTC TCTGGGCCGA TACTGACGCT GAGGAGCGAA
701 AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTAAAC
751 GTTGGGCGCT AGGTGTGGGC GACATCCACG TTGTCCGTGC CGTAGCTAAC
801 GCATTAGCGC CCCCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTA AAATCAAAG
851 GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGCGGA GCATGTGGAT TAATTCGATG
901 CAACGCGAAG AACCTTACCT GGGCTTGACA TGCGCCAGAC ATCCCCAGAG
951 ATGGGGCTTC CCTTGTGGTT GGTGTACAGG TGGTGCATGG CTGTCGTCAG
1001 CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTTAT

```

```

1051 CCTACGTTGC CAGCGCGTTA TGGCGGGGAC TCGTGGGAGA CTGCCGGGGT
1101 CAACTCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA GTCATCATGC CCCTTATGTC
1151 CAGGGCTTCA CACATGCTAC AATGGCTGGT ACAGAGGGCT GCGATACCGC
1201 GAGGTGGAGC GAATCCCTTA AAGCCGGTCT CAGTTCGGAT CGCAGTCTGC
1251 AACTCGACTG CGTGAAGTCG GAGTCGCTAG TAATCGCAGA TCAGCAACGC
1301 TGGGGTGAAT ACGTTCCTCG GCCTTGTTACA CACCGCCCGT CACGTCATGA
1351 AAGTCGGTAA CACCCGAA

```

GMKU 936 884 bp

```

1 CTGGAGGTAA CACGCTGAGT AACCTGCCCC TGCACCTCTGG GGATAAGCCT
51 GGGAAACCGG GTCTTATACC GGATACGACC CTTTCTCGCA TGGGATGGTG
101 GTGGAAAGTT TTTTCGGTTG GGGATGGGCT CGCGGCCCTAT CAGCTTGTTG
151 GTGGGGTGAT GGCCTACCAA GGCACGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGC
201 GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG
251 CAGTGGGGAA TATTGCGCAA TGGGCGGAAG CCTGACGCAG CGACGCCGCG
301 TGGGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAACC TCTTTCAGCA GGGACGAAGT
351 TGACGTGTAC CTGTAGAAGA AGCGCCGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC
401 GGTAAATACGT AGGGCGCGAG CGTTGTCCGG AATTATTGGG CGTAAAGAGC
451 TCGTAGGTGG CTTGTTGCGT CTGCCGTGAA AGCCCGTGCC TTAACACGG
501 GTCTGCGGTG GATACGGGCA GGCTAGAGGC TGGTAGGGGC AAGCGGAATT
551 CCTGGTGTAG CGGTGAAATG CGCAGATATC AGGAGGAACA CCGGTGGCGA
601 AGGCGGCTTG CTGGGCCAGT TCTGACGCTG AGGAGCGAAA GCGTGGGGAG
651 CGAACAGGAT TAGATACCTT GGTAAGTCCAC GCTGTAAACG TTGGGCGCTA
701 GGTGTGGGGG TCTTCCACGA TTCCTGTGCC GTAGCTAACG CATTAAGCGC
751 CCCGCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTAA AACTCAAGGA ATTGACGGGG
801 GCCCGCACAG CGGNCGAGCA TGTGCTTAA TTCGACGCAC GCGAAAACCT
851 TACCAAGGTT TGACATACAC CGGAAACACT CAAA

```

GMKU 937 835 bp

```

1 CAAGTCGAAC GATGAACCAC CTTCGGTTTG GGGATTAGTG GCGAACGGGT
51 GAGTAACACG TGGGCAATCT GCCCTGCACT CTGGGACAAAG CCCTGGAAAC
101 GGGGTCTAAT ACCGGATACT GACCTGCCAA GGCATCTTGG CGGGTCGAAA
151 GCTCCGGCGG TGCAGGATGA GCGCGCGGCC TATCAGCTTG TTGGTGAGGT
201 AATGGCTCAC CAAGGCGACG ACGGGTAGCC GGCCTGANAG GGCACCGGC
251 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG
301 GAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGAGGGA
351 TGACGGCCTT CGGGTTGTAA ACCTCTTTCA GCAGGGAAGA AGCGAAAGTG
401 ACGGTACCTG CAGAAGAAGC GCCGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT
451 AATACGTAGG GCGCAAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT AAAGAGCTCG
501 TAGGCGGCTT GTCGCGTCGG TTGTGAAAAG CCGGGGCTTA ACCCCGGGTC
551 TGCAGTCGAT ACGGGCAGGC TAGAGTTCGG TAGGGGAGAT CGGAATTCTT
601 GGTGTAGCGG TGAAATGCGC AGATATCAGG AGGAACACCG GTGGCGAAGG
651 CGGATCTCTG GGCCGATACT GACGCTGAGG AGCGAAAGCG TGGGGAGCGA
701 ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGGTG GGCAC TAGGT
751 GTGGGCAACA TTCCACGTTG TCCGTGCCGC AGCTAACGCA TTAAGTGCCC
801 CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTAAAA CTCAA

```

GMKU 938 779 bp

```

1 CGAGCGGCGA ACGGGTGAGT AACACGTGAG CAACCTACCC TCAACTTTTG
51 GATAAGCCTC GGAAACGAGG TCTAATACCG GATAATACTA TGCTCCTCAT
101 GGGGTGTGGT TGAAAGTTCT GCGGGTTGGG GATGGGCTCG CGGCCATATCA
151 GCTTGTTGGT GGGGTAATGG CCTACCAAGG CGTCGACGGG TAGCCGGCCT

```

```

201 GAGAGGGCGA CCGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCCA GACTCCTACG
251 GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCGCAATG GACGAAAGTC TGACGCAGCA
301 ACGCCGCGTG AGGGATGACG GCCTTCGGGT TGTAACCTC TTTCAGCAGG
351 GACGAAGCGA GAGTGACGGT ACCTGCAGAA GAAGGACCGG CCAACTACGT
401 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGTCCG AGCGTTGTCC GGAATTATTG
451 GCGTAAAGG GCTCGTAGGC GGTTCTGCAC GTCGGGAGTG AAAACTCGGG
501 GCTTAACCCC GAGCCTGCTT CCGATACGGG CAGACTAGAG GTAGGCAGGG
551 GAGAGCGGAA CTCCTGGTGT AGCGGTGGAA TGCGCAGATA TCAGGAAGAA
601 CACCGGTGGC GAAGGCGGCT CTCTGGGCCT TACCTGACGC TGAGGAGCGA
651 AAGCGTGGGT AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA
701 CGTTGGGCGC TAGGTGTGGG GGACATTCCA CGTCTCCGT GCCGCAGCTA
751 ACGCATTAAG CGCCCCGCTT GGGGAGTAC

```

GMKU 939 780 bp

```

1 TGGATTAGTG GCGAACGGGT GAGTAACACG TGGGCAATCT GCCCTGCACT
51 CTGGGACAAG CCCTGGAAAC GGGGTCTAAT ACCGGATATG AGGGTCACCG
101 GCATCGGTGA TTCTGTAAAG CTCCGGCGGT GCAGGATGGG CCCGCGGCCT
151 ATCAGCTTGT CGGTGGGGTA ATGGCCTACC GAGGCGACGA CGGGTAGCCG
201 GCCTGAGAGG GCGACCGGCC AACTGCGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC
251 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGCAC AATGGGCGCA AGCCTGATGC
301 AGCAGCGCCG CGTGAGGGAT GACGGCCTTC GGGTTGTAAA CCTCTTTCAG
351 CAGGGAAGAA GCCTTTCGGG GTGACGGTAC CTGCAGAAGA AGCGCCGGCT
401 AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGGCGCGAG CGTTGTCCGG
451 AATTATTGGG CGTAAAGAGC TCGTAGGCGG CTTGTACAGT CGATTGTGAA
501 AGCCCGAGGC TTAACCTCGG GTCTGCAGTC GATACGGGCT GGCTGGAGTG
551 TGGTAGGGGA GATCGGAATT CCTGGTGTAG CCGTGAAATG CGCAGATATC
601 AGGAGGAACA CCGGTGGCGA AGGCGGATCT CTGGGCCATT ACTGACGCTG
651 AGGAGCGAAA GCGTGGGGAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
701 GCCGTAAACG GTGGGCACTA GGTGTTGGCG ACATTCCACG TCGTCGGTGC
751 CGCAGCTAAC GCATTAAGTG CCCCCTGCTG

```

GMKU 940 813 bp

```

1 GAACCACCTT CCGTGTGGGG ATTAGTGGCG AACGGGTGAG TAACACGTGG
51 GCAATCTGCC CTGCACTCTG GGACAAGCCC TGGAAACGGG GTCTAATACC
101 GGATACTGAC CTGCCAAGGC ATCTTGGCGG GTCGAAAGCT CCGGCGGTGC
151 AGGATGAGCC CGCGGCCTAT CAGCTTGTGT GTGAGGTAAT GGCTCACCAA
201 GCGGACGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGC GACCGGCCAC ACTGGGACTG
251 AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA
301 TGGGCGAAAG CCTGATGCAG CGACCCGCG TGAGGGATGA CGGCCTTCGG
351 GTTGTAACC TCTTTCAGCA GGAAGAAGC GAAAGTGACG GTACCTGCAG
401 AAGAAGCGCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGCG
451 CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GAGCTCGTAG GCGGCTTGTC
501 GCGTCGGTTG TGAAAGCCCG GGGCTTAACC CCGGTCTGCT AGTCGATACG
551 GGCAGGCTAG AGTTCGGTAG GGGAGATCGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA
601 AATGCGCAGA TATCAGGAGG AACACCGGTG GCGAAGGCGG ATCTCTGGGC
651 CGATACTGAC GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA
701 CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGGTGGGC ACTAGGTGTG GGCAACATTC
751 CACGTTGTCC GTGCCGCAGC TAACGCATTA AGTGCCCCGC CTGGGGAGTA
801 CCGCCGCAAG GCT

```

GMKU 941 793 bp

```

1  AGGCCCTTCG GGGTACTCGA GCGGCGAACG GGTGAGTAAC ACGTGAGTAA
51  CCTGCCCCCTG ACTCTGGGAT AAGCCTGGGA AACCAGGTCT AATACCGGAT
101 ACGACCATTT CTCGCATGGG ATGGTGGTGG AAAGTTTTTT CGGTTGGGGA
151 TGGGCTCGCG GCCTATCAGC TTGTTGGTGG GGTGATGGCC TACCAAGGCG
201 ACGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGCGACC GGCCACACTG GGACTGAGAC
251 ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCGCAATGGG
301 CGGAAGCCTG ACGCAGCGAC GCCGCGTGGG GGATGACGGC CTTCGGGTTG
351 TAAACCTCTT TCAGCAGGGA CGAAGTTGAC GTGTACCTGT AGAAGAAGCG
401 CCGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGG CGCGAGCGTT
451 GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGAGCTCGT AGGTGGCTTG TTGCGTCTGC
501 CGTGAAAGCC CGTGGCTTAA CTACGGGTCT GCGGTGGATA CGGGCAGGCT
551 AGAGGCTGGT AGGGGCAAGC GGAATTCCTG GTGTAGCGGT GAAATGCGCA
601 GATATCAGGA GGAACACCGG TGGCGAAGGC GGCTTGCTGG GCCAGTTCCTG
651 ACGCTGAGGA GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA
701 GTCCACGCTG TAAACGTTGG GCGCTAGGTG TGGGGGTCTT CCACGATTCC
751 TGTGCCGTAG CTAACGCATT AAGCGCCCCG CCTGGGGAGT ACG

```

GMKU 942 802 bp

```

1  AGGCCCTTCG GGGTACTCGA GCGGCGAACG GGTGAGTAAC ACGTGAGTAA
51  CCTGCCCCCTG ACTCTGGGAT AAGCCTGGGA AACCAGGTCT AATACCGGAT
101 ACGACCATTT CTCGCATGGG ATGGTGGTGG AAAGTTTTTT CGGTTGGGGA
151 TGGGCTCGCG GCCTATCAGC TTGTTGGTGG GGTGATGGCC TACCAAGGCG
201 ACGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGCGACC GGCCACACTG GGACTGAGAC
251 ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCGCAATGGG
301 CGGAAGCCTG ACGCAGCGAC GCCGCGTGGG GGATGACGGC CTTCGGGTTG
351 TAAACCTCTT TCAGCAGGGA CGAAGTTGAC GTGTACCTGT AGAAGAAGCG
401 CCGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGG CGCGAGCGTT
451 GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGAGCTCGT AGGTGGCTTG TCAGCTCTGC
501 CGTGAAAGCC CGTGGCTTAA CTACGGGTCT GCGGTGGATA CGGGCAGGCT
551 AGAGGCTGGT AGGGGCAAGC GGAATTCCTG GTGTAGCGGT GAAATGCGCA
601 GATATCAGGA GGAACACCGG TGGCGAAGGC GGCTTGCTGG GCCAGTTCCTG
651 ACGCTGAGGA GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA
701 GTCCACGCTG TAAACGTTGG GCGCTAGGTG TGGGGGTCTT CCACGACTTC
751 TGTGCCGTAG CTAACGCATT AAGCGCCCCG GCCTGGGGGA GTACGGCCGC
801  AA

```

GMKU943 complete sequence 1476 bp

```

1  CTGTCAGACG AACGCTGGCG GCGTGCTTAA CACATGCAAG TCGAGCGGAA
51  AGGCCCTTCG GGGTACTCGA GCGGCGAACG GGTGAGTAAC ACGTGAGTAA
101 CCTGCCCTTG GCTCTGGGAT AAGCCCGGGA AACTGGGTCT AATACCGGAT
151 ATGACTCCTC ATCGCATGAT GTGGGGGTGG AAAGTTTTTC GGCTGGGGAT
201 GGGCTCGCGG TCTATCAGCT TGTTGGTGGG GTGATGGCCT ACCAAGGCGA
251 CGACGGGTAG CCGGCCTGAG AGGGTGACCG GCCACACTGG GACTGAGACA
301 CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAAATATT GCGCAATGGGC
351 GGAAGCCTGA CGCAGCGACG CCGCGTGGGG GATGAAGGCC TTCGGGTTGT
401 AAACCTCTTT CACCACCGAC GAAGCTAACG TGACGGTAGG TGGGGAAGAA
451 GCGCCGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGGCGCAAGC
501 GTTGTCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGAGCT CGTAGGTGGT CTGTCGCGTC
551 TGCCGTGAAA ACCCGAGGCT TAACCTCGTG GCTTGCGGTG GATACGGGCA
601 GACTAGAGGT AGGTAGGGGA GAATGGAATT CCCGTTAGT CGGTGAAATG
651 CGCAGATATC GGGAGGAACA CCGGTGGCGA AGGCGGTTCT CTGGGCCTTA
701 CCTGACGCTG AGGAGCGAAA GCGTGGGGAG CGAACAGGAT TAAATACCCT

```

```

751 GGTAGTCCAC GCCGTAAACC TTGGGCGCTA GGTGTGGGGT CTTTCCACGG
801 ATTCCGTGCC GTAGCTAACG CATTAAGCGC CCCGCCTGGG GAGTACGGCC
851 GCAAGGCTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGCGGAG
901 CATGTTGCTT AATTCGACGC AACCGAAGA ACCTTACCAA GGTTTGACAT
951 CACCGGAAAA CTCGCAGAGA TGCGGGGTCC TTTTGGGCGG GTGACAGGTG
1001 GTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC
1051 AACGAGCGCA ACCCTCGTTC CATGTTGCCA GCACGTAGTG GTGGGGACTC
1101 ATGGGAGACT GCCGGGGTCA ACTCGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAGT
1151 CATCATGCCC CTTATGTCTT GGGCTGCAAA CATGCTACAA TGGCCGGTAC
1201 AAAGGGCTGC GAAACCGTGA GGTGGAGCGA ATCCCGGAAA GCCGGTCTCA
1251 GTTCGGATTG GGGTCTGCAA CTCGACCCCA TGAAGTCGGA GTCGCTAGTA
1301 ATCGCAGATC AGCAACGCTG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA
1351 CCGCCCGTCA CGTCACGAAA GTCGGCAACA CCCGAAGCCG GTGGCCTAAC
1401 CCTTGTTGGA GGAGCCGTCG AAGGTGGGGC CGGCGATTGG GACGAAGTCG
1451 TAACAAGGTA GCCGTACCGG AGGTGG

```

GMKU 944 797 bp

```

1 CGGGAGGGGA TTAGTGGCGA ACGGGTGAGT AACACGTGGG CAATCTGCCC
51 TTCACTCTGG GACAAGCCCT GGAAACGGGG TCTAATACCG GATACGACAC
101 ACGACCGCAT GGTCTGTGTG TGGAAAGCTC CGGCGGTGAA GGATGAGCCC
151 GCGGCCATATC AGCTTGTTGG TGGGGTGATG GCCTACCAAG GCGACGACGG
201 GTAGCCGGCC TGAGAGGGCG ACCGGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC
251 AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC
301 CTGATGCAGC GACGCCGCGT GAGGGATGAC GGCCTTCGGG TTGTAAACCT
351 CTTTCAGCAG GGAAGAAGCG AGAGTGACGG TACCTGCAGA AGAAGCGCCG
401 GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGGCGC AAGCGTTGTC
451 CGGAATTATT GGGCGTAAAG AGCTCGTAGG CGGCTTGTCG CGTCGGATGT
501 GAAAGCCCGG GGCTTAACCC CGGGTCTGCA TTCGATACGG GCAGGCTAGA
551 GTTCGGTAGG GGAGATCGGA ATTCCTGGTG TAGCGGTGAA ATGCGCAGAT
601 ATCAGGAGGA ACACCGGTGG CGAAGGCGGA TCTCTGGGCC GATACTGACG
651 CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC CTTGGTAGTC
701 CACGCCGTAA ACGTTGGGAA CTAGGTGTGG GCGACATTCC ACGTCGTCCG
751 TGCCGCAGCT AACGCATTAA GTTCCCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCA

```

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายชาคริต บุญอยู่
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 8 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	จันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2548
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอนประจำปี 2550 ทุนวิจัยมหบัณฑิต สกว. โครงการ Window II ประจำปี 2550

ผลงานทางวิชาการ

กรรณิการ์ ควงมาลัย, รัชนิ มิ่งมา, ชาคริต บุญอยู่, อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และ วสุ ปฐมอารีย์.
2550 การคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากสมุนไพรรองพื้นซึ่งและว่านมหากาฬและประสิทธิภาพ
ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45
สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 334-341.

Bunyoo, C., K. Duangmal, A. Nuntagij and A. Thamchaipenet. Characterization of endophytic actinomycetes isolated from wattle tree (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) using molecular techniques. **The proceeding of 34th Congress on Science and Technology of Thailand.** 31 October-2 November 2008. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

Bunyoo, C., K. Duangmal, A. Nuntagij and A. Thamchaipenet. 2009. Characterisation of endophytic actinomycetes isolated from wattle tree (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) in Thailand. **Thai Journal of Genetics.** 2: 155-163.

- Thamchaipenet A., K. Duangmal, C. Indananda, C. Bunyoo, A. Matsumoto and Takahashi Y.
2009. Endophytic actinomycetes from Thai agricultural and medicinal plants as sources for discovery of novel genus and species. *In* Abstract book of **15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes**. 20-25 August 2009, Shanghai, China. p. 67.
- Phornphisutthimas, S., N. Sudtachat, C. Bunyoo, P. Chotewutmontri, B. Panijpan and A. Thamchaipenet. 2010. Development of an intergeneric conjugal transfer system for rimocidin-producing *Streptomyces rimosus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 50: 530-536.
- Thamchaipenet, A., C. Indananda, C. Bunyoo, K. Duangmal, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 554-559.