

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกจาก  
เนื้อเยื่อต้นกาแฟ

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC  
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM TISSUES OF  
COFFEA ARABICA (L.)



มนัสนันท์ ประสานพันธ์

อาริสรา จิระเวชถาวร

เอกรินทร์ ลามาตี

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ปีการศึกษา 2561** ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC  
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM COFFEE TISSUES OF  
COFFEA ARABICA (L.)



MANASSANAN PRASANPAN

ARISA JIRAWETTHAWORN

AEKARIN LAMALEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท์ที่แยกจากเนื้อเยื่อ  
ต้นกาแฟ

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC

ACTINOMYCETES ISOLATED FROM TISSUES OF

COFFEA ARABICA (L.)

ชื่อนักศึกษา

นางสาวมนัสนันท์ ประสานพันธ์ รหัสนักศึกษา 58050954

นางสาวอาริสา จิระเวชถาวร รหัสนักศึกษา 58051015

นายเอกรินทร์ ลามาลี รหัสนักศึกษา 58051017

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
หัวข้อโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
(จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนัสนันท์ ประสานพันธ์ รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๐๙๕๔ นางสาวอาริสรา จิระเวชถาวร รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๑๐๑๕ นายเอกรินทร์ ลามาดี รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๑๐๑๗
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	๒๕๖๑
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.จิตติ ท่าไร่

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท จำนวน ๓๒ ไอโซเลต แยกได้จากส่วนราก ใบ และผลของต้นกาแฟสายพันธุ์อราบิก้า จากจังหวัดราชบุรี นครราชสีมา และลำปางของประเทศไทย ในงานวิจัยครั้งนี้เราพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้มาจากส่วนรากมากที่สุด (ร้อยละ ๙๓.๘) ไอโซเลตทั้งหมดถูกนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อฟูซาเรียมที่เป็นสาเหตุของโรคต้นเหี่ยวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงควบคู่ ผลปรากฏว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน ๗ ไอโซเลต (ร้อยละ ๒๑.๙) แสดงกิจกรรมการต้านการเจริญต่อเชื้อรา โดยที่ไอโซเลต ซีเอแอลอาร์๑๑๐ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด (ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ ๓๘.๘) เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท จำนวน ๕ ไอโซเลต ได้แก่ ซีเออาร์อาร์๒๐๕ ซีเอเอ็นอาร์๑๐๕ ซีเอเอ็นอาร์๑๐๖ ซีเอแอลอาร์๑๐๗ และ ซีเอแอลอาร์๑๑๐ ถูกเลือกโดยคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อและหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ ไปศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นโดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิบหกเอสอาร์อาร์เอ็นเอ ผลปรากฏว่าไอโซเลตเหล่านี้มีความใกล้เคียงกับ สเตรบโตมัยเซส ราพามัยซินิคัส เอ็นอาร์อาร์แอล บี ห้าสี่เก้าหนึ่ง (ร้อยละ ๙๘.๔) โนคาร์เดีย เจียงซีเอ็นซิส เอ็นบีอาร์ซี หนึ่งศูนย์หนึ่งสามห้าเก้า (ร้อยละ ๙๙.๑) สเตรบโตมัยเซส พอซิสปอเรียส ซีจีเอ็มซีซี สี่จุดสองศูนย์สองห้า (ร้อยละ ๙๘.๘) แอกติโนมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้จะขอขึ้นด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คูรา รุกาโตโบสปอรา ไอเอฟไอ หนึ่งสี่สามแปดสอง (ร้อยละ ๙๘.๗) และ สเตรปโตมัยเสท ราพามัยซินีคัส เอ็นอาร์อาร์แอล บีห้าสี่เก้าหนึ่ง (ร้อยละ ๙๙.๑) ตามลำดับ

คำสำคัญ : การควบคุมทางชีวภาพ กาแฟอาราบิก้า เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท เชื้อราฟูลาเรียม โรคต้นเหี่ยว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Biological activities of endophytic actinomycetes isolated from the tissues of <i>Coffea Arabica</i> (L.)
Student	Miss Manassanan Prasanpan Student ID: 58050954 Miss Arisa Jirawetthaworn Student ID: 58051015 Mister Aekarin Lamalee Student ID: 58051017
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2018
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

### Abstract

A total of thirty two endophytic actinomycete isolates were isolated from the roots, leaves, and coffee cherries tissues of *Coffea arabica* L. collected from Ratchaburi, Nakhon Ratchasima and Lampang provinces, Thailand. In this research, we found that endophytic actinomycetes were most commonly isolated from the root tissue (93.75%). All isolates were investigated for anti-fungal activity against *Fusarium* spp., the cause of wilt disease using dual culture method. The result showed that there were seven isolates (21.9%) of endophytic actinomycetes exhibiting the anti-fungal activity. Among of them, isolate CA3R110 revealed the strongest activity to inhibit the growth of *Fusarium* spp. (38.8% inhibition value). Five endophytic actinomycete isolates, CA1R205, CA2R105, CA2R106, CA3R107 and CA3R110, showing the strong anti-fungal activity and/or exhibiting the morphological interests were selected to perform the partial 16S rRNA gene sequencing for preliminary identification. The results showed that these isolates were closely related to *Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> (98.4%), *Nocardia jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> (99.1%), *Streptomyces paucisporeus* CGMCC 4.2025<sup>T</sup> (98.6%), *Actinomadura*

*rugatobispora* IFO 14382<sup>T</sup> (98.7%) and *Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> (99.0%), respectively.

**Keywords :** Bio-control, *Coffea arabica*, Endophytic actinomycetes, *Fusarium* spp. and Wilt Disease



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษในหัวข้อเรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่แยกจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟ จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลเหล่านี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าวัว ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และช่วยตรวจแก้ไขรายงานโครงการพิเศษนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของคณะผู้จัดทำที่สนับสนุน และช่วยเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



มนัสนันท์ ประสานพันธ์  
อารีสา จิระเวชถาวร  
เอกรินทร์ ลามาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญตาราง .....	จ
สารบัญรูปภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	2
1.3 ขอบเขต .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	3
2.1 แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) .....	3
2.2 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microorganisms) .....	12
2.3 ต้นกาแฟ .....	13
2.4 โรคที่พบในพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา (plant disease caused by fungi) .....	15
2.5 การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยซีท .....	16
2.6 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ (surface sterilization) .....	20
2.7 หลักการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture .....	21
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	64
เอกสารอ้างอิง .....	66
ภาคผนวก .....	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	32
3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycle).....	32
4.1 เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า.....	34
4.2 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากต้นกาแฟ จังหวัดราชบุรีต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว .....	36
4.3 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากต้นกาแฟ จังหวัดนครราชสีมาต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว .....	37
4.4 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากต้นกาแฟ จังหวัดลำปางต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว .....	37
4.5 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สกัดจาก 16S rRNA gene (% similarity) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูล .....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะโคโลนีและเส้นใยของแอสทีโนมัยสีท.....	4
2.2 แสดงรูปร่างสปอร์ของแอสทีโนมัยสีท.....	5
2.3 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอสทีโนมัยสีท.....	6
2.4 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่อาศัยในรากของพืช.....	13
2.5 ต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า.....	13
2.6 ส่วนประกอบของผลกาแฟ.....	14
2.7 วัฏจักรของโรค <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> .....	16
2.8 ภาพวาดสายสปอร์ประเภทต่างๆของแอสทีโนมัยสีท.....	17
2.9 การเจริญของแอสทีโนมัยสีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
2.10 โครงสร้าง LL-2,6-diaminopimelic acid.....	18
2.11 โครงสร้าง meso-2,6-diaminopimelic acid.....	19
2.12 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเอนโดไฟต์จากแอสทีโนมัยสีท CMUAc130.....	21
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR105.....	45
4.2 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR105 บน phylogenetic tree (NJ method).....	46
4.3 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CANR105.....	47
4.4 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR105 บน phylogenetic tree (NJ method).....	48
4.5 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CARR205.....	49
4.6 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CARR205 บน phylogenetic tree (NJ method).....	50
4.7 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CANR101.....	51
4.8 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR101 บน phylogenetic tree (NJ method).....	52
4.9 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CANR106.....	53
4.10 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR106 บน phylogenetic tree (NJ method).....	54
4.11 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CANR303.....	55
4.12 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR303 บน phylogenetic tree (NJ method).....	56
4.13 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR102.....	57
4.14 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR102 บน phylogenetic tree (NJ method).....	58
4.15 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR104.....	59
4.16 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR104 บน phylogenetic tree (NJ method).....	60

4.17 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR106 .....	61
4.18 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CAL106 บน phylogenetic tree (NJ method) .....	62
4.19 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR110 .....	63
4.20 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR110 บน phylogenetic tree (NJ method).....	64
4.21 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR108 .....	65
4.22 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR108 บน phylogenetic tree (NJ method).....	66
4.23 แสดงลักษณะโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลต CALR107 .....	67
4.24 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CAL107 บน phylogenetic tree (NJ method) .....	68



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรครดต้นเหี่ยว (wilt disease or fusarium wilt disease) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจทั่วทั้งโลกได้หลากหลายชนิด อาทิ ต้นกาแฟ ต้นกล้วย และต้นมะเขือเทศ เป็นต้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อราสกุล *Fusarium* spp. (Rutherford, 2006) โดยทั่วไปในภาคการเกษตรมีการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราด้วยการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) แต่จะทำให้พบการเกิดปัญหาสารพิษตกค้างที่ส่งผลกระทบต่อทั้งเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมตามมา (Silva *et al.*, 2012) ซึ่งการควบคุมทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศ มีหน่วยพันธุกรรมประกอบไปด้วยเบสกวานีน และไซโตซีนที่สูง (Goodfellow and Williams, 1983) อยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยส่วนมากพบในดิน ร่องลงมาเป็นแหล่งน้ำและพืช ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนมากจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลากหลาย ได้แก่ การส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช การสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ยกตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และมีบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลาย เป็นต้น (Taechowisan, 2003) และพบว่าแอคติโนมัยซีทอีกกลุ่มหนึ่งที่มีชื่อว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท (endophytic actinomycetes) อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้โดยที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่อาศัยอยู่ (host plant) และสามารถพบได้ในทุกส่วนของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือแม้กระทั่งส่วนผลของต้น (Araújo, 2000) ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นที่นิยมของภาคอุตสาหกรรมการเกษตรและอุตสาหกรรมยาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากสารทุติยภูมิที่เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทสร้างขึ้นมีแนวโน้มว่าเป็นสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (Rao *et al.*, 2015)

ดังนั้นโครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากส่วนผล ใบ และรากของต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า จาก 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ ราชบุรี นครราชสีมา และลำปาง ศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อราที่ก่อโรคในพืช โดยคาดว่าจะพบเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพควบคุมทางชีวภาพได้ เพื่อสามารถนำไปพัฒนาและต่อยอดด้าน

เอกสารวิชาการและด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไปได้ในอนาคตเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากผล ใบ และรากของต้นกาแฟ
2. เพื่อคัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว
3. เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการคัดแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟในพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ ราชบุรี นครราชสีมา และลำปาง
2. ทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อราที่ก่อโรคในพืชของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทด้วยวิธี dual culture
3. ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางฟิโนไทป์และจีโนไทป์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว
2. การวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งโรคต้นเหี่ยว
3. สามารถเป็นแนวทางให้ผู้สนใจนำไปศึกษาและพัฒนาต่อยอดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แอคติโนมัยสีท (actinomycetes)

แอกติโนมัยสีท (actinomycetes) ส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตอิสระที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางทั้งในระบบนิเวศบกและในแหล่งน้ำ แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสไซโตซีน (cytosine, C) และเบสกวานีน (guanine, G) ในดีเอ็นเอมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow and Williams, 1983) เป็นจุลินทรีย์ประเภทโพรคาริโอต (prokaryote) ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีทประกอบด้วย mucopeptide (N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid); 2,6-diaminopimelic acid; glutamic acid, glycine และ alanine (Davis and Parker, 1959) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและขยายพันธุ์โดยการสร้าง asexual spore ที่เรียกว่า conidia เมื่อพิจารณาจะพบว่าแอกติโนมัยสีท มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อราเนื่องจากมีลักษณะเฉพาะคือ สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ได้เหมือนกัน (สุจิตกัลยา, 2560) ในเซลล์ของแอกติโนมัยสีทโครโมโซมถูกจัดเรียงในนิวเคลียสและผนังเซลล์ของเบปทีโดไกลแคน (peptidoglycan cell wall) นอกจากนี้เซลล์ยังไวต่อสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial agents) อีกด้วย ในทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นแบบต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตและสามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ (aerobic) (กิ่งจันทน์, 2558) แต่ก็มีข้อยกเว้นเช่นกัน เนื่องจากยังมีพวกที่เป็นแบบต้องการอินทรีย์สารจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (heterotrophic) หรือเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยคาร์บอนมาจากอินทรีย์สารแต่อาศัยพลังงานจากการออกซิเดชันของอินทรีย์สารรวมถึงมีพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่ค่อนข้างซับซ้อนหลายชนิด (chemoautotrophic) (Barka *et al.*, 2016)

อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยสีทสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางนิเวศวิทยาที่หลากหลายทั้งใน ดิน น้ำจืด น้ำเค็ม อากาศ โคลน มูลสัตว์ อากาศ เช่น *Streptomyces* *Micromonospora* *Rhodococcus* และ *Salinispora* ในพืช เช่น *Frankia* spp. เชื้อโรคพืชหรือ

สัตว์ เช่น *Corynebacterium* และ *Mycobacterium* แหล่งที่มีการพบมากได้แก่บริเวณที่มีการ

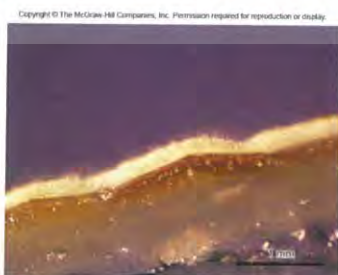
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ... สละสมสารอินทรีย์ เช่น ไร่สวนที่มีการเพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่า  
 ไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชายเลน แอคติโนมัยสีที่พบในดินจะมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าที่อื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินที่เป็นต่างและดินที่อุดมไปด้วยอินทรีย์วัตถุ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่จะสามารถพบของประชากรจุลินทรีย์ได้ ทั้งบนผิวดินและที่ระดับความลึกมากกว่า 2 เมตร และจะลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลงไป พบแอคติโนมัยสีที่มากกว่า 100 สกุล ในดินที่ค่อนข้างเป็นกลางหรือมีความเป็นกรดต่าง ระหว่าง 6.5-8.0 และสกุลที่มีการพบมากที่สุดในดิน คือ *Streptomyces* พบประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Nocardia* พบประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ และ *Micromonospora* พบประมาณ 1-15 เปอร์เซ็นต์ (De Leo et al., 2012)

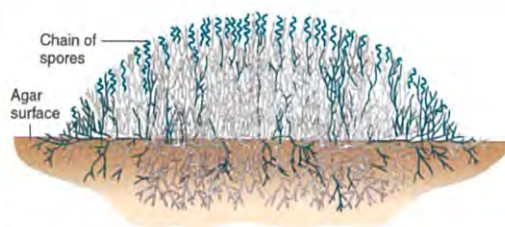
### 2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสี

#### 2.1.1.1 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสี

โคโลนีของแอคติโนมัยสีเกิดจากการรวมตัวของเส้นใย (mycelium) ที่หนาแน่นจนเกิดการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ส่วนของเส้นใยที่แตกหักหรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม เมื่อเชื้อเริ่มเจริญบนอาหารแข็งก็จะสามารถพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะแทงทะลุผ่านอาหารแข็งขึ้นมาและเจริญกลายเป็นเส้นใยอากาศที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง (aerial mycelium) จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการกั้นภายในเส้นใย โดยทั่วไปจะเริ่มจากการสร้างผนังกันโดยทั่วไปมักสร้างผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัวและเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutskii and Agre, 1976) รูปร่างของโคโลนีแอคติโนมัยสีมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น นูน (raised) เรียบแบน (flat) สีของโคโลนีที่หลากหลาย เช่น ขาว ส้ม ม่วง ฟ้า เขียว ชมพู เหลือง น้ำตาล และดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะ เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกร็ด (squamous) ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ อายุ หรือสภาวะต่าง ๆ



(a)



(b)

Photo © Dr. Aisa A. Gaskell

### รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโคโลนีและเส้นใยของแอคติโนมัยสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่า (ที่มา: <http://www2.canyons.edu/Faculty/robinsonc/Documents/LectureMaterials/>) ไปใช้

### 2.1.1.2 สปอร์ของแอกติโนมัยสีท

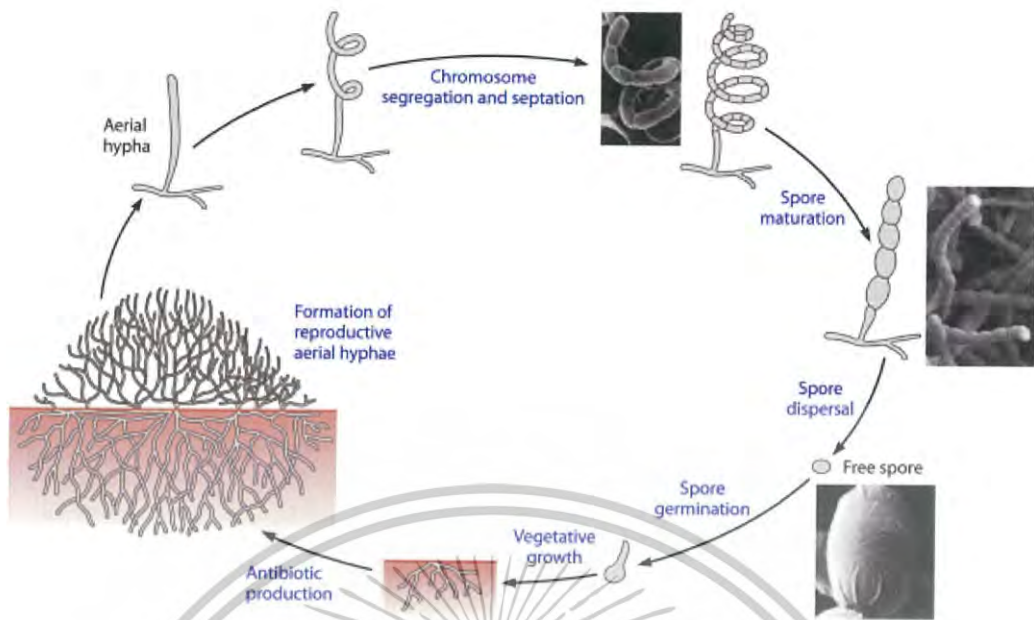
สปอร์ของแอกติโนมัยสีทมีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ เกิดจากการแบ่งออกจากเส้นใย (fragmentation) การสร้างและรูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยสีทแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มและชนิดของแอกติโนมัยสีทได้ สปอร์ของแอกติโนมัยสีทมีหลากหลายรูปร่างและหลายลักษณะ เช่น รูปกลม (globose) รูปแท่ง (rod-shaped) รูปไข่ (ovoid) และมีผิวสปอร์หลายรูปแบบ เช่น เรียบ (smooth) ขรุขระ (irregular rugose) สันนูนเป็นร่องขนาน (parallel rugose) ปุ่ม (warty) และขน (hairy)



รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยสีท

(ที่มา : [https://mafiadoc.com/queue/actinomycetes-morphology-reproduction-university-of-\\_5a032bdc1723dd6244975fe7.html](https://mafiadoc.com/queue/actinomycetes-morphology-reproduction-university-of-_5a032bdc1723dd6244975fe7.html))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีท

(ที่มา : [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-sporulating-actinomycetes\\_fig1\\_284716361](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-sporulating-actinomycetes_fig1_284716361))

การสร้างสปอร์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอก ได้แก่ สปอร์เดี่ยว (single spore) สายสปอร์ (spores formed in chains) และอับสปอร์ (spore formed within sporangia)

#### 1. สปอร์เดี่ยว (single spore)

การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทถูกเรียกว่า monosporous มักพบในหลายสกุล เช่น *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophore) สร้างสปอร์บนสายใยอาหาร ส่วนสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ และสกุล *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศและมีก้านชูสปอร์ที่ไม่แตกแขนง (McCarthy, 1989)

#### 2. สปอร์เป็นสาย (spores formed in chains)

แอกติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์รูปแบบนี้เป็นส่วนมาก การสร้างสปอร์เป็นสายเกิดจากการที่เส้นใยมีการแบ่งตัวเป็นส่วน (segments) ตามขวาง แต่ละส่วนสามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนสปอร์ ได้แก่ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous) เพื่อการจัดกลุ่มได้

- สปอร์คู่ (bisporous) ประกอบด้วย คู่ของสปอร์เรียงต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* และ *Actinobispora* (Jiang and Xu, 1996) เป็นสปอร์ที่พบได้ยากมีลักษณะเป็นสปอร์รูปคู่ทรงรีอาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ
- สปอร์สายสั้น (oligosporous) ประกอบด้วย 7-20 สปอร์เรียงต่อกัน น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์เรียงต่อกันและบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* โดยสร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ซึ่งมีจำนวนสปอร์ 2-7 สปอร์อยู่บนก้านชูสปอร์
- สปอร์สายยาว (polysporous) สปอร์ของแอคติโนมัยสีทสายยาวเรียกว่า arthrospores คือ มีการสร้างสปอร์เป็นสายโดยเกิดการแตกหักของเส้นใยที่เกิดจากการแบ่งส่วน ๆ ของเส้นใยเดิม บริเวณแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์สายยาวที่สำคัญ คือ สกุล *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์

### 3. อับสปอร์ (spore formed within sporangia)

มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ สามารถแบ่งกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ

- กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลมหรือทรงเกือบกลม อับสปอร์สร้างขึ้นบนเส้นใยอาหารโดยตรง โดยมีก้านชูอับสปอร์ (sporangiospore) ยื่นขึ้นมาจากเส้นใยอาหาร และที่ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์มีการแตกแขนงออกเป็นสายสปอร์หลายสายขดม้วนเป็นก้อนภายในผนังห่อหุ้ม
- กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยสกุล *Planomonaspora* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอกภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ สกุล *Planobispora* สร้างสปอร์คู่เรียงต่อกันตามยาวอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotatraspora* สร้างอับสปอร์ทรงกระบอกยาวภายในมีสี่สปอร์เรียงต่อกันเป็นหนึ่งแถว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.1.2 การจัดกลุ่มของแอกติโนมัยสีท (classification of actinomycetes)

เชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยสีท (actinomycetes) ได้มีการจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยสีทขึ้นใหม่ ในปี ค.ศ. 1997 โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ตามวิธีของ The Atlas of Actinomycetes (Shinji, 1997) ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อแอกติโนมัยสีทได้ออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

### 1. *Micrococcus Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม บางสปีชีส์ (species) นั้นเป็นเชื้อก่อโรคที่พบในคน สัตว์และพืช เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างสปอร์ในรูปกลมและแท่งได้ เป็นพวก aerobic สามารถใช้ลักษณะของ DAP บนผนังเซลล์ในการจำแนกได้ เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล คือ *Arthrobacter Promicromonospora Oerskovia Dermatophilus Aureobacter Curtobacterium Argomyces* และ *Nocardoides*

### 2. *Mycobacterium Nocardia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้ทั้งหมด 8 สกุล คือ *Mycobacterium Nocardia Gordona Diezia Rhodococcus Tsukamurella* และ *Turicaella* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม และเป็นเชื้อก่อโรคที่พบในคน สัตว์เลี้ยงลูกนมและปลา เชื้อในกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อน ลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้พบ meso-A<sub>2</sub>pm บน peptidoglycan พบ mycolic acid และ arabigalatan ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ได้ เชื้อหลายสกุลผนังเซลล์เป็นแบบ glycolyl type

### 3. วงศ์ *Pseudonocardiaceae* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุล คือ *Saccharopolyspora Actinopolyspora Amycolatopsis Kibdelosporangium Pseudonocardia* และ *Saccharomonospora* เชื้อกลุ่มนี้มี DAP บนผนังเซลล์เป็นแบบ meso-A<sub>2</sub>pm มีน้ำตาลในเซลล์เป็นอะราบิโนสและกาแลคโทส ไม่พบ mycolic acid บนผนังเซลล์ menaquinone ส่วนใหญ่เป็นแบบ MK-9(H<sub>4</sub>) ยกเว้นสกุล *Pseudocardia* ที่มีลักษณะเป็น MK-8(H<sub>4</sub>) การจัดกลุ่มเชื้อโดยการใช้ลำดับเบสในช่วงยีน 16S rRNA ในการศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อสกุล *Actinokineospora* และ *Saccharothrix* จัดอยู่ในวงศ์ *Pseudonocardiaceae*

### 4. วงศ์ *Micromonosporaceae*

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มี 3 สกุล คือ *Actinoplanes Dactylosporangium* และ *Pilimelia* ลักษณะสำคัญของเชื้อสกุลนี้คือ สามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยสปอร์จะอยู่ภายในไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sporangium หรือ spore vesicle ที่พบบน substrate mycelium ผนังเซลล์เป็นแบบ glycolyltype พบน้ำตาลไซโลสและกรดอะมิโน L-lysine หรือ meso-A<sub>2</sub>pm บนผนังเซลล์

#### 5. วงศ์ *Thermomonosporaceae*

กลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อทั้งหมด 4 สกุล คือ *Thermomonospora Actinomadura Spirillospora* และ *Actinocorallia* จากการศึกษาแผนภูมิทางวิวัฒนาการ ร่วมกับการศึกษาเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) พบว่าสกุล *Excellospora viridilutea* และ *Excellospora rubro brunea* ได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Actinomadura viridilutea* และ *Actinomadura rubrobrunea* ผนังเซลล์ของสกุล *Thermomonospora* พบกรดอะมิโนแบบ meso-A<sub>2</sub>pm ไม่พบน้ำตาลไซโลส อะราบิโนสและกาแลคโทส มี menaquinones เป็นแบบ MK-9(H<sub>4</sub>) (H<sub>4</sub>) และ MK-10(H<sub>6</sub>) (H<sub>8</sub>) ในสกุล *Thermomonospora* และ *Excellospora* จัดเป็นพวกร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 45-55 องศาเซลเซียส

#### 6. วงศ์ *Streptosporangiaceae*

เชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุล ได้แก่ *Microbispora Microtetraspore Planobispora Planomonospora Herbidospore* และมี *Streptosporangium* เป็นสกุลหลัก ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกคือลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง sporangia รวมถึงจำนวนสปอร์ที่พบบน sporophore และ sporangia ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มนี้จะพบ DAP แบบ meso-A<sub>2</sub>pm มี menaquinones แบบ MK-9(H<sub>2</sub>) MK-9(H<sub>4</sub>) และ MK-9 เป็นหลัก ยกเว้นสกุล *Herbidospore* ที่มีลักษณะเป็น MK-10(H<sub>4</sub>) พบน้ำตาลมาตูโรส เป็นน้ำตาลที่พบได้ในเชื้อสกุล *Actinomadura* โดยเชื้อสกุลนี้ไม่ได้จัดอยู่ใน วงศ์ *Streptosporangiaceae* การศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ร่วมกับการศึกษา lipid composition จะทำให้สามารถแยกเชื้อสกุลนี้ออกจากสกุล *Actinomadura* ได้

#### 7. วงศ์ *Streptomycetaceae*

เชื้อสกุล *Streptomyces* นั้นถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Streptomycetaceae* โดยเชื้อสกุลนี้เป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวในสิ่งแวดล้อม เช่น ทะเล แม่น้ำ อากาศ และพบมากที่สุดในดิน เชื้อบางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ และพืช สกุลนี้จะพบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีที่หลากหลาย ต่อมาพบอีก 6 สกุล ได้แก่ *Kitasatoa Chainia Microellobosporia Elyrosporangium Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ได้ถูกจัดในสกุลของ *Streptomyces* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกับ sporangium และ pyrenidia เป็นต้น รวมถึงการศึกษาลำดับเบสของบริเวณยีน 16S rRNA ลักษณะ

ของ aerial mycelium นั้นจะพบสปอร์ที่ต่อกันเป็นสายยาว มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะพบสปอร์สายสั้น และไม่พบการแตกหักของ substrate mycelium ลักษณะการเกิดสปอร์ ลักษณะของสายโซ่สปอร์และพื้นผิวของสปอร์นั้นสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่ม และการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มนี้ได้ ลักษณะของ peptidoglycan ของ *Streptomyces* ยกเว้นสกุล *Kitasatosporia* นั้นมีลักษณะ DAP เป็น LL-A<sub>2</sub>pm จะพบ phosphatidy lethanolamine และไม่พบ glucosamine ในส่วนของ phospholipid

## 8. สกุลอื่น

เชื้อในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีอนุกรมวิธานที่หลากหลาย เช่น เชื้อสกุล *Actinobispora* มีผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโนแบบ meso-A<sub>2</sub>pm พบน้ำตาล อะราบิโนส กาแลคโทส และไซโลส มี menaquinones เป็นแบบ MK-7(H<sub>2</sub>) และ MK-9(H<sub>2</sub>) *Actinocorallia* กรดอะมิโนแบบ meso-A<sub>2</sub>pm ไม่พบน้ำตาลที่จำเพาะบนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบเชื้อสกุลอื่น ๆ เช่น *Geodermatophilus* *Nocardiopsis* *Kineosporia* *Spirillospora* *Sporichtha* *Actinocorallia* *Actinobispora* *Glycomyces* และ *Frankia*

### 2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีท

#### 2.1.3.1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ

แอกติโนมัยสีทเป็น heterotroph บทบาทและกิจกรรมของแอกติโนมัยสีทจึงขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรีย์วัตถุที่มีอยู่หรือที่ถูกใส่เพิ่มลงไปบนดินตามปกติแล้วแอกติโนมัยสีทจะมีบทบาทน้อยในช่วงแรกของการย่อยสลายเมื่อเปรียบเทียบกับ Heterotrophic ของแบคทีเรียและเชื้อรา แต่บทบาทของแอกติโนมัยสีทจะเด่นกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในช่วงหลังที่สารประกอบที่หลงเหลืออยู่ภายในอินทรีย์วัตถุส่วนใหญ่เป็นสารประกอบจำพวกที่ย่อยสลายได้ยาก

#### 2.1.3.2 พีเอช (ความเป็นกรด-ต่าง)

แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 6.5 ถึง 8.0 (Akond *et al.*, 2016) และไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (พีเอชต่ำกว่า 5.0) การใส่ปูน (liming) เพื่อปรับพีเอชดินกรดจึงมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีท ในขณะที่การใส่ปุ๋ยเคมีที่มีผลทำให้ดินเป็นกรด เช่น กำมะถัน (sulphur) หรือปุ๋ยแอมโมเนียม (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยสีทลดลงจึงเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการควบคุมโรค เช่น โรค potato scab ที่เกิดโดยแอคติโนมัยสีท

### 2.1.3.3 ความชื้นและการระบายอากาศ

แอคติโนมัยสีทเป็น strict aerobe ดังนั้นการเจริญเติบโต บทบาท และกิจกรรม จึงขึ้นอยู่กับสัดส่วนของน้ำและอากาศในดิน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือสภาวะที่ดินที่ความชื้นอยู่ที่ระดับ 50-75 เปอร์เซ็นต์ WHC

### 2.1.3.4 อุณหภูมิ

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็น mesophiles จึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่ระดับ 28-37 °C ยกเว้นบางชนิด เช่น *Thermoactinomyces* ที่เจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงถึง 65-68 °C (Waksman, 1939)

## 2.1.4 บทบาทและกิจกรรมของแอคติโนมัยสีท

### 2.1.4.1 ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ในธรรมชาติ ที่อาศัยในดินมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชและสัตว์ ที่มีความทนทานต่อการย่อยสลาย แอคติโนมัยสีทจึงถูกพบว่ามมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ สามารถย่อยสลายได้ทั้งสารประกอบที่ย่อยง่าย และสารประกอบที่ย่อยยาก เช่น phenolic compound chitin lignins cellulose บางชนิด สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงถึง 65-68 °C เช่น ในกองปุ๋ยหมัก เป็นต้น (Bui, 2014)

### 2.1.4.2 ควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ดิน

แอคติโนมัยสีทหลายชนิดผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ฆ่าทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้จึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ดินชนิดอื่นในระบบนิเวศของดิน (soil ecosystem) (Mahajan and Balachandran, 2012)

### 2.1.4.3 แอคติโนมัยสีทบางชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืช

บางชนิดสามารถก่อโรคได้ในพืช เช่น โรค potato scab ซึ่งเกิดจากเชื้อเอกสาร *Streptomyces scabies* ในมันฝรั่ง (King et al., 1992) ก้าน ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.1.4.4 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต

แอกติโนมัยสีทบางชนิดมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น สกุล *Nocardia* บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้และยังมีเชื้อแอกติโนมัยสีทบางชนิดที่เมื่ออาศัยร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น สกุล *Frankia* และ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรด โดยเชื้อกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดโดยการย่อยสลายเซลล์โลสซึ่งสามารถละลายฟอสเฟตได้

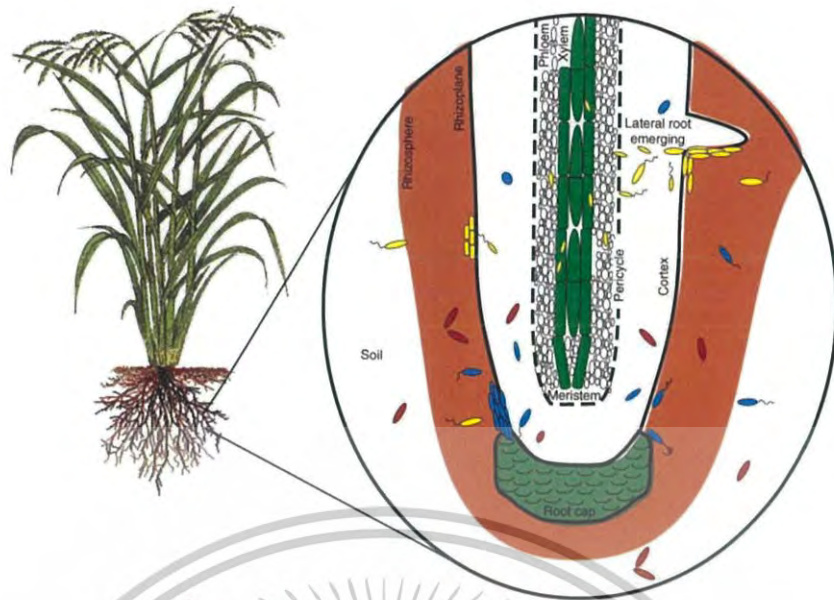
#### 2.1.4.5 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

แอกติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะ ต่อด้านเชื้อรา แบคทีเรีย วัชพืช (Basavaraj *et al.*, 2010)

## 2.2 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microorganisms)

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ประกอบไปด้วย แบคทีเรีย แอกติโนมัยสีท และเชื้อรา สามารถพบได้ในพืชทุกชนิด โดยอาศัยอยู่ภายในแต่ละส่วนของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ และผล มีความสัมพันธ์ระหว่างกันทั้งแบบการเข้าไปทำให้เกิดโรค (pathogenesis) รวมไปถึงการพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) (Tadych and White, 2018) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่พืชที่อาศัยอยู่ในทางตรงข้ามกันส่วนมากช่วยในเรื่องการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช เช่น ชักนำให้เกิดการสร้างฮอร์โมนพืช หรือ ตัวเร่งปฏิกิริยาบางชนิด การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช และเพิ่มความสามารถในการการละลายแร่ธาตุและอินทรีย์วัตถุได้ (Silva *et al.*, 2012) การป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์อื่นที่เข้ามาทำลายเนื้อเยื่อพืช หรือลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ลงได้ ได้แก่ การสร้างสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ภายในพืช เนื่องจากแอกติโนมัยสีทอย่างในสกุล *Streptomyces* เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีความสามารถในการสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทั้งในพืช คน และสัตว์ (Shimizu, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่อาศัยในรากของพืช

(ที่มา : [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(08\)00192-3](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(08)00192-3))

### 2.3 กาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.)



รูปที่ 2.5 ต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

(ที่มา : <https://www.alamy.com/stock-photo-arabian-coffee-coffea-arabica-fruited-branches-colombia-76132966.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.1 ชื่อสามัญ (common name)

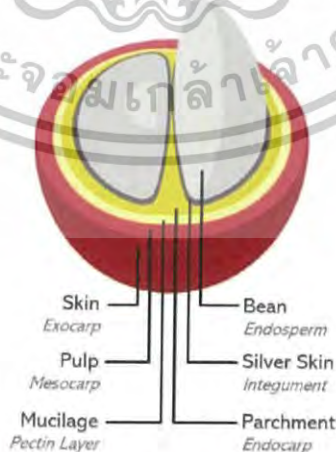
อังกฤษ : Arabica coffee, Brazilian coffee, Coffee tree; ฟิlipปินส์ : kafe; ฝรั่งเศส : caféier, café; เยอรมัน : Bergkaffee, Arabischer kafeebaum, Kaffeestrauch; อินโดนีเซีย : kopi; อิตาลี : caffee, arbusto de caffee; สเปน : cafeto, café; ไทย : gafe; เวียดนาม : cà phê (Orwa et al., 2019)

### 2.3.2 ชื่อทางวิทยาศาสตร์ (scientific name)

*Coffea arabica* (L.)

### 2.3.3 ลักษณะโดยทั่วไป

เป็นไม้พุ่มเขียวชอุ่มตลอดปี ขนาดต้นสูงได้ถึงประมาณ 8-10 เมตร มีกิ่งก้านสาขาที่ยาวและค่อนข้างเล็กยื่นออกมา ใบเป็นรูปไข่เรียงตรงข้ามกัน มีก้านใบที่สั้นขอบใบมีรอยหยักคล้ายลูกคลื่น และมีพื้นผิวของใบที่มันวาว โดยส่วนมากใบของต้นกาแฟสายพันธุ์นี้มีขนาดความยาวอยู่ที่ 10-15 เซนติเมตร และกว้าง 4-6 เซนติเมตร ดอกของต้นกาแฟมีสีขาวกลิ่นหอมหวานคล้ายดอกมะลิ รูปร่างคล้ายดาว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มบนก้านระหว่างใบอย่างหนาแน่น โดยสร้างกลุ่มดอกประมาณ 8-15 ดอก ส่วนผลกาแฟมีรูปร่างลักษณะกลมรีเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดงเมื่อสุกมีขนาดความกว้างอยู่ที่ 10-15 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 16-18 มิลลิเมตรผลของต้นกาแฟประกอบด้วยส่วนของพืวด้านนอกของผล (coloured exocarp) plup (mesocarp) และมีเมล็ดจำนวน 2 เมล็ดที่อยู่รวมกัน ซึ่งเมล็ดจะมีสีเหลืองอมเทาหรือเทาอมเขียว มีขนาดและรูปร่างที่หลากหลาย แตกต่างกันตามสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ โดยส่วนใหญ่จะยาวประมาณ 100 มิลลิเมตร กว้าง 6-7 มิลลิเมตร และหนา 3-4 มิลลิเมตร มีน้ำหนักอยู่ที่ประมาณ 0.10 กรัม และ 0.02 กรัม (Coste, 1992)



รูปที่ 2.6 ส่วนประกอบของผลกาแฟ

(ที่มา : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618314663>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

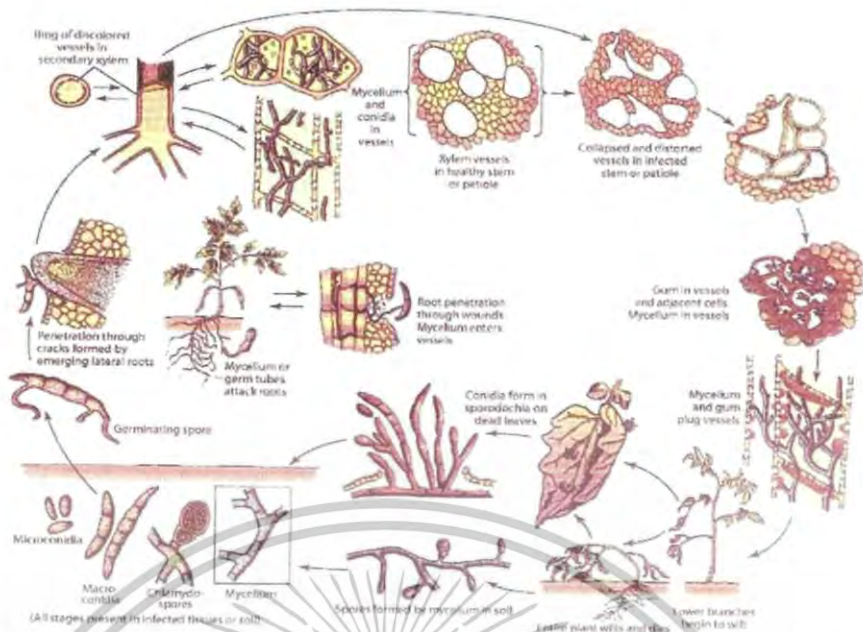
## 2.4 โรคที่พบในพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา (plant disease caused by fungi)

ราเป็นจุลินทรีย์ประเภทยูคาริโอตเซลล์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบได้ทั้งโครงสร้างของเส้นใยและเซลล์เดี่ยว มีลักษณะการเจริญที่ปลายเส้นใยและแตกแขนงออก ไม่มีคลอโรฟิลล์ ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และดูดซึมสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร สืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สามารถสร้างสปอร์ พบกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Moretti and Sarrocco, 2016) อีกทั้งเป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคในพืช พบว่าราสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้ทุกส่วน ใบ ราก ลำต้น ผล และเมล็ด โดยราก่อโรคสามารถติดเชื้อเข้าไปในพืชได้จากการที่พืชเกิดรอยแผลหรือพืชที่ไม่สมบูรณ์ และช่องทางเปิดทางปากใบเพื่อเพิ่มจำนวน รมีความสามารถรบกวนกระบวนการเผาผลาญของพืชและทำให้เกิดโรค (Labandeira and Prevec, 2014) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลผลิตทางการเกษตรอาจเกิดการปนเปื้อนได้จากการกระบวนการเก็บเกี่ยว การเตรียมการขนส่ง และการเก็บรักษา จากการศึกษาจุลินทรีย์ในผลของกาแฟและถั่วแสดงให้เห็นถึงรากกลุ่มหลักที่สร้างสารพิษได้แก่ *Aspergillus Penicillium* และ *Fusarium* spp. ซึ่งพบการปนเปื้อนในธรรมชาติ และพบได้ในคลังเก็บสินค้าเช่นเดียวกัน (Batista et al., 2003) จากการศึกษาครั้งนี้มีการมุ่งเน้นราในกลุ่ม *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี กัญชง และกาแฟ

### 2.4.1 *Fusarium* spp.

*Fusarium* spp. เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และก่อให้เกิดโรคในพืช (Lainhart et al., 2018) พบแพร่กระจายได้มากที่สุดในพื้นที่ปลูกธัญพืชทั่วโลก สามารถสร้างสารพิษได้หลากหลายชนิดและแพร่กระจายได้หลากหลายแบบเช่นเดียวกัน ปริมาณสารพิษที่เชื้อผลิตนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น สภาวะแวดล้อม ชนิดของผลผลิต วิธีการเก็บรักษา และลักษณะทางกายภาพของเชื้อ ตัวอย่างสารพิษที่พบใน *Fusarium* spp. มีความเป็นพิษสูงได้แก่ zearalenone fumonisins moniliformin และ trichothecenes ตัวอย่างของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้แก่ โรคข้าวสาลีเหี่ยวร่วงซึ่งเกิดจาก *Fusarium oxysporum* โรคเมล็ดข้าวโพดเน่าซึ่งเกิดจาก *Fusarium verticillioides* และศักยภาพของ *Fusarium* spp. ทั้งการสร้างสารพิษและการก่อโรคในพืช ทำให้เกิดปัญหาการเน่าเสียของผลผลิตทางการเกษตรและความปลอดภัยในอาหาร (Bullerman, 2003) จึงส่งผลต่อภาคอุตสาหกรรมเกษตรสามารถสร้างความสูญเสียทางผลผลิตในพืชเศรษฐกิจหลากหลายชนิด และเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องได้รับการแก้ไขและควบคุม เพื่อลดอันตรายของสารพิษต่อผู้บริโภคและลดการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 วัฏจักรของโรค *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Agrios, 2005)  
(ที่มา : <https://agronomie.info/en/2017/07/15/fusarium-wilt-tomato-disease-cycle-epidemiology/>)

## 2.5 การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีท

### 2.5.1 การจัดจำแนกด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์

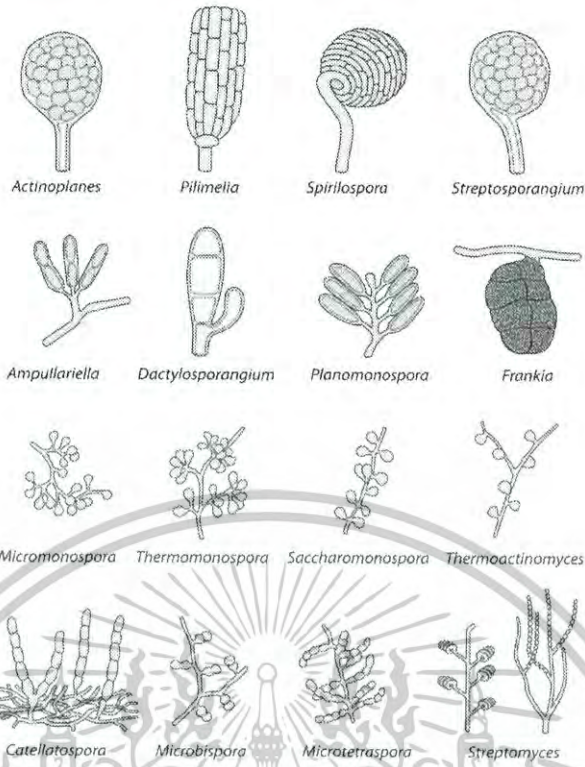
#### 2.5.1.2 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological classification)

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์แอกติโนมัยซีทในระดับสกุลและสปีชีส์คือการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์และการศึกษาทางเคมีอนุกรมวิธาน

#### 1. รูปร่างสปอร์

สัณฐานวิทยาของสปอร์มีความสำคัญอย่างยิ่งในอนุกรมวิธานของ actinobacteria รูปร่างของสปอร์สามารถนำมาใช้จัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ สปอร์นั้นมีหลากหลายรูปแบบแตกต่างกันออกไป สปอร์อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เช่น ในสกุล *Micromonospora* *Micropolyspora* และ *Thermoactinomyces* หรือสปอร์เกิดขึ้นที่เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เช่นในสกุล *Streptomyces* อาจพบสปอร์เดี่ยวหรือเป็นลูกโซ่ที่มีความยาวแตกต่างกัน มีทั้งรูปแบบการม้วนขดและเป็นเส้นตรงของสปอร์ บางชนิดอาจมีถุงหุ้มสปอร์และมีแฟลกเจลลามีสามารถเคลื่อนที่ได้เช่นในสกุล *Actinoplanes* และ *Actinosynnema* นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เองก็สามารถนำมาใช้เพื่อระบุลักษณะสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทได้ จากลักษณะพื้นผิวของสปอร์ที่เรียบลื่น กระปมกระเปาะ มีหนาม มีขน หรือย่น (Barka *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ภาพวาดสายสปอร์ประเภทต่างๆของแอคตินไมซีท (ที่มา : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051>)

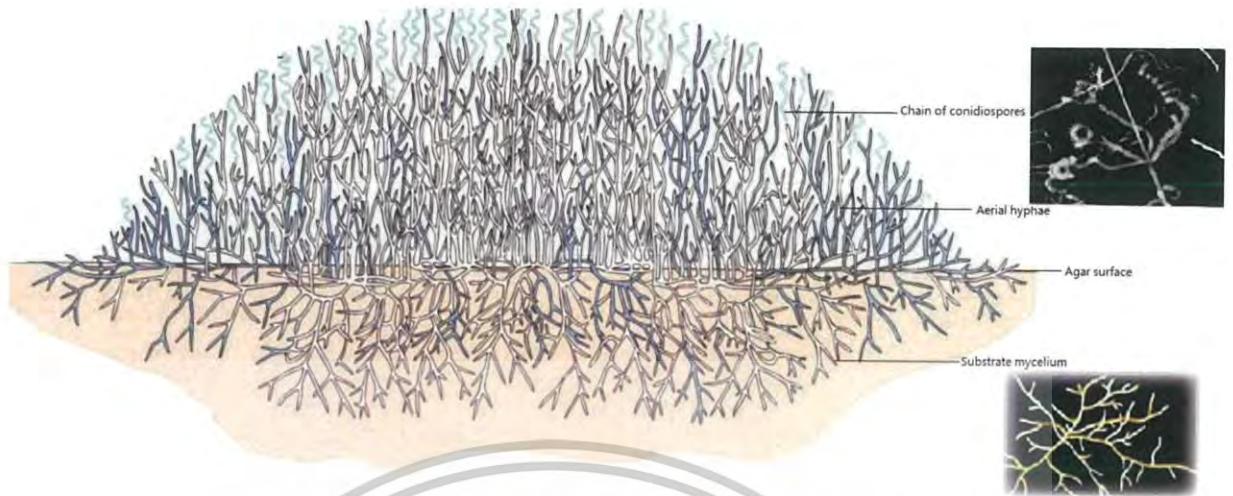
2. สiringควัตถุ

สารสiringควัตถุเกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แอคตินโนแบคทีเรียเป็นที่รู้จักว่ามีความสามารถการผลิตสารสีได้หลากหลาย เช่น สีแดง สีเหลือง สีส้ม ชมพู น้ำตาล น้ำตาลเข้ม น้ำตาลเขียว น้ำเงิน หรือดำ ซึ่งการสร้างสารสีขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ชนิดของอาหารที่ใช้ และอายุของเชื้อ รงควัตถุจะถูกสร้างในช่วงหลังการเจริญเติบโต ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ แต่มีบทบาทในการอยู่รอดและแข่งขัน

3. ลักษณะของเส้นใยและโคโลนี

การขึ้นเจริญของเส้นใยแอคตินโนแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับลักษณะของสายพันธุ์ ภาวะโภชนาการหรือปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมโดยแบ่งลักษณะเส้นใยที่พบเป็น เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เส้นใยที่อยู่เจริญติดกับบริเวณผิวดินหรืออาหารทำหน้าที่ดูดซับสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต สามารถแตกแขนงได้มาก เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่าโปร่งแสง เส้นใยเดี่ยวจะพบที่มีความหนาประมาณ 0.4–1.2 ไมโครเมตร และพัฒนามาเป็นเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เส้นใยที่อยู่ติดกับบริเวณพื้นผิวของโคโลนี มีหน้าที่หลักในการสืบพันธุ์ ซึ่งเส้นใยอากาศจะมีการพัฒนาเป็นสปอร์ที่มีผนังบาง คือ exospore หรือเจริญใน mother cell คือ endospore

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



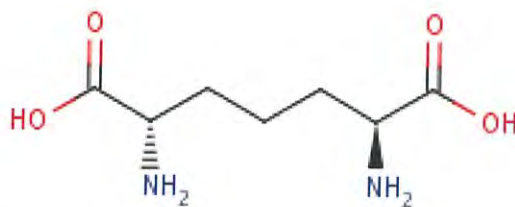
รูปที่ 2.9 การเจริญของแอคติโนมัยซีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลักษณะการเจริญของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และการสร้าง conidiospores)

(ที่มา : <https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/morphological-identification-of-actinobacteria>)

## 2.5.2 การตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานทางเคมี

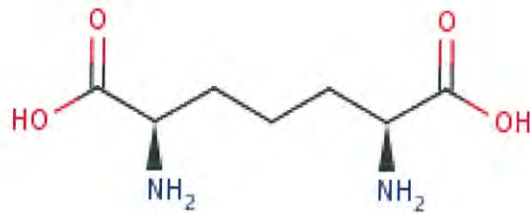
### 2.5.2.1 การวิเคราะห์กรดไดอะมิโนไพเมติกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid)

ลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปจะพบ peptidoglycan ที่ผนังเซลล์ ซึ่งเป็นประกอบด้วยโครงสร้างของสายคาร์โบไฮเดรตที่ ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาล Nacetylmuramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) โดยมีสายเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน เป็นสายสั้น ๆ ที่ช่วยให้โครงสร้างของ peptidoglycan ยึดติดกันเป็นรูปร่าง ลักษณะทางเคมีที่สำคัญของผนังเซลล์ที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกโดยชั้น peptidoglycan ของแอคติโนมัยซีทที่เรื้ออาจพบ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ในรูปแบบ LL-DAP หรือ DL-(meso) -DAP ขึ้นอยู่กับสกุลของเชื้อ



รูปที่ 2.10 โครงสร้าง LL-2,6-diaminopimelic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยสำนักพิมพ์ IntechOpen ภายใต้สัญญาอนุญาต Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License (ที่มา : <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16026>) ยินดีต่อการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 โครงสร้าง meso-2,6-diaminopimelic acid  
(ที่มา : <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16488>)

### 2.5.2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole cell sugar)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลมีความสำคัญในการการตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานทางเคมี โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียพบส่วนประกอบของน้ำตาลใน peptidoglycan คือ น้ำตาล N-acetylmuramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) น้ำตาลที่พบบนผนังเซลล์สามารถใช้จำแนกและพิสูจน์สายพันธุ์ของแบคทีเรีย การแบ่งโครงสร้างของน้ำตาลหลักที่พบในแอคติโนมัยซิสสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (Barka *et al.*, 2016)

กลุ่มที่ 1 ผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนสและกาแลคโตส

กลุ่มที่ 2 ผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลมาตูโรส (3-O-methyl-D-galactose)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ไม่มีรูปแบบเฉพาะของน้ำตาล

กลุ่มที่ 4 ผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนสและไซโลส

กลุ่มที่ 5 ผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและแรมโนส

### 2.5.2.3 การวิเคราะห์ไขมัน (Lipid)

ในโครงสร้างของเซลล์แอคติโนมัยซิสจะพบการกระจายตัวของฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ในเยื่อหุ้มเซลล์และในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม สามารถนำมาเป็นข้อมูลในการจำแนกและระบุชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สามารถตรวจสอบได้โดยสกัดไขมัน แล้วนำมาตรวจสอบชนิดของกรดไขมัน มีการรายงานว่าแอคติโนมัยซิสที่เรียกชื่เดียวกันจะพบประเภทฟอสโฟลิปิดชนิดเดียวกัน

### 2.5.3 การจำแนกด้วยลักษณะทางจีโนมไทป์

16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นหน่วยย่อยของ 30S ribosome (Wang *et al.*, 2015) และเป็นยีนที่ถูกนำมาใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ศึกษาและจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยซิส หลักการจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ

บนพื้นฐานตามเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์และกลุ่มของชนิดแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ เหตุผลที่นิยมใช้ 16S

rRNA gene เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของแอกติโนแบคทีเรียเพราะเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด เมื่อระยะเวลาผ่านไปมีการเปลี่ยนแปลงของยีนกลุ่มนี้น้อย (Jandac and Abbott, 2007)

## 2.6 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ (surface sterilization)

จุลินทรีย์มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ ในส่วนที่เป็นโทษนั้นจะก่อให้เกิดการสูญเสียและก่อความเสียหายได้หลายประการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีการที่จะควบคุมจุลินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านั้นเพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสีย ซึ่งก็มีด้วยกันหลากหลายวิธี อาทิเช่น วิธีการควบคุมหมายถึง การฆ่า (killing) การยับยั้ง (inhibition) และการกำจัดจุลินทรีย์ออกไป (removal) เป็นต้น

การกำจัดจุลินทรีย์หรือการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีหลายวิธีซึ่งอาศัยวิธีการทางฟิสิกส์ เคมี และการใช้สารปฏิชีวนะ การปนเปื้อนจุลินทรีย์ (การติดเชื้อ ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย) ภายในชิ้นส่วนพืชที่จะใช้ก่อนการนำไปใช้ นับว่าเป็นปัญหาสำคัญดังนั้นจึงมีวิธีการลดปริมาณการติดเชื้อจุลินทรีย์ ทำได้หลัก 2 วิธี

1. วิธีการทางฟิสิกส์ (physical method) เป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชโดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความร้อน รังสี การกรอง ความเย็นและความแห้ง เป็นต้น
2. วิธีการทางเคมี (chemical method) เป็นการใช้สารเคมีบางชนิด ที่มีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แต่ไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนพืช สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ สารเคมีที่มีองค์ประกอบของคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl) เนื่องด้วยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลายชนิด โดยนิยมใช้ทั้งในภาคอุตสาหกรรม ภาคการเกษตร ภาคการแพทย์ และภาคครัวเรือน

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิว (Surface sterilization) (Taechowisan *et al.*, 2003)

- เลือกตัดเนื้อเยื่อจากต้นพืชที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงและไม่แสดงอาการของโรคไม่ว่าจะเป็นส่วนใดของพืชก็ตาม จากนั้นนำชิ้นส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ล้างให้สะอาดโดยล้างด้วยน้ำเปล่าเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมา เช่น ดิน ทราย จุลินทรีย์
- นำไปแช่ใน 0.1% tween 20 เป็นเวลา 20 วินาที ซึ่งช่วยทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว จึงช่วยลดสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิว เช่น ดินและฝุ่นละอองได้ดี
- แช่ใน 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Sundram *et al.*, 2012)
- ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที เอทานอลเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารฉบับนี้มีความสำคัญหรือไม่ควรเปิดเผยแก่บุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แช่ในสารละลาย 10% sodium bicarbonate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา (Turkkan *et al.*, 2017)

## 2.7 หลักการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture

หลักการทั่วไปคือ เตรียมเชื้อราที่แยกได้โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) เป็นเวลา 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดวันแล้ว เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และย้ายมาลงในอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) ที่มีการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทไว้ก่อนแล้ว โดยวางห่างจากกัน 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบ 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเฉพาะเชื้อรา แล้ววัดรัศมีของการเจริญของเชื้อราและทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIGR) (Himaman *et al.*, 2016)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{PIGR} = \frac{(r_1 - r_2)}{r_1} \times 100$$

เมื่อ  $r_1$  = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานควบคุม

$r_2$  = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานทดสอบ



รูปที่ 2.12 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อแอกติโนมัยสีท CMUAc130 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 โดยวิธี dual culture หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิห้องเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

(ที่มา : <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023เปอร์เซ็นต์2FAเปอร์เซ็นต์3A1023901107182.pdf>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cao และคณะ (2004) ทำการแยกแอสโคสปอร์จากส่วนใบและรากของต้นกล้วยที่สมบูรณ์ และต้นกล้วยที่มีอาการเหี่ยวแห้งได้เป็นเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์จำนวน 242 ไอโซเลต ซึ่งส่วนมากจะอยู่ในสกุล *Streptomyces* โดย *Streptomyces griseorubiginosus* เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับความหลากหลายแล้ว เอนโดไฟติกแอสโคสปอร์ที่แยกได้จากต้นกล้วยที่มีอาการเหี่ยวแห้งค่อนข้างมีความหลากหลายกว่าต้นกล้วยที่สมบูรณ์ และการนำไปทดสอบในกิจกรรมการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensere* พบว่าสัดส่วนของเชื้อเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์สกุล *Streptomyces* ที่แยกได้จากรากของต้นที่มีสมบูรณ์เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ดีกว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์ในรากที่เหี่ยวแห้ง ( $P < 0.01$ ) แต่ในใบกลับไม่มีความแตกต่างกัน

Kafur และ Khan (2011) ได้แยกเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์โดยวิธีการพอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของใบต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthes roseus*) พบเชื้อเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์ทั้งหมด 38 ไอโซเลต ในบรรดา 38 ไอโซเลต มี 20 ไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างกันแล้วถูกนำไปทำการทดสอบกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Proteus vulgaris* และทดสอบกิจกรรมการต้านทานต่อเชื้อรา *Candida albicans* *Botrytis cinerea* *Curvularia lunata* *Fusarium oxysporum* *Fusarium solani* และ *Rhizoctonia solani* พบว่ามี 65 เปอร์เซ็นต์ ของไอโซเลตที่นำมาทดสอบแสดงฤทธิ์การต้านต่อจุลินทรีย์ ในจำนวน 20 สายพันธุ์ที่ทดสอบ มี 2 สายพันธุ์ คือ Cr-12 และ Cr-20 แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมการต่อต้านที่สูงสุด

ปราณี และคณะ (2552) คัดแยกจุลินทรีย์จากรากของต้นมะเขือเทศจำนวน 13 ตัวอย่าง โดยการใช้เทคนิค serial dilution spread plate ซึ่งสามารถแยกเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต แล้วนำไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่เป็นสาเหตุของโรคต้นเหี่ยวในมะเขือเทศบนอาหาร corn meal agar (CMA) พบว่ามี 2 ไอโซเลตที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในระดับที่ดี คือ PEACW 2 และ PEACW 18 และเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในต้นพืชต่อเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสายพันธุ์ PEACW 2 และ PEACW 18 มีความสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ดีที่สุดในผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอนโดไฟติกแอสโคสปอร์สายพันธุ์ PEACW 2 และ PEACW 18 มีศักยภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศ

Hong-Thao และคณะ (2016) ทำการแยกเอนโดไฟติกแอสโคสปอร์จากส้ม (*Citrus nobilis* Lour) ซึ่งเป็นผลไม้เชิงพาณิชย์ที่มีมูลค่าสูงในประเทศเวียดนาม ในกระบวนการเพาะปลูกและการผลิต ปัจจุบันพื้นที่ในการเพาะปลูกผลไม้ชนิดนี้กำลังเผชิญกับภัยคุกคามจากโรคร้ายแรงหลายชนิด ดังนั้นการหาสิ่งควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพใหม่จึงถือเป็นทางเลือกที่ดีเป็นเพื่อป้องกันการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในประโยชน์อื่นนอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในการศึกษาและส่งเสริมป้องกันพืชที่มากขึ้นไป เอนโดไฟติกแอสโคสปอร์เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางวิทยาศาสตร์อย่างมากเนื่องจากมีศักยภาพสูงทางด้านงานวิจัย ด้านการเกษตร และด้านเภสัชกรรม ในงานวิจัยนี้เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทถูกแยกได้จากส้มสายพันธุ์พื้นเมืองจากภูเขาทางตะวันออกเฉียงเหนือในจังหวัดเตวียนกวาง (tuyen quang) ในบรรดา 49 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต TQR12-4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum truncatum* *Geotrichum candidum* *Fusarium oxysporum* และ *F. udum* ได้เป็นอย่างดีและให้ผลผลิตมวลชีวภาพที่ค่อนข้างสูงบนพื้นผิวที่มีความแตกต่างกัน เช่น คาร์บอกซิลเมธิล เซลลูโลส แป้ง โปรตีน และไคติน อยู่ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 45 °C และพีเอชตั้งแต่ 4 ถึง 10 การวิเคราะห์ลำดับของยีน 16S rDNA พบว่า TQR12-4 มีความคล้ายคลึงกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ กับสกุล *Streptomyces prasinopilosus* แต่ก็ยังมีความแตกต่างทางรูปร่างสปอร์เล็กน้อยและด้วยเหตุนี้จึงถูกตั้งชื่อว่า *Streptomyces* sp. TQR12-4 และยังสามารถผลิตสารต้านเชื้อราที่ต่อต้านความรื้อน (nonpeptide) ในธรรมชาติ MIC เทียบกับ *Fusarium udum* 100 µg / mL และ 400 µg / mL ตามลำดับเพื่อแยกเศษส่วน X<sub>4</sub> และ X<sub>5</sub>

Gangwar และคณะ (2011) ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทซึ่งถูกจัดว่ามีแนวโน้มเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่ถูกใช้ด้านการเกษตรและสามารถแยกออกได้จากพืชหลากหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท 40 ไอโซเลต ออกจาก ราก ลำต้น และใบของพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ *Aloe vera* *Mentha arvensis* และ *Ocimum sanctum* พบว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่จัดเป็นเป็นสกุล *Streptomyces* spp. ส่วนที่เหลือถูกระบุว่าเป็น *Saccharopolyspora* spp. *Micromonospora* spp. และ *Actinopolyspora* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท 9 ไอโซเลต แสดงถึงกิจกรรมการต้านเชื้อราทั้ง 9 ตัว ที่ก่อโรคราก และ 8 ไอโซเลต (90 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราอย่างน้อยหนึ่งตัว และ *Saccharopolyspora* 0-9 (จาก 8 ไอโซเลต 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรครากอย่างน้อยหนึ่งตัว) และ *Saccharopolyspora* 0-9 แสดงกิจกรรมที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Aspergillus niger* *Aspergillus flavus* *Alternaria brassicicola* *Botrytis cinerea* *Penicillium digitatum* *Fusarium oxysporum* *Penicillium pinophilum* *Phytophthora dresclea* และ *Colletotrichum falcatum*

Kunasakdakul และคณะ (2012) ได้รวบรวมพืชผักที่มีอาการเกิดโรคเพื่อคัดแยก จำแนก และทดสอบการก่อโรคของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช โรคใบจุดในคะน้า (*Alternaria brassicicola*) โรคใบจุดในกะหล่ำปลี (*Alternaria brassicae*) โรครากเน่าในคะน้า (*Sclerotium* sp.) โรคเน่าเปื่อยในคะน้า (*Choanephora* sp.) และโรคเหี่ยวในผักกาดหอม (*Fusarium* sp.) เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท 11 ไอโซเลต ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรชนิดนี้ KAE1 GAL1 GLI1 BER1 NEE1 KMI1 FIT2 FIT3 และ FIT5 ถูกจัดเป็นสกุล *Streptomyces* sp. HOU1 เป็นสกุล *Nocardioideis* และ LEM1 เป็นสกุล *Nocardioopsis* ทั้งหมดถูกใช้ทดสอบประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เชื้อราที่กล่าวถึงข้างต้น ด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อแบบ dual culture นอกจากนี้ยังได้ทำการ  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นับว่าผูกพัน  
ประเมินผล ความยาวของราก ความสูงของต้น และน้ำหนักของต้นอ่อน เราพบว่าในบรรดา 11 ไอโซ  
ไมวาร์ณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำใบ

เลต KAE1 GAL1 และ LEM1 แสดงให้เห็นถึงความประสิทธิภาพในควบคุมโรคพืชได้เป็นอย่างดี สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงต่อเชื้อรา *Fusarium* (เชื้อโรคนดิน) และ *Choanephora* และ *A. brassicae* (เชื้อโรคที่เกิดจากอากาศ) มี FIT5 เพียงหนึ่งไอโซเลตเท่านั้นที่แสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งค่อนข้างสูงต่อเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด ส่วนไอโซเลต HOU1 มีความสามารถในการพัฒนาความยาวรากของต้นกล้า ผักกาดขาวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมแบบไม่ถูกควบคุมและไอโซเลตนี้ถูกจัดว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดกว่าไอโซเลตอื่น ยกเว้นไอโซเลต FIT5 และ HOU1 ที่ยังแสดงให้เห็นว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดใน *Sclerotium* และเชื้อโรคนดิน

Getha และ Vikineswary (2002) *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เป็นเชื้อก่อโรคสาเหตุของโรคเหี่ยวของกล้วยและยังมีการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ *Streptomyces violaceusniger* สายพันธุ์ G10 เป็นตัวแทนแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านเชื้อราเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในพืชหลากหลายชนิด รวมถึง *Fusarium* หลายสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช ในความพยายามศึกษาทำความเข้าใจวิธีการต่อต้านในธรรมชาติและปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *S. violaceusniger* สายพันธุ์ G10 และ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* โดยการนำมาจับคู่เลี้ยงและบ่มร่วมกันในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลักฐานการเกิดการต่อต้านในจานเพาะเชื้อของสายพันธุ์ G10 ถูกทดลองโดยการทำให้เกิดโซนการยับยั้งด้วยวิธี cross-plug assay การสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นการสลายของเส้นใยของเชื้อรา ในบริเวณที่ถูกยับยั้ง การเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้ผลิตเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีผลในการต่อต้านเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* เช่น บวมที่ผิดปกติ การแตกเส้นใยมากเกินไปและยับยั้งการงอกของสปอร์ วิธีการตรวจวัดทางอ้อมถูกใช้เพื่อแสดงให้เห็นถึงกลไกการต่อต้านและเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อสายพันธุ์ G10 ที่ต่อต้าน *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่พบในดิน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นศักยภาพในการพัฒนาของการพัฒนาสายพันธุ์ G10 สำหรับใช้ในตัวควบคุมทางชีวภาพของโรคเหี่ยวในกล้วยที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium*

Faheem และคณะ (2015) โรสแบคทีเรียมีฤทธิ์ต้านเชื้อราในวงกว้างได้ทำการแยกออกจากบริเวณรากของต้นแตงกวาที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวที่เกิดจาก *Fusarium* จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการบนพื้นฐานตามเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันแสดงให้เห็นว่า แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย 99 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนคล้ายคลึงร่วมกับสายพันธุ์ *Streptomyces goshikiensis* ในสายพันธุ์นี้ได้ตั้งรหัสเป็น *S. goshikiensis* YCXU และในการทดลองในจานทดลองพบแนวยับยั้งที่กว้างต่อเชื้อรา ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช (phytopathogenic fungi) ดังนั้นจึงถูกเลือกมาศึกษาลักษณะเฉพาะของ *S. goshikiensis* YCXU สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน และแสดงให้เห็นถึงการย่อย b-1,3- glucanase และการสร้าง

เอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ urease สายพันธุ์นี้มีความสามารถเจริญได้ดีที่สุดในพีเอช 7 อนุกรม 28 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 1 เปอร์เซ็นต์ การผลิตสารไม่วากรัมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามหมักดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านเชื้อราสามารถแพร่และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีความจำเพาะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค ในการทดลองของโรงเรือนโรงเรือน ปลุกต้นแตงโมพบน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและการเกิดโรคเหี่ยวจาก *Fusarium* ลดลง 67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสายพันธุ์นี้ถูกเสริมเพิ่มความเข้มข้นด้วยปุ๋ยชีวภาพในดินปลุกต้นอ่อนและดินกระถาง การเลี้ยงด้วย both nursery soil และ pot soil (NS) แสดงให้เห็นถึงจำนวนต้นที่ไม่เป็นโรค 88.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับตัวควบคุม การใช้ biocontrol เป็นตัวลดเอนไซม์ตัวบ่งชี้ความเครียดและมาโลนาลดีไฮด์เป็นที่น่าพอใจ 55–70 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเทียบกับตัวควบคุม การทำ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในโครงสร้างของเชื้อราและแบคทีเรีย ทุกกลุ่มที่ใช้ในการทดลองเป็นผลมาจากการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. goshikiensis* YCXU อาจมีความสามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงโมที่เกิดจาก *Fusarium*

Wenna Shan และคณะ (2018) เอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทมีความหวังว่าจะเป็นแหล่งของสารที่มีความแปลกใหม่ โดยมีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพต้นชา (*Camellia sinensis*) สามารถผลิตสารเคมีตามธรรมชาติ (phytochemicals) ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับคุณสมบัติทางยาและโภชนาการหลายประการ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบวิจัยเกี่ยวกับความสมบูรณ์และความหลากหลายของการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในต้นชายังไม่เป็นที่กระทำได้ การศึกษาครั้งนี้พบว่าการแยกแอกติโนมัยซีทที่เรียทั้งหมด 46 ตัวอย่างจากใบต้น ลำต้น และรากของตัวอย่างชา 15 สายพันธุ์ ในจังหวัดฝูเจี้ยน ประเทศจีน ความสมบูรณ์และความหลากหลายของพวกเชื้อแสดงให้เห็นว่าได้รับอิทธิพลจากทั้งจีโนมไทป์และชนิดเนื้อเยื่อของต้นชา จากการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA gene ไอโซเลตเหล่านี้ถูกจัดกลุ่มเป็น 11 วงศ์ และ 13 สกุล คือ *Streptomyces Actinomadura Kribbella Nocardia Kytococcus Leifsonia Microbacterium Micromonospora, Mobilicoccus Mycobacterium Nocardiosis Piscicoccus* และ *Pseudonocardia Streptomyces* เป็นสกุลที่พบแพร่หลายที่สุดในขณะที่สกุลจำพวกหายาก *Mobilicoccus* และ *Piscicoccus* ถูกรายงานเป็นครั้งแรกว่าเป็นเอนโดไฟต์ของพืช การคัดกรองโดยใช้ยีน PCR screening of polyketide synthase genes (PKS-I และ PKS-II) และ nonribosomal peptide synthetase genes (NRPS) รวมถึงการศึกษาสารต้านจุลชีพที่ต้านแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรค แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่เกี่ยวข้องกับชาว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารต้านจุลชีพ นอกจากนี้การผลิตกรดอินโดลอะซิติก (IAA) และ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ถูกบันทึก 93.5 และ 21.7 เปอร์เซ็นต์ ของทุกสายพันธุ์ตามลำดับ โดยรวมแล้วผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากต้นชา เป็นแหล่งของสารที่มีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีคุณค่าและคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียเชื้อราและการส่งเสริมเจริญเติบโตของพืช

Taechowisan และคณะ (2002) แอกติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นยูคาริโอตเซลล์ จากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่นานกว่านี้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบโครงสร้างของเส้นใยด้วยเหตุนี้จึงคล้ายคลึงกับรา แอกติโนมัยซีทไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งหาว่ามีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีท ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่พบในดินซึ่งมีบทบาทในการหมุนเวียนคาร์บอนและไนโตรเจน ยกเว้นสมาชิกในสกุล *Frankia* เนื่องจากแบคทีเรียในสกุลนี้มีทั้งดำรงชีวิตแบบอิสระและดำรงชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytes) ซึ่งรวมตัวกันเป็นก้อนอยู่ในต้นพืช อย่างไรก็ตามรายงานเหล่านี้ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรากฏขึ้นเป็นเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ใช้ในรายงานหลายฉบับกล่าวถึงกิจกรรมหรือความสามารถของเชื้อเอนโดไฟต์ ในการป้องกันต้นพืชให้สามารถต้านทานเชื้อโรคและการกระบวนกรเผาผลาญอาหารให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชและลักษณะทางสัณฐานวิทยา และในรายงานอื่น ๆ อ้างถึงการมีปฏิสัมพันธ์ทางพยาธิวิทยาของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทกับพืช การทดลองนี้ให้ความสนใจในการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของ เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ เป็นสารกำจัดและควบคุมศัตรูพืชจากเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ในปัจจุบันยาปฏิชีวนะและสารต้านเชื้อราที่ผลิตจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทยังไม่เป็นที่รู้จัก การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นวิธีการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อพืชที่มีสุขภาพสมบูรณ์ไม่เป็นโรค การจำแนกแอกติโนมัยสีท และการประเมินฤทธิ์ในการต้านเชื้อราจากสารทุติยภูมิของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกออกมาได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ

1. ตู้ชีวนิรภัย (laminar air flow)
2. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
3. ตู้อบฆ่าเชื้อ 180 องศาเซลเซียส (hot air oven)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
5. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
6. ตู้แช่สารเคมีและตัวอย่าง (refrigerate)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ - 80 องศาเซลเซียส (ultra low temperature)
8. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
9. เลนส์ส่องระยะไกลกำลังขยาย 40 เท่า (long working distance objective lens)
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler)
11. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
12. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nanodrop spectrophotometer)

#### 3.2 สารเคมี

1. กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ )
2. โพแทสเซียมไนเตรต ( $KNO_3$ )
3. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )
4. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
5. ไอรอนซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. วุ้น (agar)
7. นมขาดมันเนย (skim milk)
8. สารปฏิชีวนะนิสตาติน (nystatin)
9. สารปฏิชีวนะกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid)
10. สารละลาย 0.2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.2 NaOH)
11. ไดมethyl ซัลไฟด์ (dimethyl sulfoxide)
12. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
13. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)
14. น้ำกลั่น (distilled water)
15. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% NaClO)
16. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% NaHCO<sub>3</sub>)
17. ทวิน 20 (polysorbate 20)
18. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 (alcohol 70%)
19. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (alcohol 95%)
20. เดกซ์โตรส (dextrose)
21. สารสกัดจากมันฝรั่ง (potato infusion)
22. แคลเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต (CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)
23. แคลเซียมไบคาร์บอเนต (Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)
24. โพแทสเซียมซัลเฟต (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
25. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
26. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub>)
27. กรดเคซามิโน (casamino acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรท ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )
30. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
31. โคบอลต์ (II) คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรท ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )
32. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพนตะไฮเดรท ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )
33. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรท ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )
34. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรท ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )
34. สารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 35 (sulfuric acid 35%)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า *Coffea arabica* (L.) โดยเลือกส่วน ใบ ราก และผล จาก 3 แหล่ง ได้แก่ ชุมชนกาแฟดงมะไฟจังหวัดนครราชสีมา ไร่กาแฟขุนนันทจังหวัดราชบุรี และหมู่บ้านแม่คำหล้าจังหวัดลำปาง ล้างทำความสะอาดตัวอย่างแต่ละส่วนด้วยน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้งสนิท แล้วนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพก่อนนำไปทำการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสิต

#### 3.3.2 การแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสิต

นำตัวอย่างของต้นกาแฟ คือส่วน ใบ ราก และผล ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วมาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิวด้วย กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterile) โดยหั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงในตะกร้อกรองขนาดเล็กประมาณ 4-5 ชิ้น ชั้นแรกนำตัวอย่างไปแช่ใน 0.1% tween 20 เป็นเวลา 30 วินาที ถัดมาแช่ใน 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3-6 นาที ขึ้นอยู่กับความแข็งและหนาของเนื้อเยื่อ จากนั้นล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 5 นาที นำไปแช่ต่อใน 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายนำตัวอย่างแช่สารละลาย 10% sodium bicarbonate เป็นเวลา 10 นาที และจุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีก 3 ครั้ง เพื่อให้สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ฟอกที่ติดอยู่ออกไปให้หมด โดยต้องเก็บน้ำล้างตัวอย่างครั้งที่ 3 ไว้ทำการ spread plate ลงบนไมวากรณิเดย์ ฟังสน อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร SCN (starch casein nitrate agar) ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมโดยใช้ปริมาณ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน นำชิ้นส่วนตัวอย่างวาง ลงบนกระดาษหิซุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างที่แห้งแล้วลงในโถงทั้งหมด โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดและทำการ spread plate โดยใช้ ปริมาตรตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ปิเปตลงบนอาหาร SCN (starch casein nitrate agar) ที่เติมสาร ปฏิชีวนะนิสตาติน (nystatin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

### 3.3.3 การคัดเลือกและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

เมื่อบ่มเชื้อในอาหาร SCN (starch casein nitrate agar) ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ นิสตาติน (nystatin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วันแล้ว ทำการ เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีท คือ โคโลนีรูปร่างกลมจมอยู่ในอาหารที่เจริญอยู่ การ ยกตัวของโคโลนีอาจแบนราบหรือนูน ผิวด้านบนของโคโลนีมีลักษณะด้าน ไม่มันวาว ขอบมีตั้งแต่ขอบ เรียบหรือหยัก โดยนำเข็มเขี่ยเชื้อมาแตะโคโลนีที่ต้องการเลือกแล้วนำไป cross streak ลงบนอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) ที่เติมสารปฏิชีวนะนิสตาติน (nystatin) และกรดนาลิดิ ซิก (nalidixic acid) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่ทำการขีดไว้ก่อน หน้านี้ด้วยวิธี cross streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาฤทธิ์ ทางชีวภาพต่อไป

### 3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ต่อการต้านเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทลงบนอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) เป็นระยะเวลา 14 วัน และเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด ของเชื้อแต่ละชนิดแล้วให้นำที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มา เจาะเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่เลี้ยงไว้แล้วนำไปวางลงบนอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) และเจาะเชื้อราที่เลี้ยงแล้วนำมาวางลงบนอาหาร ISP2 ในจานเพาะเชื้อเดียวกัน โดยที่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า วางให้ระยะห่างระหว่างเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทและเชื้อราอยู่ที่ประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นบ่ม

ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน หากมีการต้านต่อเชื้อราจะเห็นเป็นบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) แล้วจึงตรวจสอบผลที่ได้โดยการวัดรัศมีของเชื้อราแล้วนำไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent Inhibition of radial growth) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(r_1 - r_2)}{r_1} \times 100$$

เมื่อ  $r_1$  = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานควบคุม

$r_2$  = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานทดสอบ

### 3.3.5 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของแอสคิโนมัยซีทเบื้องต้น

#### 3.3.5.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)

##### 1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological observations)

นำเอนโดไฟติกแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้มาทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) ระยะเวลา 14 วัน นำไปตรวจดูการรูปร่างสปอร์ต่อการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า

##### 2. การศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristics)

นำเอนโดไฟติกแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้มาทำการตรวจสอบลักษณะการเจริญของเอนโดไฟติกแอสคิโนมัยซีทโดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร ISP2 (yeast extract-malt extract agar) ระยะเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และสิ่งรบกวน โดยนำไปเทียบกับระดับสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system, Mundle 1995)

#### 3.3.5.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

##### 1. การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอสคิโนมัยซีทเบื้องต้น

การสกัดดีเอ็นเอ สารเคมีผสมสำหรับการทำในขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็น

สารผสมที่มาจากบริษัท BIONEER ที่มีความเข้มข้นและปริมาตรดังตาราง 3.1 เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอสคิโนมัยซีทในอาหารแข็ง ISP2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ย

เชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อชุดโคลนนี้เติวขึ้นมา ใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิตร เติม TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อชุดโคลนนี้ให้แตกออกจากกัน ดูดของเหลวในหลอดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายที่สกัดได้ใส่ลงในหลอดสารเคมีผสม โดยปริมาตรรวมในหลอดจะเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ทำให้สารละลายในหลอดผสมเข้ากันแล้ว แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (thermal cycler) โดยใช้วงจรพีซีอาร์ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 9F	10.0 pmol/ $\mu$ l	5.0 $\mu$ l
Primer : 1541R	10.0 pmol/ $\mu$ l	5.0 $\mu$ l
Master mix	2.0 mM	25.0 $\mu$ l
Water		13.0 $\mu$ l
Template DNA	100 - 200 ng/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
รวม		50 $\mu$ l

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycle)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Pre-denaturation
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35	Denaturation
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที		Annealing
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		Extension
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1	Final extension
รวมเวลาดังกล่าว : 1 ชั่วโมง 18 นาที			

การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA เสร็จสิ้นแล้ว จะนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ PCR Purification Kit ซึ่งทำ

โดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ ที่มี FADDF buffer เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ปริมาตร 235 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ในคอลัมน์ FADDF column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ไม่ว่างเว้นใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กอันใหม่เติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการของคู่สิ่งมีชีวิต หาลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน 16S rRNA gene ทำโดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท 1<sup>ST</sup> Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย จำนวน 12 ไอโซเลต โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของยีน 16S rRNA gene จะมีขนาดประมาณ 1,550 คู่เบส จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยระบบชีวสารสนเทศหรือไบโออินฟอร์เมติกส์ โดยขั้นตอนแรก BLAST (basic local alignment search tool) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA gene ที่ต้องการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล จาก EzBioCloud ถัดมา Alignment เพื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้นโดยใช้โปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2.5.0 และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) เพื่อให้ทราบข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับสายวิวัฒนาการและการเชื่อมโยงสายวิวัฒนาการของคู่สิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ตามด้วยสิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากขึ้นตามลำดับวิธีของ NJ (neighbor-joining method) ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากต้นกาแฟ

จากการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในตัวอย่างต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าทั้ง 9 ต้น ที่เก็บจากพื้นที่แหล่งเพาะปลูกใน 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ ราชบุรี นครราชสีมา และลำปาง ซึ่งแบ่งชิ้นส่วนตัวอย่างที่นำมาออกเป็น 3 ส่วน คือ ราก ใบ และผลของต้นกาแฟ แล้วสามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้จำนวน 32 ไอโซเลต รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชิ้นส่วนพืช	ไอโซเลต	รวม
ราชบุรี	ราก	CARR101, CARR102, CARR201, CARR202, CARR203, CARR204, CARR205, CARR206, CARR207	9
	ใบ	-	-
	ผล	-	-
นครราชสีมา	ราก	CANR101, CANR102, CANR103, CANR104, CANR105, CANR106, CANR201, CANR301, CANR302, CANR303	10
	ใบ	-	-
	ผล	CANC201, CANC202	2
ลำปาง	ราก	CALR101, CALR102, CALR103, CALR104, CALR105, CALR106, CALR107, CALR108, CALR109, CALR110, CALR111	11
	ใบ	-	-
	ผล	-	-

จากผลการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟ พบว่าส่วนของต้นกาแฟที่สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้มากที่สุด คือ ราก จำนวน 30 ไอโซเลต (ร้อยละ 94) ผล จำนวน 2 ไอโซเลต (ร้อยละ 6) และไม่พบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกจากเนื้อเยื่อในส่วนใบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยของแอกติโนมัยสีทตามธรรมชาติที่พบมากที่สุด คือ ดิน ดังนั้นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยสัที่อาศัยอยู่จึงสามารถเข้าไปสู่เนื้อเยื่อพืชที่มีความใกล้ชิดกับดินมากที่สุด (Kaur *et al.*, 2015) จากในผลการวิจัย คือ ราก ถัดมาเป็น ผล ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยของ Oliveira และคณะ (2013) สามารถพบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากผลกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอกติโนมัยสัที่เหล่านี้สามารถเข้าสู่พืชได้ทางบริเวณช่องเปิดของพืชได้ เช่น บาดแผลในพืช หรือ ปากใบของพืช แม้กระทั่งในระหว่างการงอกเมล็ดและการออกดอก (Hardoim *et al.*, 2008) จากผลการวิจัยนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan และคณะ (2003) ที่ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จากพืช 36 ชนิด ซึ่งรวมถึงกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) ได้เป็นเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จำนวน 330 ไอโซเลต โดยพบจากเนื้อเยื่อบริเวณรากมากที่สุด (ร้อยละ 64) รองลงมาคือเนื้อเยื่อบริเวณใบ (ร้อยละ 29) และเนื้อเยื่อบริเวณลำต้น (ร้อยละ 6) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rao และคณะ (2015) ที่สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จากต้นอวดเชือก (*Combretum latifolium* Blume) ได้ 117 ไอโซเลต พบจำนวนไอโซเลตของเชื้อมากที่สุดที่บริเวณราก (ร้อยละ 55) รองลงมาเป็นเนื้อเยื่อบริเวณลำต้น (ร้อยละ 27) และพบน้อยที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนของใบ (ร้อยละ 19) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Verma และคณะ (2009) ที่แยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จากต้นสะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss) จำนวน 20 ต้น ได้ 55 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากรากมากที่สุด (ร้อยละ 55) รองลงมาเป็น ลำต้น (ร้อยละ 24) และใบ (ร้อยละ 22) ตามลำดับ แต่ในผลการวิจัยนี้ไม่พบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จากใบเหมือนกับงานวิจัยอื่น ซึ่ง Conti และคณะ (2012) ได้รายงานไว้ว่า สามารถพบเอนโดไฟต์ในบริเวณใบของพืชได้น้อยมาก และขึ้นอยู่กับอายุของใบที่นำมาใช้แยกด้วยเช่นกัน โดยที่ผลการวิจัยนี้ไม่ได้นำส่วนของลำต้นมาทำการทดลองอย่างงานวิจัยท่านอื่น ๆ

#### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านต่อเชื้อราด้วยวิธี Dual culture

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านต่อเชื้อราโดยการเพาะเลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่และเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว *Fusarium* spp. ร่วมกันด้วยวิธี dual culture พบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว (*Fusarium* spp.) ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ CARR205 CANR101 CANR102 CANR106 CANR303 CALR101 CALR106 และ CALR110 จากทั้งหมด 32 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1-4.3) คิดเป็นร้อยละ 25 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kunasakdakul และคณะ (2012) ที่ทำการทดสอบต้านต่อเชื้อราโรคเหี่ยวในผักกาดหอม (*Fusarium* sp.) ด้วยวิธี dual culture เช่นเดียวกัน พบว่ามีเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่จำนวน 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 11 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Fusarium* sp. คิดเป็นร้อยละ 27 ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกันกับผลที่ได้จากการทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ปราณี และคณะ (2552) ที่ทำการคัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคต้นเหี่ยวใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำออกไปใช้ในประโยชน์อื่นใดได้โดยไม่ได้รับความเห็นชอบจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่าผลที่ได้จากการทดลองเล็กน้อย (มากกว่าร้อยละ 5) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gangwar และคณะ (2011) พบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากพืชสมุนไพรจำนวน 9 ไอโซเลตจาก 40 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Fusarium oxysporum* (ร้อยละ 23) เมื่อเทียบกันแล้วในผลการทดลองพบไอโซเลตที่ยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคมากกว่าที่พบในงานวิจัยร้อยละ 5 นอกจากนี้งานวิจัยของ Taechowisan และคณะ (2002) ได้แยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียจากพืชสมุนไพรและไม้ยืนต้นรวมทั้งต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าได้ทั้งหมด 330 ไอโซเลต และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี dual culture กับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่ามีเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียร้อยละ 35 จากไอโซเลตทั้งหมดที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ มากกว่าที่พบจากการทดลองครั้งนี้ร้อยละ 7

ซึ่งจากผลการทดสอบฤทธิ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่แยกได้การต้านต่อเชื้อราโรคต้นเหี่ยวนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva และคณะ (2012) ที่ได้รายงานว่า จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่พืชที่อาศัยอยู่ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rao และคณะ (2015) ที่กล่าวว่า เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และฮอร์โมนพืช ที่มีศักยภาพในการควบคุมทางชีวภาพได้

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากต้นกาแฟจังหวัดราชบุรีต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว

Isolates	ราที่ใช้ทดสอบ				
	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 1	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 2	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 3	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 4	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 5
CARR101	0.00%±2.5	0.00%±0.5	0.00%±1.2	0.00%±1.4	0.10%±0.5
CARR102	2.24%±2.3	2.88%±0.6	2.87%±0.8	2.36%±1.2	0.27%±1.2
CARR201	0.00%±0.7	0.00%±0.9	0.00%±1.0	0.00%±0.8	0.00%±1.1
CARR202	0.00%±0.9	0.00%±0.7	0.00%±1.3	0.04%±0.5	0.00%±0.5
CARR203	0.37%±0.9	8.17%±1.2	10.08%±0.5	10.49%±1.3	9.59%±0.4
CARR204	0.00%±1.2	11.76%±0.9	7.50%±0.4	10.19%±0.9	8.98%±0.6
CARR205	22.05%±0.3	18.87%±1.2	20.41%±0.6	20.39%±0.8	19.34%±0.4
CARR206	0.00%±0.4	0.00%±0.8	0.00%±0.6	0.00%±0.8	0.00%±0.8
CARR207	0.00%±0.8	0.00%±0.9	0.00%±1.4	0.00%±0.8	0.00%±2.0

กำหนดให้ ต่ำกว่า 21.00% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ, มากกว่า 21.00 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (Khucharoenphaisan *et al.*, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่แยกได้จากต้นกาแฟจังหวัดนครราชสีมาต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว

Isolates	ราที่ใช้ทดสอบ				
	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 1	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 2	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 3	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 4	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 5
CANC201	0.01%±0.6	8.21%±0.7	7.81%±0.8	9.16%±0.5	0.02%±0.2
CANC202	0.87%±0.2	0.85%±0.6	1.72%±0.7	4.74%±0.2	3.17%±0.6
CANR101	22.20%±0.9	21.00%±0.6	19.87%±1.0	22.65%±0.9	23.51%±0.8
CANR102	11.33%±0.9	23.10%±0.6	13.45%±0.3	28.41%±0.3	15.39%±0.9
CANR103	0.00%±0.2	0.00%±0.6	0.00%±1.4	0.00%±1.2	0.00%±1.6
CANR104	0.00%±0.8	0.00%±1.1	0.00%±0.6	0.00%±0.5	0.00%±0.6
CANR105	0.00%±0.4	0.00%±1.2	0.00%±0.7	0.00%±0.1	0.00%±0.9
CANR106	16.68%±0.4	42.91%±0.4	16.23%±0.1	21.36%±0.1	15.82%±0.2
CANR201	1.77%±0.6	0.95%±0.6	1.65%±1.5	1.29%±0.6	1.05%±0.9
CANR301	0.00%±0.9	0.00%±0.1	0.00%±0.4	0.00%±0.6	0.00%±0.7
CANR302	0.00%±0.6	0.00%±0.5	0.00%±0.6	0.00%±1.7	0.00%±0.4
CANR303	24.69%±1.2	29.30%±0.5	27.66%±0.2	25.52%±0.5	17.86%±0.6

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (% inhibition) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่แยกได้จากต้นกาแฟจังหวัดลำปางต่อราที่ก่อโรคต้นเหี่ยว

Isolates	ราที่ใช้ทดสอบ				
	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 1	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 2	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 3	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 4	<i>Fusarium</i> sp. Isolate 5
CALR101	17.24%±0.4	42.07%±0.3	33.52%±0.3	41.87%±1.2	36.42%±0.2
CALR102	0.00%±0.8	0.00%±1.7	0.00%±0.6	0.00%±1.9	0.00%±0.4
CALR103	0.00%±0.8	0.00%±1.1	0.00%±1.2	0.00%±1.3	0.00%±0.3
CALR104	0.00%±0.6	0.00%±0.6	0.00%±0.8	0.00%±0.3	0.00%±1.6
CALR105	0.00%±1.2	0.00%±1.5	0.00%±0.6	0.00%±0.5	0.00%±1.1
CALR106	18.95%±0.5	21.53%±0.9	21.66%±0.9	28.86%±0.3	21.06%±0.1
CALR107	0.00%±0.7	0.00%±0.7	0.00%±0.7	0.00%±0.6	0.00%±0.5
CALR108	0.00%±0.7	0.00%±0.4	0.00%±0.6	0.00%±0.6	0.00%±0.7
CALR109	13.45%±0.7	17.81%±1.0	12.74%±0.7	16.85%±0.8	20.87%±0.7
CALR110	38.29%±0.3	41.68%±0.6	38.64%±0.2	39.07%±0.8	36.13%±0.8
CALR111	0.00%±1.9	0.00%±1.2	0.00%±0.7	0.00%±0.7	0.00%±0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล (genus) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ โดยคัดเลือกจากการควบคุมทางชีวภาพ (biology activity) และลักษณะทางกายภาพ (morphological) เพื่อนำมาศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาจำนวน 12 ไอโซเลต จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลต ที่มาจากการคัดเลือกผลการควบคุมทางชีวภาพจำนวน 6 ไอโซเลต และคัดเลือกจากลักษณะทางพื้นฐานวิทยา (morphology) อีก 6 ไอโซเลต เป็นแอกติโนมัยสีทที่จัดอยู่ใน 5 วงศ์ (family) ได้แก่ *Kribbellaceae* *Nocardiaceae* *Streptomycetaceae* *Streptosporangiaceae* และ *Thermomonosporaceae* แบ่งเป็น 5 สกุล (genus) ได้แก่ *Actinomadura* (1 ไอโซเลต) *Kribbella* (1 ไอโซเลต) *Microbispora* (1 ไอโซเลต) *Nocardia* (1 ไอโซเลต) และ *Streptomyces* (8 ไอโซเลต) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 โดยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ที่มากที่สุดของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลตกับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) แสดงในตารางที่ 4.5

จากผลการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan *et al.* (2003) ที่สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้จากพืชและพบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่น ๆ ได้อีกหลายสกุล เช่น *Microbispora* sp. และ *Nocardia* sp. เช่นเดียวกับการทดลอง รวมไปถึงงานวิจัยของ Peng และคณะ (2015) ที่แยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรพื้นเมือง ซึ่งพบเป็นสกุล *Streptomyces* มากที่สุด (66 ไอโซเลต) อีก 14 ไอโซเลตเป็นเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่อยู่ในสกุลอื่น ๆ เช่น *Actinomadura* spp. *Kribbella* sp. และ *Nocardia* sp. เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นกาแฟในครั้งนี้มีความหลากหลายสูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cao และคณะ (2004) ที่ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากส่วนใบและรากของต้นกล้วยได้จำนวน 242 ไอโซเลต ซึ่งพบว่าส่วนมากจะอยู่ในสกุล *Streptomyces* เช่นเดียวกับกับการทดลองครั้งนี้ เมื่อนำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 12 ไอโซเลตไปพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสกุลแล้วพบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด (8 ไอโซเลต) (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้เนื่องจาก *Streptomyces* จัดว่าเป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดของแอกติโนมัยแบคทีเรีย (actinobacteria) โดยพบอยู่ประมาณ 500 สปีชีส์จากสกุลนี้ (Hasani *et al.*, 2014) ดังนั้นจึงสามารถพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* ได้มากที่สุด

จากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมด พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลต แสดงค่าระดับความคล้ายคลึง (% similarity value) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์จาก 16S rRNA gene ค่อนข้างต่ำ โดยที่มีจำนวน 2 ไอโซเลต เป็นสปีชีส์ใหม่ และอีก 3 ไอโซเลตมีแนวโน้มว่าจะเป็นสปีชีส์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ ตามที่ Chun และคณะ (2018) ได้รายงานไว้ว่า หากมีระดับความคล้ายคลึง (% similarity value) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานะข้อมูล ที่ต่ำกว่าร้อยละ 98.5 จะสามารถระบุได้ว่าเป็นสปีชีส์ใหม่

ตารางที่ 4.5 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สกัดจาก 16S rRNA gene (% similarity) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท์ที่แยกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานะข้อมูล

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	% similarity	ความยาว (bp)
CARR205	<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>	98.44	1,452
CANR101	<i>Streptomyces angustmyceticus</i> NRRL B-2347 <sup>T</sup>	99.93	1,533
CANR105	<i>Nocardia jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup>	99.17	1,494
CANR106	<i>Streptomyces paucisporeus</i> CGMCC 4.2025 <sup>T</sup>	98.67	1,145
CANR303	<i>Streptomyces amphotericinicus</i> 1H-SSA8 <sup>T</sup>	99.58	1,220
CALR102	<i>Streptomyces yanii</i> NBRC 14669 <sup>T</sup>	100.00	1,462
CALR104	<i>Streptomyces albiflavescens</i> n20 <sup>T</sup>	99.65	1,523
CALR105	<i>Kribbella podocarpi</i> YPL1 <sup>T</sup>	99.86	711
CALR106	<i>Streptomyces amphotericinicus</i> 1H-SSA8 <sup>T</sup>	99.65	1,533
CALR107	<i>Actinomadura rugatobispora</i> IFO 14382 <sup>T</sup>	98.72	1,525
CALR108	<i>Microbispora bryophytorum</i> 202201 <sup>T</sup>	99.86	1,430
	<i>Microbispora camponoti</i> 2C-HV3 <sup>T</sup>	99.86	
CALR110	<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>	99.01	1,386

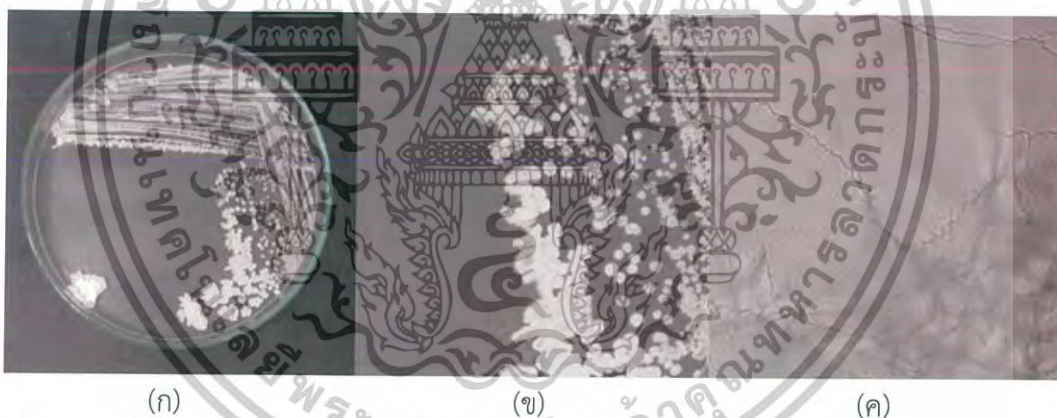
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.1 วงศ์ *Kribbellaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Kribbella* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

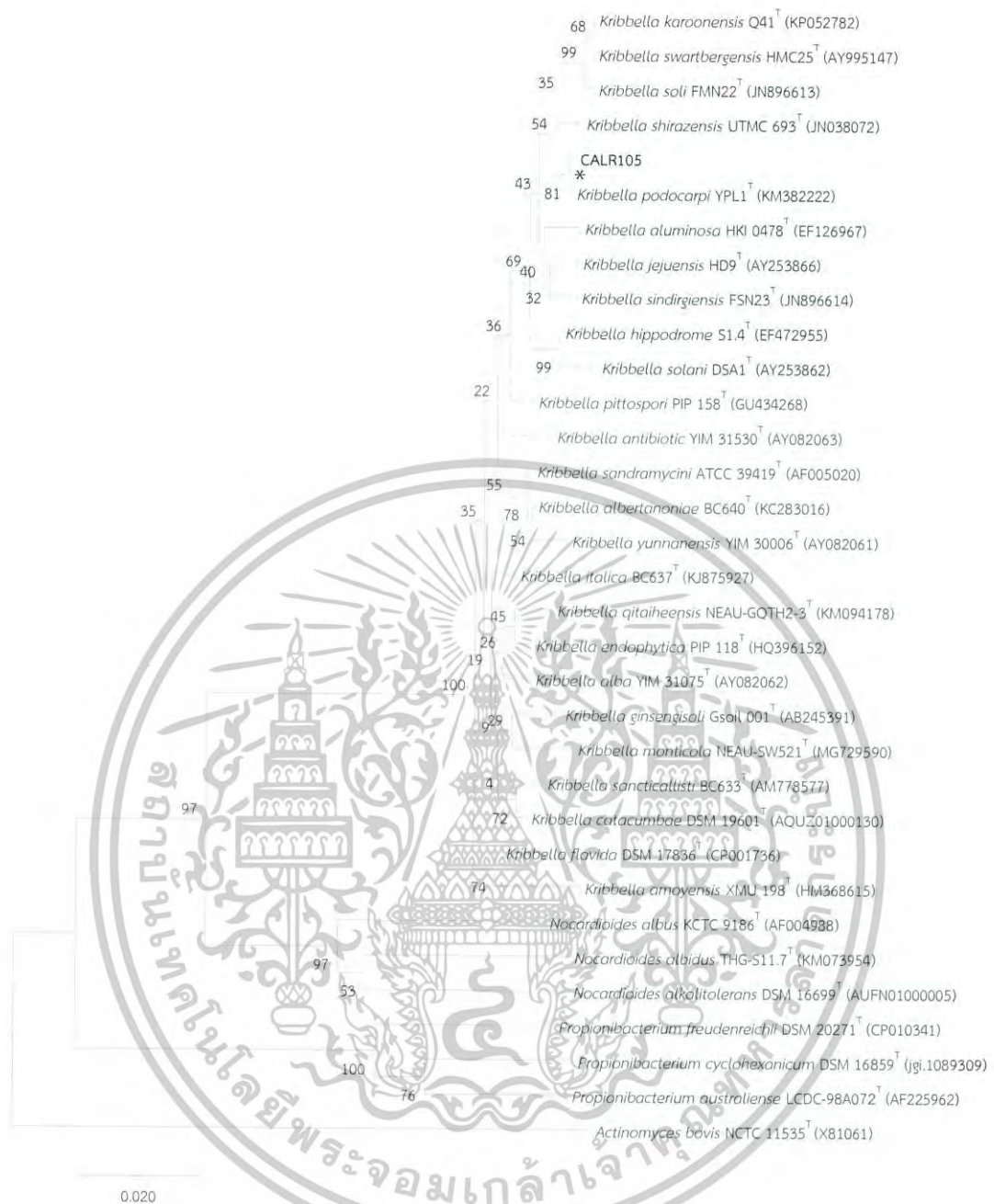
##### (1) สกุล *Kribbella*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ CALR105 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง (pale yellow) และเส้นใยอากาศสีขาวอมฟ้า (very pale blue) ไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหาร ISP2 การเรียงตัวของสปอร์บริเวณปลายเส้นใยอากาศลักษณะแตกแขนงเป็นเส้นตรง (รูปที่ 4.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR105 จัดอยู่ในสกุล *Kribbella* (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Kribbella podocarp* YPL1<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.9% (ตารางที่ 4.5) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Curtis และคณะ (2018) พบว่า *Kribbella podocarp* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (light-yellow) เส้นใยอากาศสีขาว (white) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ และมีการเรียงตัวกันของสปอร์เป็นเส้นตรงแตกแขนง ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวไอโซเลต CALR105 มีส่วนความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Kribbella podocarp*



รูปที่ 4.1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR105 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR105 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.2 วงศ์ *Nocardiaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Nocardia* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

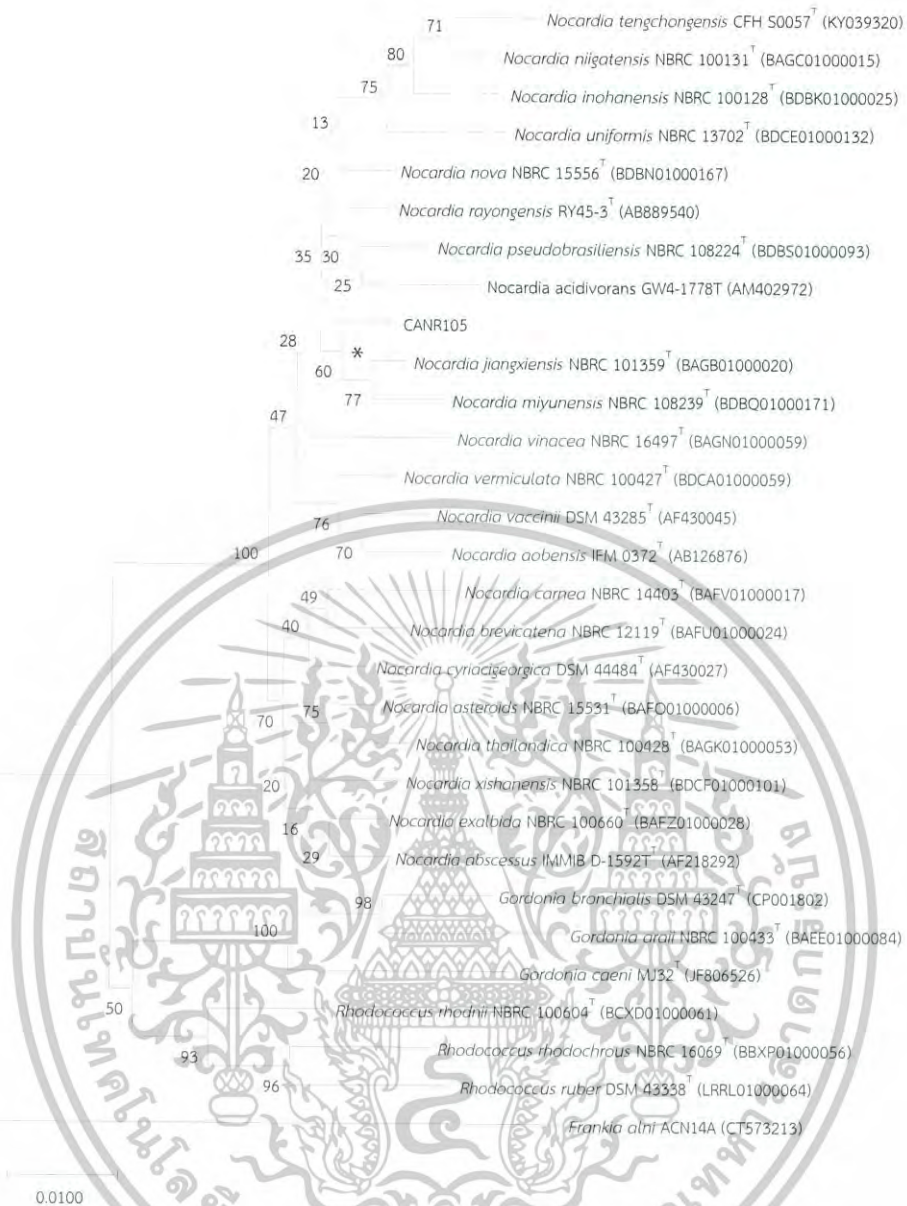
##### (1) สกุล *Nocardia*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ CANR105 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (light orange) และเส้นใยอากาศสีขาว (white) ไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหาร สปอร์บริเวณปลายเส้นใยอากาศลักษณะแตกแขนงเป็นเส้นตรง (รูปที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CANR105 จัดอยู่ในสกุล *Nocardia* (รูปที่ 4.4) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia jiangxiensis* NBRC<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.2% (ตารางที่ 4.5) และจากงานวิจัยของ Cui และคณะ (2005) พบว่า *Nocardia jiangxiensis* มีลักษณะเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล (yellowish brown) เส้นใยอากาศสีชมพู (pink) และไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวซึ่งมีความแตกต่างกับไอโซเลต CANR105 จึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR105 มีแนวโน้มจะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Nocardia jiangxiensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 4.3 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CANR105 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR105 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

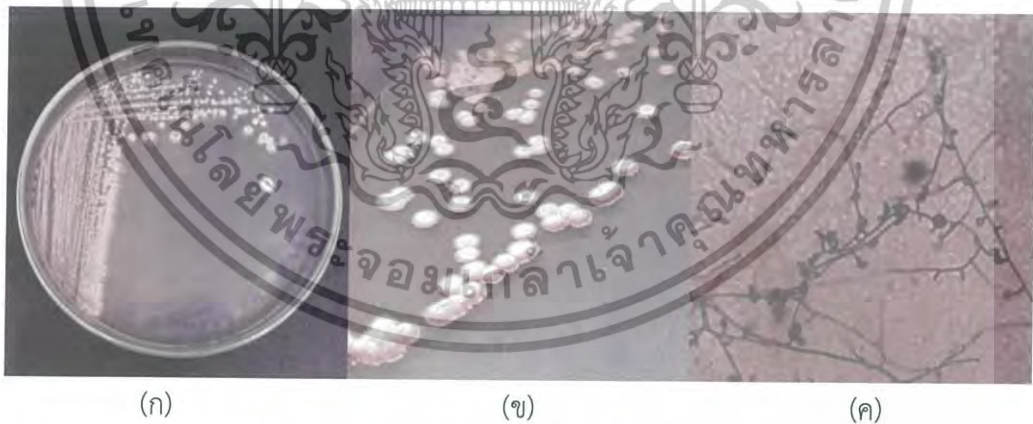
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.3 วงศ์ *Streptomycetaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Streptomyces* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

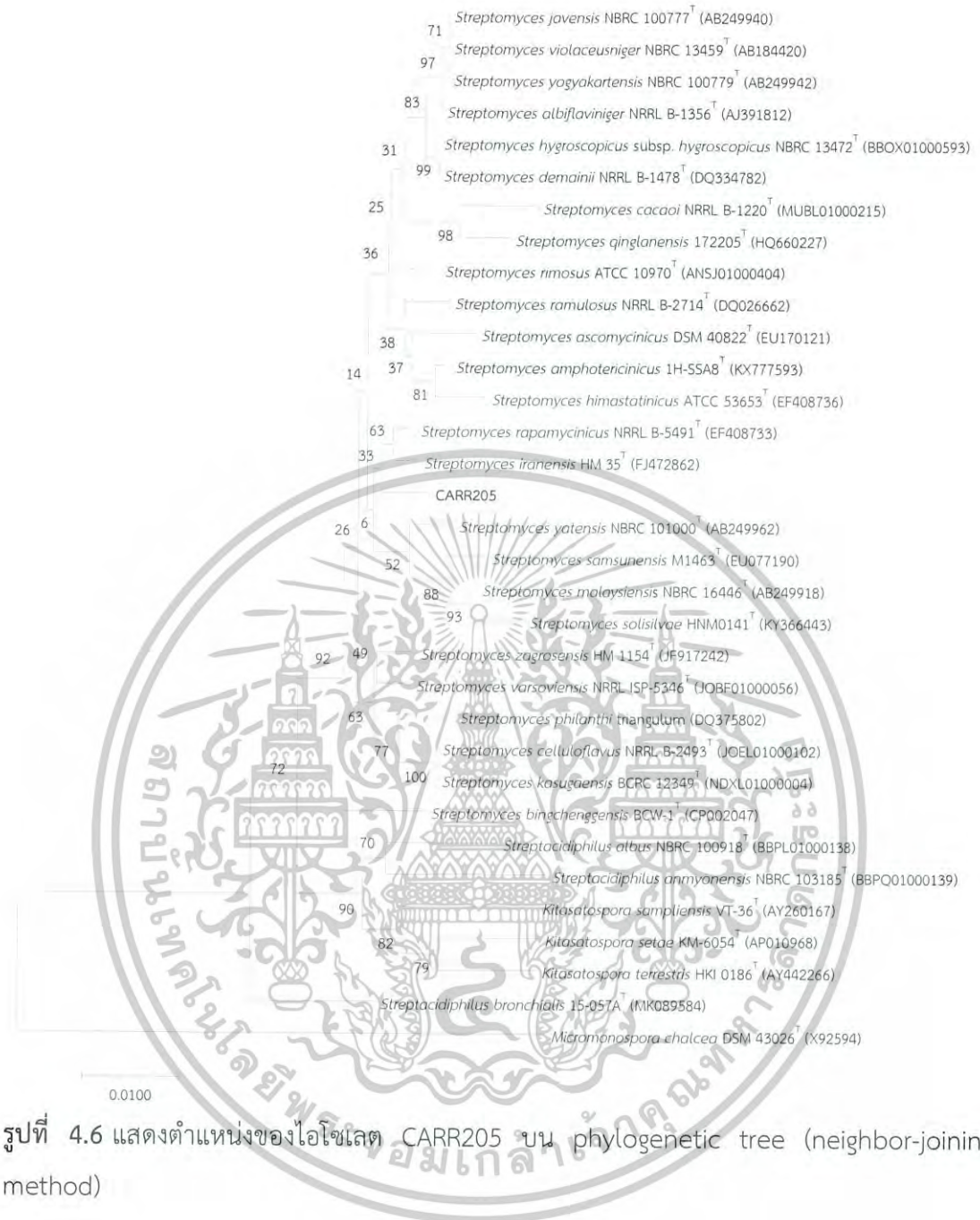
##### (1) สกุล *Streptomyces*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต CARR205 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารที่มีสีเหลืองอ่อนอมเขียว (light olive brown) และเส้นใยอากาศสีเทาอ่อน (light gray) พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเหลืองอ่อน (pale yellow) การเรียงตัวของสปอร์บนเส้นใยอากาศมีลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.5) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CARR205 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.6) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> ด้วยค่าระดับความคล้ายคลึงของยีนช่วง 16S rRNA เท่ากับ 98.4% (ตารางที่ 4.5) ซึ่งน้อยกว่า 98.7% ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ (cutoff point) (Chun *et al.*, 2018) และจากงานวิจัยของ Kumar และ Goodfellow (2008) ได้ระบุว่า *Streptomyces rapamycinicus* มีการเรียงตัวของสปอร์เป็นเส้นตรงแตกแขนงที่ปลายก้านมีสปอร์รูปร่างรี สีเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทา (greyish-yellow) และสีเส้นใยอากาศดำ (black) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวพบว่ามี ความแตกต่างกับไอโซเลต CARR205 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CARR206 เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CARR205 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR101 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (moderate olive brown) และเส้นใยอากาศสีฟ้าอ่อน (pale blue) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเหลือง (grayish yellow) บนอาหาร ISP2 สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.7) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CANR101 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.8) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces angustmyceticus* NRRL B-2347<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.9% (ตารางที่ 4.5) และ จากงานวิจัยของ Kumar และ Goodfellow (2010) พบว่า *Streptomyces angustmyceticus* มีการสร้างสีของเส้นใยอาหารสีน้ำตาล (brown) เส้นใยอากาศสีขาว (white) มีลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์เป็นเกลียว ด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR101 มีส่วนคล้ายคลึงกับ *Streptomyces angustmyceticus*



รูปที่ 4.7 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CANR101 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR101 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR106 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียว (brilliant greenish yellow) และเส้นใยอากาศสีฟ้าอ่อน (pale blue) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเหลืองอมเขียว (brilliant greenish yellow) บนอาหาร ISP2 การเรียงตัวของสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นใยแตกแขนงเป็นเส้นตรง ปลายงอ (รูปที่ 4.9) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CANR106 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.10) มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces paucisporeus* CGMCC 4.2025<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 98.8% (ตารางที่ 4.5) และจากงานวิจัยของ Xu และคณะ (2006) พบว่า *Streptomyces paucisporeus* มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสีขาวจนถึงสีเทา (white to grey) และมีการเรียงตัวกันของสปอร์เป็นเส้นตรงและปลายงอเล็กน้อย ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวซึ่งมีความคล้ายคลึงกับไอโซเลต CANR106 จึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR106 มีแนวโน้มจะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces paucisporeus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด



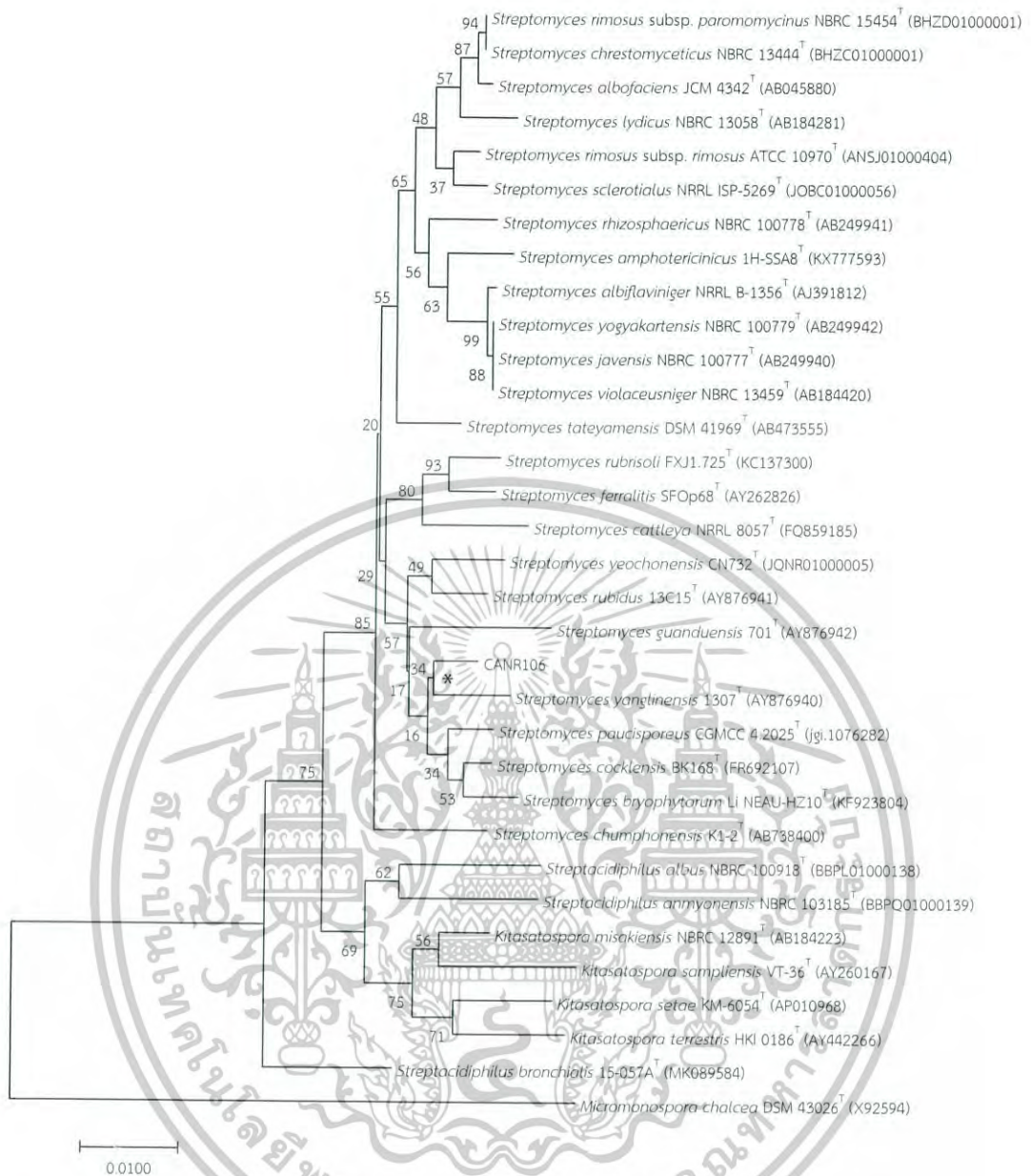
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.9 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CANR106 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR106 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR303 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเทา (light olive gray) และเส้นใยอากาศสีฟ้าอ่อน (very pale blue) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาล (moderate brown) การเรียงตัวของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.11) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CANR303 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.12) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces amphotericinicus* 1H-SSA8<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.6% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Cao และคณะ (2017) พบว่า *Streptomyces amphotericinicus* มีการสร้างของเส้นใยอาหารสีน้ำตาล (brown) เส้นใยอากาศสีขาว (white) ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์เป็นเกลียว สร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาลอ่อน (light brown) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR303 มีส่วนคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces amphotericinicus*



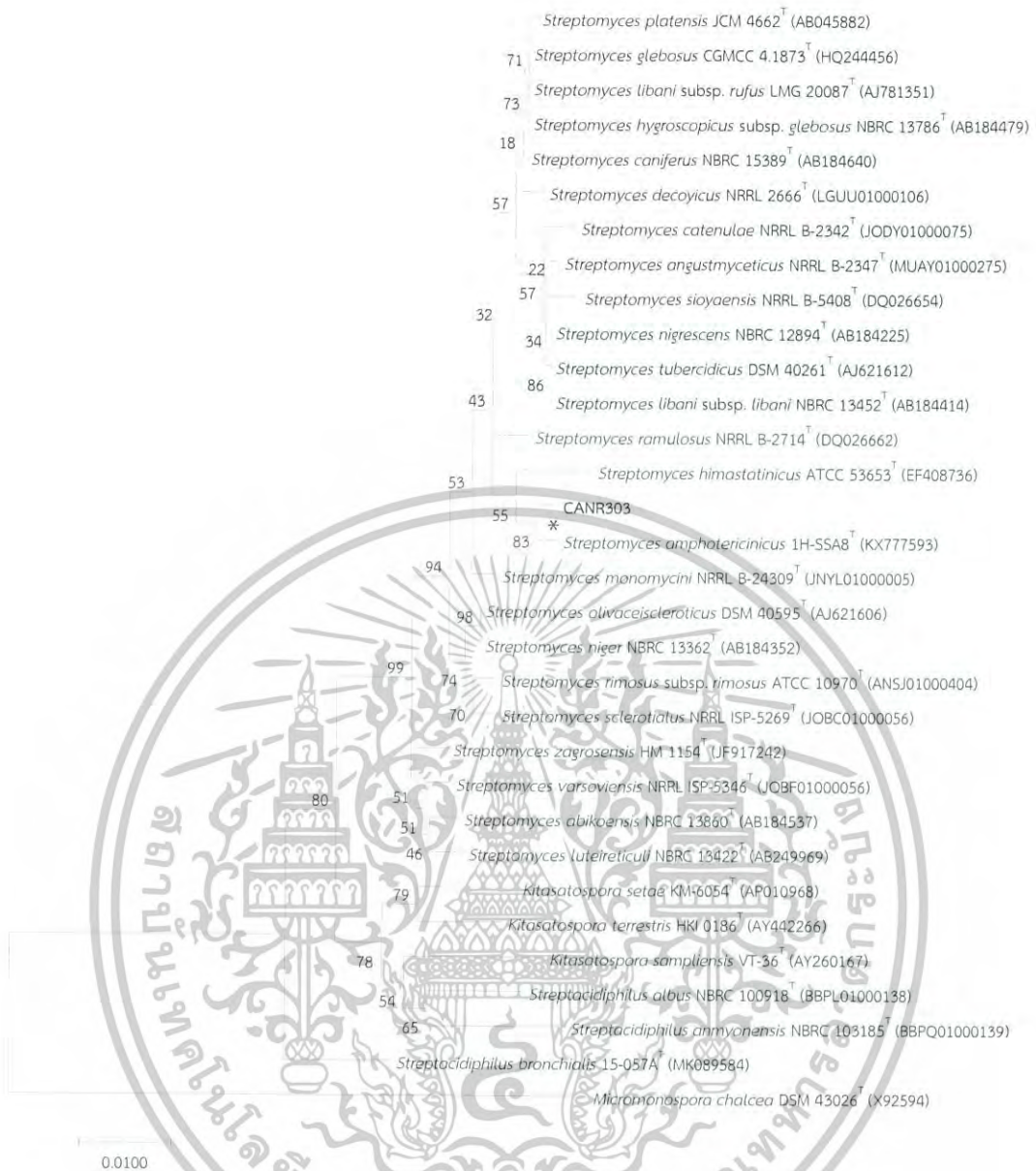
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.11 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CANR303 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CANR303 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR102 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีดำ (olive black) และเส้นใยอากาศสีขาว (bluish white) มีการสร้างรงควัตถุสีเขียวมะกอกอมเทา (grayish olive green) การเรียงตัวของสปอร์เป็นเส้นตรง ปลายงอ (รูปที่ 4.13) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR102 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.14) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces yanii* NBRC 14669<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 100.0% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2005) พบว่า *Streptomyces yanii* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีเทาจนถึงสีดำ (grey to black) เส้นใยอากาศสีเทา (grey) มีการเรียงตัวกันของสปอร์เป็นเส้นใยตรงแตกแขนง และสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาล (brown) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR303 มีส่วนคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces yanii*



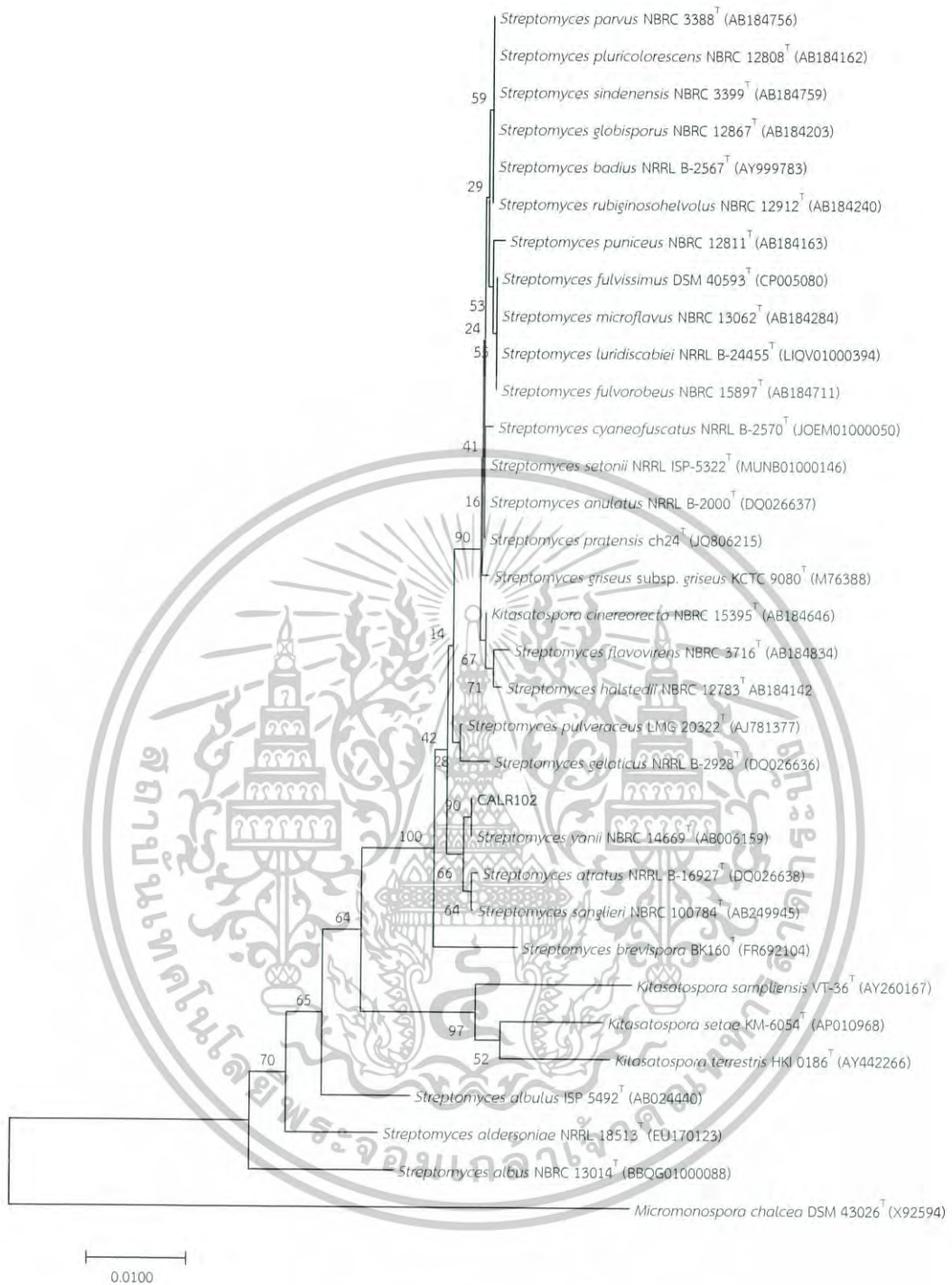
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.13 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR102 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR102 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR104 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล (strong yellow brown) และเส้นใยอากาศสีเหลือง (moderate yellow) พบการสร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อน (pale yellow) การเรียงตัวของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.15) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR104 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.16) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albiflavescens* n20<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.7% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Han และคณะ (2015) พบว่า *Streptomyces albiflavescens* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีขาวจนถึงน้ำตาล (white to brown) เส้นใยอากาศสีขาวอมเหลือง (yellowish white) มีการเรียงตัวกันของสปอร์เป็นเกลียว ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR303 มีส่วนคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces albiflavescens*



รูปที่ 4.15 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR104 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์สองระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR104 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

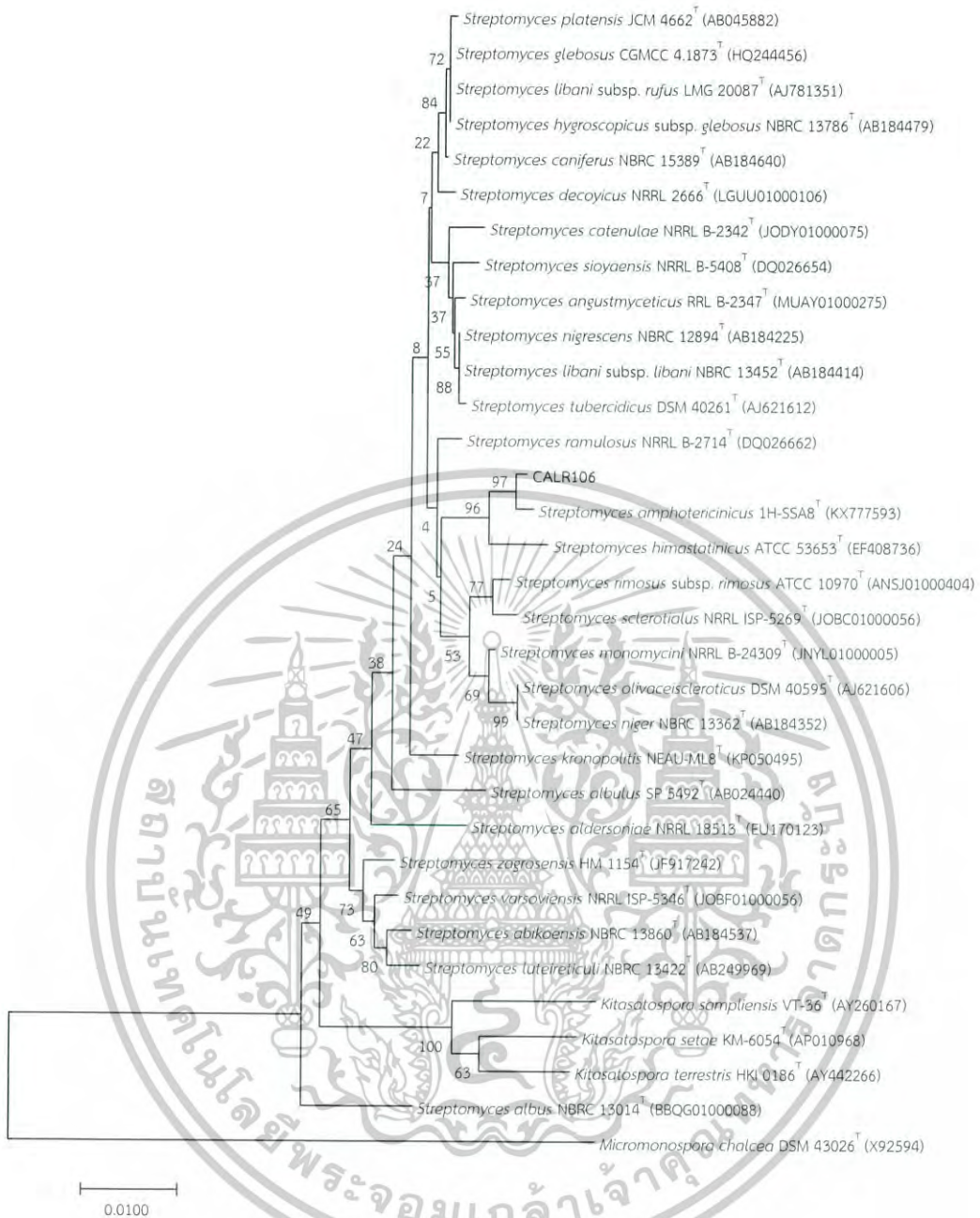
ไอโซเลต CALR106 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทา (yellowish gray) และเส้นใยอากาศสีขาว (bluish white) ไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR106 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.18) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces amphotericinicus* 1H-SSA<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.7% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Cao และคณะ (2017) พบว่า *Streptomyces amphotericinicus* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (yellow) เส้นใยอากาศสีขาว (white) ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์เป็นเกลียว และไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CANR303 มีส่วนคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces amphotericinicus*



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.17 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR106 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์สองระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR106 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR110 สร้างเส้นใยอาหารสีเทา (grayish yellow) และเส้นใยอากาศฟ้าอ่อน (very pale blue) พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาลมะกอก (moderate olive brown) บนอาหาร ISP2 สปอร์ลักษณะเป็นเกลียวขดกันแน่น (รูปที่ 4.19) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR110 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.20) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.1% (ตารางที่ 4.5) และจากงานวิจัยของ Kumar และ Goodfellow (2008) พบว่า *Streptomyces rapamycinicus* มีการเส้นใยอาหารสีเหลือง (yellow) เส้นใยอากาศสีดำ (black) ลักษณะการสร้างเส้นใยแตกกิ่งก้าน ลักษณะการเรียงตัวสปอร์เป็นทรงรี พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเหลืองอ่อน (light-yellow) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CALR110 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces rapamycinicus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด



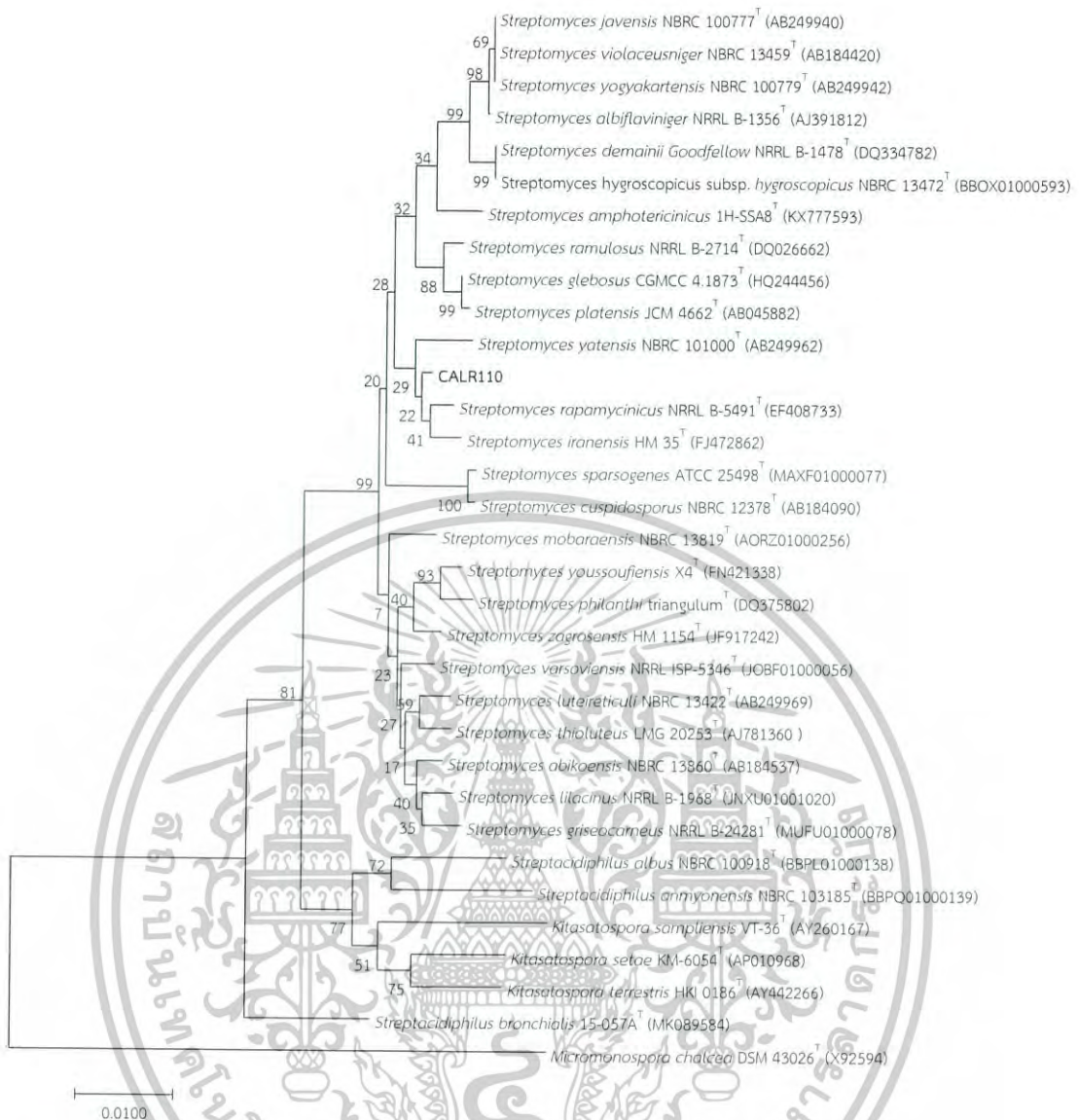
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.19 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR110 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR110 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

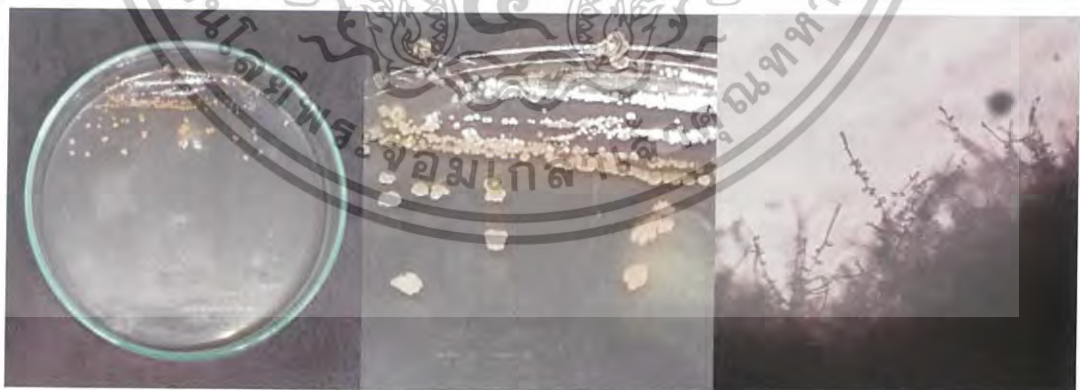
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.4 วงศ์ *Streptosporangiaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Microbispora* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

##### (1) สกุล *Microbispora*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ CALR108 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมส้ม (strong orange yellow) และเส้นใยอากาศสีขาวอมฟ้า (very pale blue) มีการเรียงตัวของสปอร์แบบคู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ ไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ (รูปที่ 4.21) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR108 จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* (รูปที่ 4.22) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ 2 สปีชีส์ คือ *Microbispora bryophytorum* 202201<sup>T</sup> และ *Microbispora camponoti* 2C-HV3<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึงที่เท่ากัน 99.9% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Li และคณะ (2015) พบว่า *Microbispora bryophytorum* มีการสร้างเส้นใยอาหารตั้งแต่ชมพูจนถึงแดงเข้มอมน้ำตาล (pinkish grey to dark reddish brown) และไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ จากงานวิจัยของ Han และคณะ (2016) พบว่า *Microbispora camponoti* มีการสร้างเส้นใยอาหารตั้งแต่สีขาวจนถึงสีน้ำตาลอมแดงเข้ม (white to dark reddish) และไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำเช่นเดียวกัน ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวทั้ง 2 สปีชีส์ มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลต CALR108 หลายประการ แต่หากต้องการที่จะระบุชนิดให้แน่นอนจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม อาทิเช่น HO genome sequencing หรือ chemotaxonomic characterization เป็นต้น



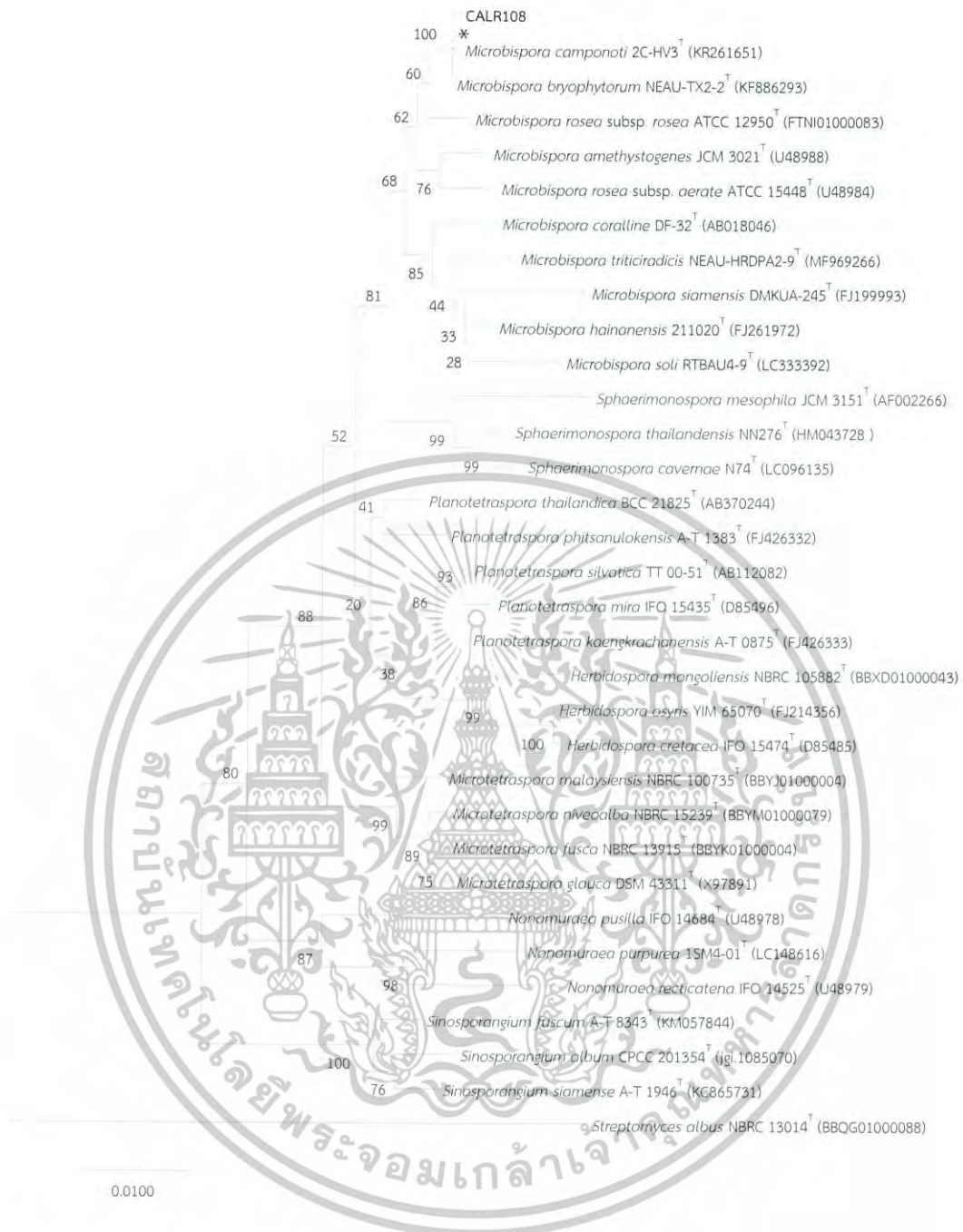
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.21 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR108 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR108 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.5 วงศ์ *Thermomonosporaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Actinomadura* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

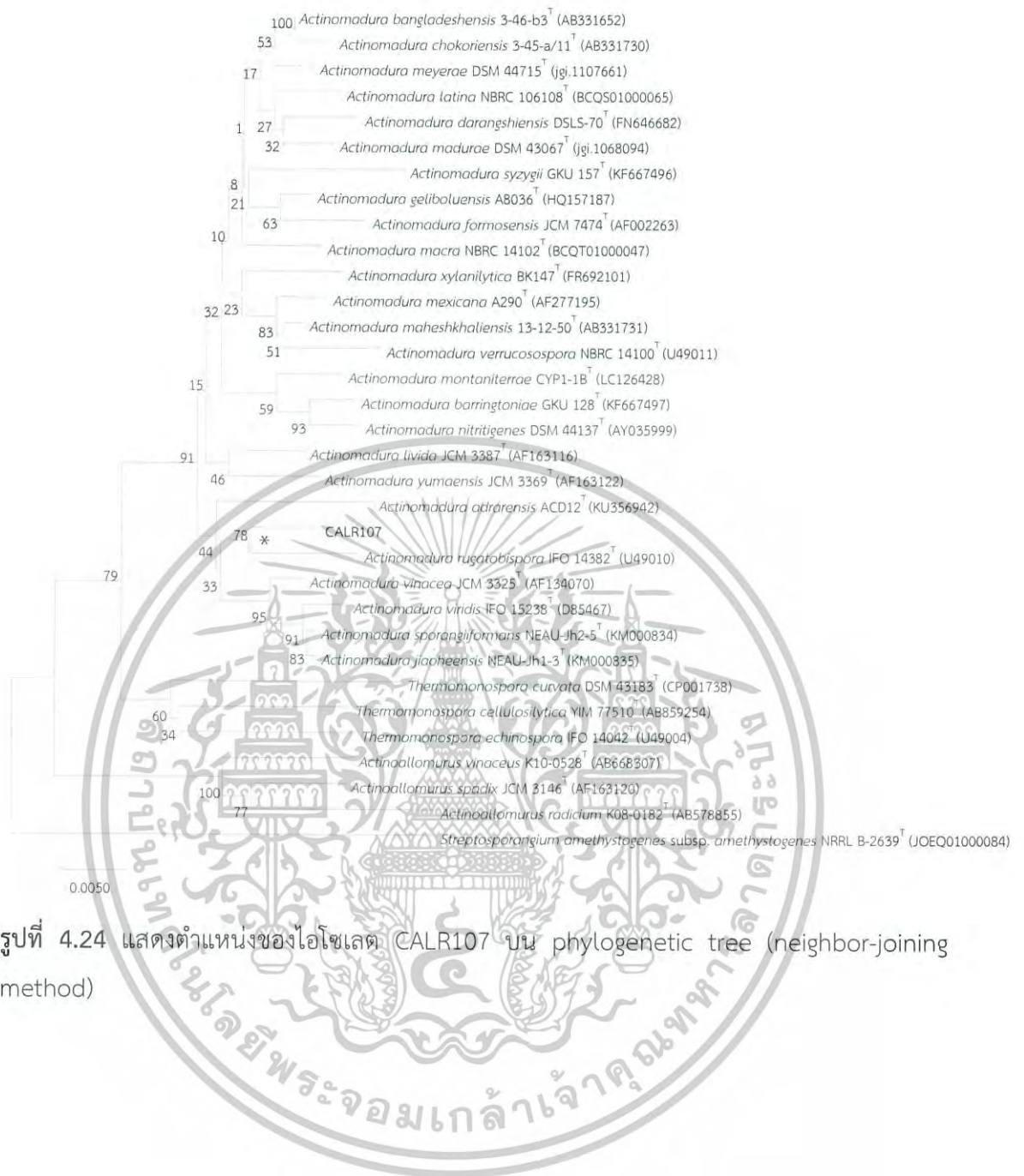
##### (1) สกุล *Actinomadura*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ CALR107 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีชาวมเหลือง (yellowish white) ไปจนถึงสีแดงเข้ม (deep red) สร้างเส้นใยอากาศสีชาวมฟ้า (very pale blue) การเรียงตัวของสปอร์แตกแขนงเป็นกิ่งก้านและสร้างก้านชูอับสปอร์สั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ และพบว่ามี การสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีชมพูเข้ม (strong pink) (รูปที่ 4.23) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต CALR107 เป็นเชื้อในสกุล *Actinomadura* (รูปที่ 4.24) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura rugatobispora* IFO 14382<sup>T</sup> ด้วยค่าระดับความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เท่ากับ 98.7% (ตารางที่ 4.5) ซึ่งเป็นค่าที่เท่ากับค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ (cutoff point) (Chun *et al.*, 2018) จากงานวิจัยของ Suzuki และคณะ (2000) พบว่า *Actinomadura rugatobispora* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง (yellow) เส้นใยอาหารสีเทา (grey) และมีลักษณะการสร้างเส้นใยแตกกิ่งก้านรูปร่างสปอร์เป็นทรงกลมรี ด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ดังกล่าวพบว่ามี ความแตกต่างกับไอโซเลต CALR107 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CALR107 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Actinomadura*



รูปที่ 4.23 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต CALR107 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต CALR107 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) โดยรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่เพาะปลูกต้นกาแฟจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดราชบุรี นครราชสีมา และลำปาง โดยพบแอกติโนมัยสีททั้งหมดจำนวน 32 ไอโซเลต ทำการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยสีทโดยคัดเลือกจากไอโซเลตที่มีความน่าสนใจจากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยวได้ดี มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นจากการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene โดยพบว่าเป็นแอกติโนมัยสีทที่จัดอยู่ใน 5 วงศ์ ได้แก่ *Kribbellaceae* *Nocardiaceae* *Streptomycetaceae* *Streptosporangiaceae* และ *Thermomonosporaceae* โดยแบ่งเป็น 5 สกุล *Kribbella* *Nocardia* *Streptomyces* *Microbispora* และ *Actinomadura* โดยลักษณะของแต่ละสกุลมีดังนี้

1. สกุล *Kribbella* เป็นแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน การสร้างสปอร์บริเวณปลายเส้นใยอากาศลักษณะคล้ายรูปตะขอ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต
2. สกุล *Nocardia* เป็นแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน สายสั้น ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต
3. สกุล *Streptomyces* เป็นแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างเส้นใยอากาศปริมาณมาก สร้างสปอร์หลากหลายรูปแบบ เช่น สปอร์สายยาวที่มีลักษณะตรง สปอร์ที่มีลักษณะคล้ายรูปตะขอ สปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียว ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลต
4. สกุล *Microbispora* เป็นแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้าน และสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต
5. สกุล *Actinomadura* เป็นแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่คัดเลือกมาจำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ CARR205 CANR101 CANR106 CANR303 CANR105 CALR106 CALR110 CALR102 CALR104 CALR105 CALR107 และ CALR108 พบว่ามีจำนวน 2 ไอโซเลต เป็นแอกติโนมัยสัสปีสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ CARR205 และ CALR107 ที่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Actinomadura* ตามลำดับ และมีจำนวน 3 ไอโซเลต มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ CANR105 CANR106 และ CA3R110 ที่จัดอยู่ในสกุล *Nocardia* และ *Streptomyces*

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี dual culture โดยการเพาะเลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 32 ไอโซเลต ร่วมกับเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว (*Fusarium spp.*) พบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยว ได้มากกว่าร้อยละ 21 ได้แก่ ไอโซเลต CARR205 CANR101 CANR102 CANR106 CANR303 CALR101 CALR106 และ CALR110 โดยที่ไอโซเลต CALR110 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคต้นเหี่ยวได้ดีที่สุด (ร้อยละ 42)

การทดลองนี้ให้ความสนใจในการศึกษาฤทธิ์การต้านราก่อโรคต้นเหี่ยวของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัที่แยกจากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า โดยพบว่ามีกรออกฤทธิ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง อีกทั้งยังเป็นแหล่งของเชื้อที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อจากต้นกาแฟเป็นแหล่งที่มีความน่าสนใจ นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เหล่านี้เพื่อเป็นสารควบคุมเชื้อราก่อโรคเพื่อลดการใช้สารเคมี ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ได้ถูกนำไปผลิตเพื่อเป็นสารต้านเชื้อราทางอุตสาหกรรมมากนัก การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสับางชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2558). การคัดแยกและระบุหาแอกติโนมัยซีทอาศัยในดิน อุทยานแห่งชาติภู  
 ลังกา นครพนม. *Naresuan Phayao Journal*. 8(1) : 21-24.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, เอมอร คำเพราะ และรัชฎาพร นวะพัฒน์. (2552). การคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัย  
 ดิคที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.  
*วารสารวิชาการ ม. อบ.* 11(3) : 9-17.
- สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง. (2560). การคัดแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอกติโนแบคทีเรีย  
 ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย.  
*วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.* 12(1) : 107-117.
- Afolabi, A. (2009). *Simple, effective and economical explant-surface sterilization  
 protocol for cowpea, rice and sorghum seeds* (Vol. 8).
- AJMCCARTHYTA, N. (1983). A Taxonomic Study of Thermomonospora and Other  
 Monosporic Actinomycetes.
- Akond, M.A., Jahan, M.N., Sultana, N., and Rahman, F. (2016). Effect of Temperature ,  
 pH and NaCl on the Isolates of Actinomycetes from Straw and Compost  
 Samples from Savar , Dhaka , Bangladesh.
- Araújo, J. M. d., Silva, A. C. d., and Azevedo, J. L. (2000). Isolation of endophytic  
 actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian  
 Archives of Biology and Technology*, 43, 0-0.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.  
 P., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y. and van Wezel, G. P. (2016).  
 Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol  
 Biol Rev*, 80(1), 1-43.
- Basavaraj, K., Chandrashekhara, S., Shamarez, A., Goudanavar, P.S., and Manvi, F.V.  
 (2010). Isolation and morphological characterization of antibiotic producing  
 actinomycetes.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., and Wheals, A. E. (2003).  
 Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica*  
 L.). *Int J Food Microbiol*, 85(3), 293-300.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 Bullerman L. B. (2003). *Fungi in Food – An Overview*.  
 ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bui, H. B. (2014). Isolation of cellulolytic bacteria, including actinomycetes, from coffee exocarps in coffee-producing areas in Vietnam. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 3(1), 48.
- Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y., and Zhou, S. (2004). Isolation of Endophytic Actinomycetes From Roots and Leaves of Banana (*Musa Acuminata*) Plants and Their Activities Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 501-504.
- Cao, T., Mu, S., Lu, C., Zhao, S., Li, D., Yan, K., Xiang, W. and Liu, C. (2017). *Streptomyces amphotericinicus* sp. nov., an amphotericin-producing actinomycete isolated from the head of an ant (*Camponotus japonicus* Mayr). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(12), 4967-4973.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X., De Meyer, S. and Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466.
- Conti, R. (2012). Endophytic microorganisms from leaves of *Spermacoce verticillata* (L.): Diversity and antimicrobial activity.
- Cui, Q., Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., and Goodfellow, M. (2005). *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1921-1925.
- Curtis, S. M., Norton, I., Everest, G. J., and Meyers, P. R. (2018). *Kribbella podocarpi* sp. nov., isolated from the leaves of a yellowwood tree (*Podocarpus latifolius*). 111(6), 875-882.
- Davis, G. H., and Baird-Parker, A. C. (1959). The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. *J Gen Microbiol*, 21, 612-621.
- De Leo, F., Agnese Iero., Zammit G., and Urzi, C. E. (2012). Chemoorganotrophic bacteria Isolated From Biodeteriorated Surfaces In Cave And Catacombs. *International Journal of Speleology*, 41: 125-136.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น กรุณาอย่าให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Faheem, M., Raza, W., Zhao, J., Shabbir, S., and Sultana, N. (2015). *Characterization of the newly isolated antimicrobial strain Streptomyces goshikiensis YCXU* (Vol. 3).
- Gangwar, M., Dogra, S., and Sharma, N. (2011). Antagonistic Bioactivity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 2(4), 154-157.
- Getha, K., and Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28(6), 303-310.
- Goodfellow, M., and Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*, 37, 189-216.
- Han, C., Liu, C., Zhao, J., Guo, L., Lu, C., Li, J., Jia, E., Wang, X. and Xiang, W. (2016). *Microbispora camponoti* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cuticle of *Camponotus japonicus* Mayr. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(2), 215-223.
- Han, X., Zheng, J., Xin, D., Xin, Y., Wei, X., and Zhang, J. (2015). *Streptomyces albiflavescens* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(5), 1467-1473.
- Hasani, A., Kariminik, A., and Issazadeh, K. (2014). Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1), 63-75.
- Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-Aree, W., and Duangmal, K. (2016). Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. *Microbiol Res*, 188-189, 42-52.
- Hong-Thao, P. T., Mai-Linh, N. V., Hong-Lien, N. T., and Van Hieu, N. (2016). Biological Characteristics and Antimicrobial Activity of Endophytic *Streptomyces* sp. TQR12-4 Isolated from Elite Citrus nobilis Cultivar Ham Yen of Vietnam. *International Journal of Microbiology*, 2016, 7.
- Jiang, C., and Xu, L. (1996). Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, yunnan, china. *Appl Environ Microbiol*, 62(1), 249-253.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kafur, A., and Basheer Khan, A. (2011). Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthes roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(4), 302-306.

Kalakoutskij, L. V., and Agre, N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev*, 40(2), 469-524.

Kaur H., Gangwar M. and Kalia A. (2015). Diversity of Actinomycetes from fodder leguminous plants and their biocontrol potential. *International Journal of Advanced Research*. 3(8), 1141-1151.

Khucharoenphaisan K., Sinma K. and Lorrungruang C. 2014. Distribution of Micromonospora Isolated from Sugar Cane in Thailand. *Journal Applied Sciences.*, 14, 3013-3017.

King, R. R., Lawrence, C. H., and Calhoun, L. A. (1992). Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies* the causal organism of potato common scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 834-837.

Kumar, Y., and Goodfellow, M. (2008). Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1369-1378.

Kumar, Y., and Goodfellow, M. (2010). Reclassification of *Streptomyces hygroscopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoycus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 769-775.

Kunasakdakul K., Suwitchayanon P. and Phuakjaiphaoe C. (2012). Antifungal Pathogen Activities and Growth Promotion of Endophytic Actinomycetes on Brassica Seedling. *CMU.J.Nat.Sci.Special Issue on Agricultural & Natural Resources*, 11(1), 7-12.

Labandeira, C. C., and Prevec, R. (2014). Plant paleopathology and the roles of pathogens and insects. *International Journal of Paleopathology*, 4, 1-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lainhart, W. (2018). *Fusarium* spp., a Genus of Common Plant Pathogens That Can Cause Devastating, Opportunistic Human Disease. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(1), 1-5.
- Li, C., Zhang, Y., Liu, C., Wang, H., Zhao, J., Li, L., Zhang, Z., Wang, X., and Xiang, W. (2015). *Microbispora bryophytorum* sp. nov., an actinomycete isolated from moss (Bryophyta). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(4), 1274-1279.
- Liu, Z., Shi, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Lu, Z., Li, W., Huang, Y., Rodriguez, C. and Goodfellow, M. (2005). Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of 'Microstreptospora cinerea' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1605-1610.
- Mahajan, G. B., and Balachandran, L. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes - a review. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 240-253.
- Meenakshi Sundram, T., Annuar, M. S., and Khalid, N. (2012). *Optimization of culture condition for callus induction from shoot buds for establishment of rapid growing cell suspension cultures of Mango ginger (Curcuma mangga)* (Vol. 6).
- Moretti, A., and Sarrocco, S. (2016). Fungi. In B. Caballero, P. M. Finglas and F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 162-168). Oxford : Academic Press.
- Oliveira, M. N., Santos, T. M., Vale, H. M., Delvaux, J. C., Cordero, A. P., Ferreira, A. B., Miguel, P. S., Totola, M. R., Costa, M. D., Moraes, C. A. and Borges, A. C. (2013). Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol*, 59(4), 221-230.
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R. and Anthony S. (2009). *Coffea arabica*. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya. [Online]. Available : <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.
- Qiu, P., Feng, Z. X., Tian, J. W., Lei, Z. C., Wang, L., Zeng, Z. G., Chu, Y. W. and Tian, Y. Q. (2015). Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. *Chin J Nat Med*, 13(12), 942-953.
- Rao, H. C. Y., Rakshith, D., and Satish, S. (2015). Antimicrobial properties of endophytic actinomycetes isolated from *Combretum latifolium* Blume, a medicinal shrub from Western Ghats of India. *Frontiers in Biology*, 10(6), 528-536.
- Rutherford, M. A. (2006). Current knowledge of coffee wilt disease, a major constraint to coffee production in Africa. *Phytopathology*, 96(6), 663-666.
- Shan, W., Zhou, Y., Liu, H., and Yu, X. (2018). *Endophytic Actinomycetes from Tea Plants ( Camellia sinensis ): Isolation, Abundance, Antimicrobial, and Plant-Growth-Promoting Activities* (Vol. 2018).
- Shimizu, M. (2011). Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters (pp. 201-220).
- Shinji, M. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. In M. Shinji. *Atlas of actinomycetes*. Japan: Asakura publishing.
- Silva, H. S. A., Tozzi, J. P. L., Terrasan, C. R. F., and Bettiol, W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*, 63(1), 62-67.
- Suzuki, S.-i., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Nakanishi, N., and Komatsubara, S. (2000). Selective Isolation and Distribution of *Actinomadura rugatobispora* Strains in Soil. *Actinomycetologica*, 14(2), 27-33.
- Taechowisan, T., Peberdy, J. F., and Lumyong, S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 381-385.
- TÜRKKAN, M , ÖZCAN, M , ERPER, İ . (2017). Antifungal effect of carbonate and bicarbonate salts against *Botrytis cinerea*, the casual agent of grey mould of kiwifruit. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6(2), 107-114
- Xu, C., Wang, L., Cui, Q., Huang, Y., Liu, Z., Zheng, G., and Goodfellow, M. (2006). Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1109-1115.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## Starch Casein Agar (SCN)

Sodium caseinate	0.5	g
Soluble starch	2	g
Glucose	1	g
KNO <sub>3</sub>	1	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.2	g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.01	g
Agar	18	g
Demineralized water up to	1	L

pH: 7.0 ± 0.2

Sterilisation: 15 minutes at 121.5 °C

After autoclaving and cooling down at 50°C, add:

Nalidixic acid (dissolved in 0.2N NaOH)	50	mg
Nystatin (dissolved in 100% DMSO)	100	mg

## Yeast extract Malt extract Agar (ISP2 Agar)

Yeast extract	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Agar	20	g
Demineralized water up to	1	L

pH: 7.0 ± 0.2

Sterilization: 15 minutes at 121.5 °C

## Yeast extract Malt extract Broth (ISP2 Broth)

Yeast extract	4	g
---------------	---	---

Malt extract	10	g
--------------	----	---

Glucose	4	g
---------	---	---

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Demineralized water up to 1 L  
 pH:  $7.0 \pm 0.2$   
 Sterilization: 15 minutes at  $121.5\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### Potato Dextrose Agar (PDA)

Potatoes, infusion from	200.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g

Suspend 39 grams in 1000 ml distilled water

pH: (at  $25^{\circ}\text{C}$ )  $5.6 \pm 0.2$

Sterilization: 15 minutes at  $121.5\text{ }^{\circ}\text{C}$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา(reagent) สำหรับการแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

## S-EDTA

EDTA	37.224 g
NaCl	8.76 g
Demineralized water up to pH 8.0	1 L

## 10mM Tris-HCL

Tris	0.121 g
Demineralized water up to pH 8	100 ml

## 10X SSC

NaCl	8.76 g
Trisodium citrate	4.41 g
Demineralized water up to pH 7.0	100 ml

## Tris-SDS

Tris	1.21 g
SDS	10 g
Demineralized water up to	100 ml

## 1X SSC

NaCl	0.876 g
Trisodium citrate	0.441 g
Demineralized water up to pH 7.0	100 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

รหัส จ.ราชบุรี	สี		
	เส้นใยอาหาร	เส้นใยอากาศ	รงควัตถุ
CARR101	Bluish white	Pale blue	-
CARR102	Grayish yellow	Very Pale Blue	Moderate Yellow
CARR201	Bluish white	Bluish Gray	-
CARR202	Dark Yellow	Very Pale Blue	Grayish Greenish Yellow
CARR203	Light Greenish Yellow	Very Pale Blue	Grayish Yellow
CARR204	Grayish Yellow	Very Pale Blue	Dark Yellow
CARR205	Light Olive Brown	Light Gray	Pale Yellow
CARR206	Pale yellow	Very Pale Blue	-
CARR207	Light bluish gray	Pale blue	-

รหัส จ.นครราชสีมา	สี		
	เส้นใยอาหาร	เส้นใยอากาศ	รงควัตถุ
CANC201	Grayish yellow	Light Greenish Gray	Dark Grayish Olive Green
CANC202	Pale Yellow	Very Pale Blue	-
CANR101	Moderate Olive Brown	Pale Blue	Grayish Yellow
CANR102	Moderate Olive Brown	Pale blue	Grayish Yellow
CANR103	Grayish yellow	Very light blue	-
CANR104	Light Gray	Very Pale Blue	Dark Yellowish Brown
CANR105	Light Orange	Pinkish White	-
CANR106	Brilliant Greenish Yellow	Pale blue	Brilliant Greenish Yellow
CANR201	Greenish Gray	Light Greenish Gray	Dark Grayish Olive Green
CANR301	Grayish yellow	Light blue	-
CANR302	Yellowish White	Very Pale Blue	-
CANR303	Light olive gray	Very Pale Blue	Moderate Brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัส จ.ลำปาง	สี		
	เส้นใยอาหาร	เส้นใยอากาศ	รงควัตถุ
CALR101	Pale Yellow	Light Bluish Gray	-
CALR102	Yellowish white	Olive black	Grayish olive green
CALR103	Bluish White	Dark greenish gray	Dark grayish yellow
CALR104	Strong yellow brown	Moderate yellow	Pale yellow
CALR105	Pale yellow	Very pale blue	-
CALR106	Yellowish gray	Bluish white	-
CALR107	Deep red	Pale blue	Strong pink
CALR108	Strong orange yellow	Very pale blue	-
CALR109	Yellow gray	Very pale blue	-
CALR110	Pale yellow	Blueish gray	-
CALR111	Grayish yellow	Very pale blue	Moderate olive brown

The NBS/IBCC Color System  
The 267 Color Centroids

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
Red, Pink			
1 vivid pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 strong pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 deep pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 light pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 moderate pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 dark pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 pale pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 grayish pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 pinkish white	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 pinkish gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 vivid red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 deep red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14 very deep red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 moderate red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 dark red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 very dark red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 light grayish red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 grayish red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 dark grayish red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 blackish red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 reddish gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 dark reddish gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 reddish black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
<b>Yellowish Pink</b>			
25 vivid yellowish pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 strong yellowish pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 deep yellowish pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 light yellowish pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 moderate yellowish pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 dark yellowish pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 pale yellowish pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 grayish yellowish pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
<b>Reddish Orange, Reddish Brown</b>			
33 brownish pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 vivid reddish orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 strong reddish orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 deep reddish orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 moderate reddish orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 dark reddish orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 grayish reddish orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 strong reddish brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของสำนักงานเทคโนโลยีสารสนเทศแห่งชาติ  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41 deep reddish brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 light reddish brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 moderate reddish brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 dark reddish brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 light grayish reddish brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 grayish reddish brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 dark grayish reddish brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	
<b>Orange Brown</b>			
48 vivid orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 brilliant orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 strong orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 deep orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 light orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 moderate orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 brownish orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 strong brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 deep brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	
57 light brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 moderate brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 dark brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 light grayish brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 grayish brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 dark grayish brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 light brownish gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 brownish gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 brownish black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
<b>Orange Yellow, Yellowish Brown</b>			
66 vivid orange yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 brilliant orange yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

68 strong orange yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 deep orange yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 light orange yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 moderate orange yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 dark orange yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 pale orange yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 strong yellowish brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 deep yellowish brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 light yellowish brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 moderate yellowish brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 dark yellowish brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 light grayish yellowish brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 grayish yellowish brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 dark grayish yellowish brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
Yellow, Olive Brown			
82 vivid yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 brilliant yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 strong yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 deep yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 light yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 moderate yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 dark yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 pale yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 grayish yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 dark grayish yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 yellowish white	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 yellowish gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 light olive brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 moderate olive brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96 dark olive brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	
Greenish Yellow, Olive			
97 vivid greenish yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 brilliant greenish yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 strong greenish yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 deep greenish yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 light greenish yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 moderate greenish yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 dark greenish yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 pale greenish yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 grayish greenish yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 light olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 moderate olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 dark olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
109 light grayish olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 grayish olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 dark grayish olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 light olive gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 olive gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 olive black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
Yellow Green, Olive Green			
115 vivid yellowish green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
116 brilliant yellow green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 strong yellow green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 deep yellow green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 light yellow green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 moderate yellow green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 pale yellowish green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 grayish yellowish green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยและพัฒนาสุขภาพเด็ก มหิดลวิทยานุสรณ์  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

123 strong olive green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 deep olive green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 moderate olive green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 dark olive green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 grayish olive green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 dark grayish olive green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 vivid yellowish green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
Yellowish Green			
130 brilliant yellowish green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 strong yellowish green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 deep yellowish green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 very deep yellowish green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 very light yellowish green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 light yellowish green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 moderate yellowish green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 dark yellowish green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 very dark yellowish green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 vivid green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 brilliant green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 strong green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 deep green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 very light green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 light green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 moderate green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 dark green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 very dark green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 very pale green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 pale green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

150 grayish green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 dark greenish yellowish green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 blackish green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 greenish white	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 light greenish gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 greenish gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 dark greenish gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 greenish black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
<b>Bluish Green</b>			
158 vivid bluish green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 brilliant bluish green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 strong bluish green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 deep bluish green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 very light bluish green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 light bluish green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 moderate bluish green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 dark bluish green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 very dark bluish green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 vivid greenish blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
<b>Greenish Blue</b>			
168 brilliant greenish blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 strong greenish blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 deep greenish blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 very light greenish blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 light greenish blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 moderate greenish blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 dark greenish blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	
175 very dark greenish blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการ **Blue** เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

176 vivid blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 brilliant blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 strong blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 deep blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 very light blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 light blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 moderate blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 dark blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 very pale blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 pale blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 grayish blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 dark grayish blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 blackish blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 bluish white	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 light bluish gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 bluish gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 dark bluish gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 bluish black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
<b>Purplish Blue</b>			
194 very purplish blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 brilliant purplish blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 strong purplish blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 deep purplish blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	
198 very light purplish blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 light purplish blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 moderate purplish blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 dark purplish blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 very pale purplish blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 pale purplish blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	

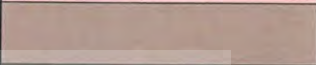
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเท่านั้น ไม่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

204 grayish purplish blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
<b>Violet</b>			
205 vivid violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 brilliant violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 strong violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 deep violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 very light violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 light violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 moderate violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 dark violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 very pale violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 pale violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 grayish violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
<b>Purple</b>			
216 vivid purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 brilliant purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 strong purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 deep purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 very deep purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 very light purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 light purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 moderate purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 dark purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 very dark purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 very pale purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 pale purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 grayish purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 dark grayish purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 blackish purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเท่านั้น การนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

231 purplish white	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 light purplish gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 purplish gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 dark purplish gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 purplish black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
<b>Reddish Purple</b>			
236 vivid reddish purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 strong reddish purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 deep reddish purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 very deep reddish purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 light reddish purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 moderate reddish purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 dark reddish purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 very dark reddish purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 pale reddish purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 grayish reddish purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
<b>Purplish Pink, Purplish Red</b>			
246 brilliant purplish pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 strong purplish pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 deep purplish pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 light purplish pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 moderate purplish pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 dark purplish pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 pale purplish pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 grayish purplish pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 vivid purplish red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 strong purplish red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 deep purplish red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 very deep purplish red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่ควรนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

258 moderate purplish red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 dark purplish red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 very dark purplish red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 light grayish purplish red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 grayish purplish red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 white	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 light gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 medium gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 dark gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CARR205 (1,452 นิวคลีโอไทด์)

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGC  
CGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAC  
GGGTCTAATACCGGATATGACCACCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGC  
CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG  
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAA  
GAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
GCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCCGGATGTGAAAGCCCG  
GGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGCATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT  
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGA  
GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGT  
GTGGGCGACATTCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG  
GCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGA  
AGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGT  
GGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTG  
TGTGCCAGCGGGTTATGCCGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  
TCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCG  
CGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGA  
GTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGT  
CACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAAGTGGGACTGG  
CAATTGGGAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CANR101 (1,533 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGAATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTA  
ACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA  
TCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTCCGACCGCATGGTCTG  
GTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCA  
AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGG  
CCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA  
GGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGCATACGGGCAGGCTAGA

GTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG  
 AAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTG  
 GTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCAT  
 TAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAG  
 CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCTGGA  
 GACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT  
 TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGA  
 GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAC  
 ACGTGTACAATGGCCGCTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGT  
 TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTG  
 AATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA  
 ACCCTTGTGGGAGGGAATCGTCAAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACC  
 GGAAGGTGCGGCTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CANR105 (1,494 นิวคลีโอไทด์)

GCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTA  
 AGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTTGCACTCTGGGATAA  
 GCCTGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTGCCTCTGCATGGGGTTGGTGGAAAAGATTTATCGGTGC  
 GAGATGGGCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCT  
 GAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
 GCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTC  
 GACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA  
 ATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTGTCGCGCTCGATTGT  
 GAAAACCTTGCAGCTCAACTGCAAGCTTGCAGTCGATACGGGCGGACTAGAGTACTTCAGGGGAGACTGGAATT  
 CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAGTAAC  
 TGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG  
 GTACTAGGTGTGGGTTTCCCTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTAC  
 GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGAT  
 GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGTACATACACCAGAAAGCTGCAGAGATGTAGCCCCCTTGTGGTTGG  
 TGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
 CTTATCTTATGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG  
 GGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTG  
 CGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTG  
 AAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  
 CGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGG  
 GATTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CANR106 (1,433 นิวคลีโอไทด์)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAG  
 CCTTTCGGGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCC  
 TGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCTGGGGGCGCATGCTTCTGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGG  
 ATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG  
 AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA  
 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCA  
 GGGAGAAGCGCAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGATGTGAAA  
 GCCCGGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG  
 GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGAC  
 GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAC  
 TAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC  
 GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAA  
 CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCAGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTTGGTGTA  
 CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTG  
 TTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
 GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGA  
 GCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC  
 CATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC  
 CGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CANR303 (1,220 นิวคลีโอไทด์)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAG  
 CCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTCACTCTGGGACAAGCCC  
 TGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGATCACCGGCCGCGATGGTCTGGTATGGAAAGCTCCGGCGGTGAAG  
 GATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA  
 GAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGC  
 AGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGATGTGAA  
 AGCCCGGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT  
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA  
 CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAA  
 CTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGC  
 CGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAA  
 CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAACGTCTGGAGACAGGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTGA

CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTG  
 TTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT  
 GTGGGGACGACGTCTAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGACCGGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR102 (1,462 นิวคลีโอไทด์)

TCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA  
 CACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT  
 GCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTGTCCCGCATGGGACGGGG  
 TAAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGGTGGCTACCAAGGCG  
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG  
 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTC  
 GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACG  
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG  
 GCTTGTTCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGCAGGCTAGAGTGTG  
 GTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGC  
 GGATCTCTGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATCCACGTCGTCGGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTT  
 CCCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGCGGAGC  
 ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGT  
 GCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAGACTGC  
 CGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGC  
 TACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT  
 TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG  
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT  
 TGTGGGAGGGAGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR104 (1,523 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA  
 ACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATC  
 TGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTGCGGACCGCATGGTCTGCG  
 GTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGAGTAGTGGCTCACCAAGGC  
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA  
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC  
 GGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTG

TGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG  
 GCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA  
 GTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAA  
 GTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCAGCGG  
 AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACGCCGGAAAACCTGGAGAC  
 AGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA  
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGAC  
 TGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACG  
 TGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGCTGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGTTCCG  
 GATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAAT  
 ACGTTCGGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACC  
 CCTTGTGGGAGGGAGCTGTCAAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGA  
 AGGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR105 (711 นิวคลีโอไทด์)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGG  
 CCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTCGAGCAACCTACCCTCAACTTTGGGATAAGC  
 CTCGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACTACTAGTCACCTCATGGTGGTTGGTTGAAAGTTCTGGCGGTGGG  
 GATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGA  
 GAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 GCAATGGACGAAAGTCTGACGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGC  
 AGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGGACCGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA  
 CGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCTGCACGTCGGGAGTGAA  
 AACTCGGGGCTTAACCCCGAGCCTGCTTCCGATACGGGCAGACTAGAGGTAGGCAGGGGAGAGCGGAACTCC  
 TGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGGCC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR106 (1,533 นิวคลีโอไทด์)

TCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA  
 CACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT  
 GCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGATCACCGGCCGCATGGTCTGGTG  
 ATGGAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGG  
 CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG  
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGACGGCCT  
 TCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA  
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC  
 GGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGCTGTCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTTC  
 GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG

CGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
 TCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAG  
 TTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGA  
 GCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGGAAACGTCTGGAGACA  
 GCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG  
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACT  
 GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGT  
 GCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGG  
 ATGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATA  
 CGTTCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCC  
 CTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA  
 GGTGCGGCTGGAT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไฮโซเลต CALR107 (1,525 นิวคลีโอไทด์)

CTGGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGT  
 GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT  
 GAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGTCTAATACCGGATATGACCATTGCCTGCAT  
 GGGTTGATGGTGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCT  
 ACCAAGGCGACGACGGTAACCGGCCTGAGAGGGCGACCGGTCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
 CTACGGGAGGCGACAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATG  
 ACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCTAACGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG  
 CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT  
 CGTAGGCGGTCTGTTGCGTCCGCGTAAAAGCCACGGCTTAACTGTGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGACT  
 AGAGGCAGGTAGGGGAGCATGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTG  
 GCGAAGGCGGTGCTCTGGGCTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC  
 CTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGGATTCCGCGCCGAGCTAACGC  
 ATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGC  
 GCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCGCCGAAAACCTCGCA  
 GAGATGCGGGTCTTTTGGGCCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTTCCATGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGGACTCATGGGAGACCGCC  
 GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCT  
 ACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCGTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATC  
 GAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT  
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCTTTT  
 GGGGGAGCGGTGCAAGGTGGGGCCGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCG  
 GCTGGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR108 (1,430 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTA  
 ACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAAC  
 CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGG  
 TGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCTACCAAG  
 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG  
 GAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCC  
 TTCGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT  
 GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGG  
 CTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGG  
 TAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG  
 GCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGC  
 CCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCA  
 TGTGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGT  
 GCCTCCTTTGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCGTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCC  
 GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAAACATGCT  
 ACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATT  
 GGGGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT  
 TCCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGC

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต CALR110 (1,431 นิวคลีโอไทด์)

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTA  
 GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT  
 ACCGGATATGACTACCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTA  
 TCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA  
 CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT  
 GATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAG  
 TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT  
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACC  
 CCGGGTCTGCATTCGATACGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAG  
 CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGTGGGCGACAT  
 TTCACGTTGTCCGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACC  
 AAGGCTTGACATACACCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT  
 GTCGTGAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCA  
 TGCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA  
 GTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAG  
 GTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCG  
 CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACG  
 AAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTC

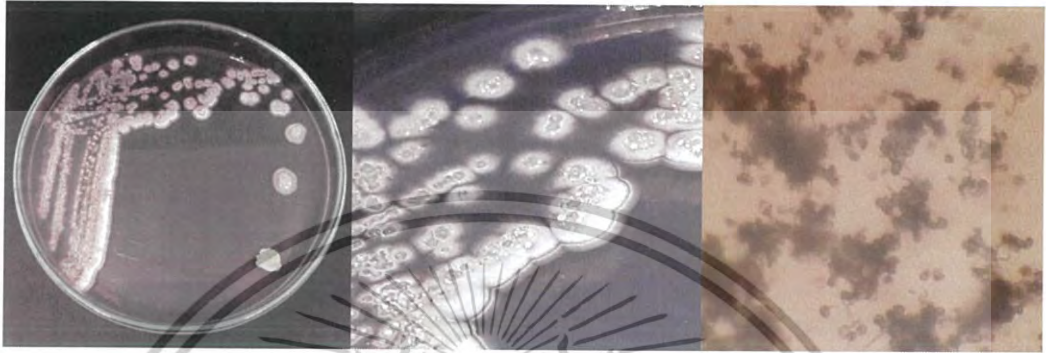


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

รูปแสดงลักษณะโคโลนี สปอร์ และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ

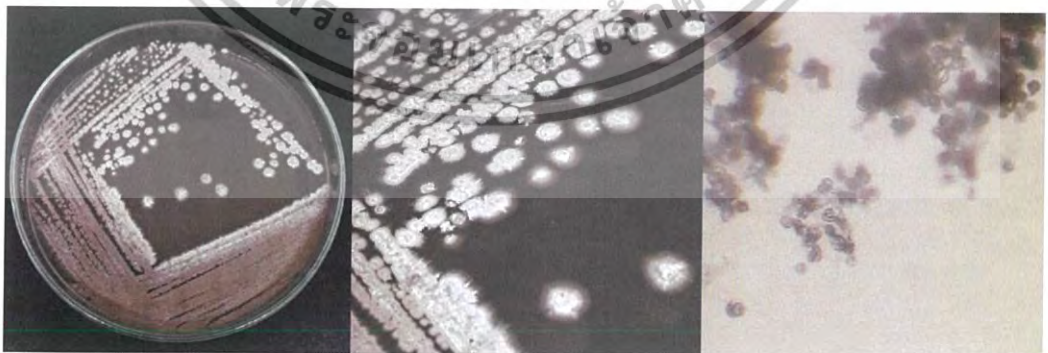
ไอโซเลต CARR101



ไอโซเลต CARR102

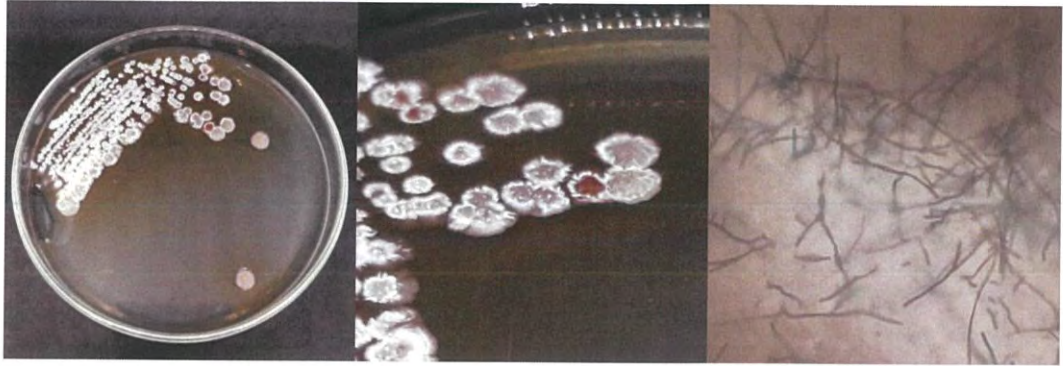


ไอโซเลต CARR201



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR202



ไอโซเลต CARR203



ไอโซเลต CARR204



ไอโซเลต CARR206

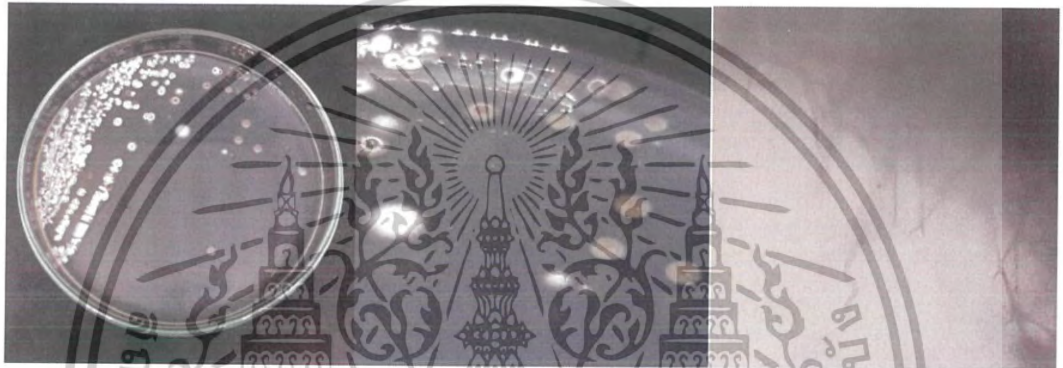


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ออกจากมเหตต์แบลลงเนื้อหาและตองอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR207



ไอโซเลต CANC201



ไอโซเลต CANC202

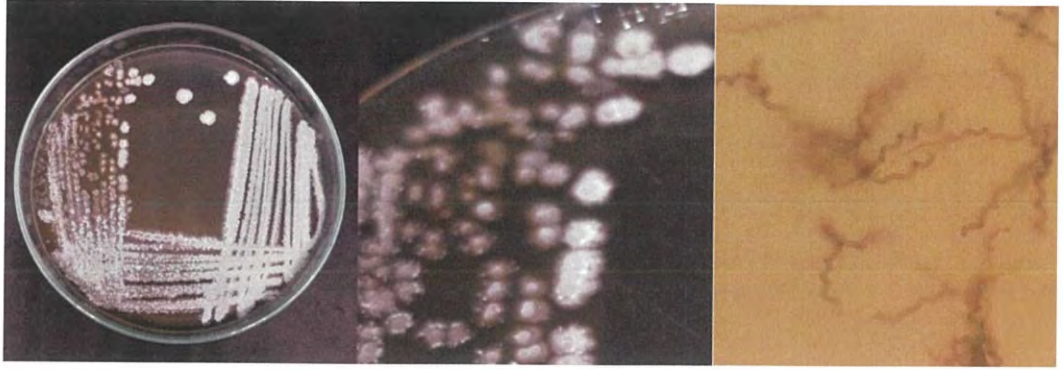


ไอโซเลต CANR102



เอกสารนี้เป็นเอกสารของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR103



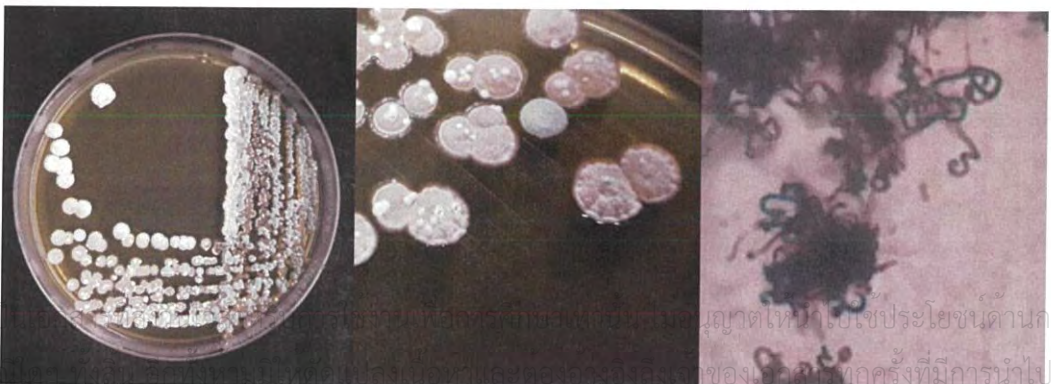
ไอโซเลต CANR104



ไอโซเลต CANR201

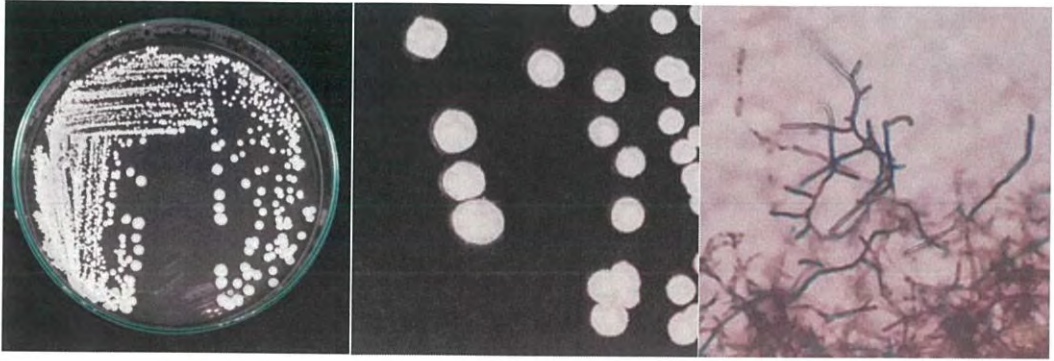


ไอโซเลต CANR301



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ในการค้า  
 ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม หากมีการนำเอกสารนี้ไปใช้ในทางที่ผิด ผู้จัดทำเอกสารนี้จะไม่รับผิดชอบต่อผลที่เกิดขึ้น

ไอโซเลต CANR302



ไอโซเลต CANR101



ไอโซเลต CALR103

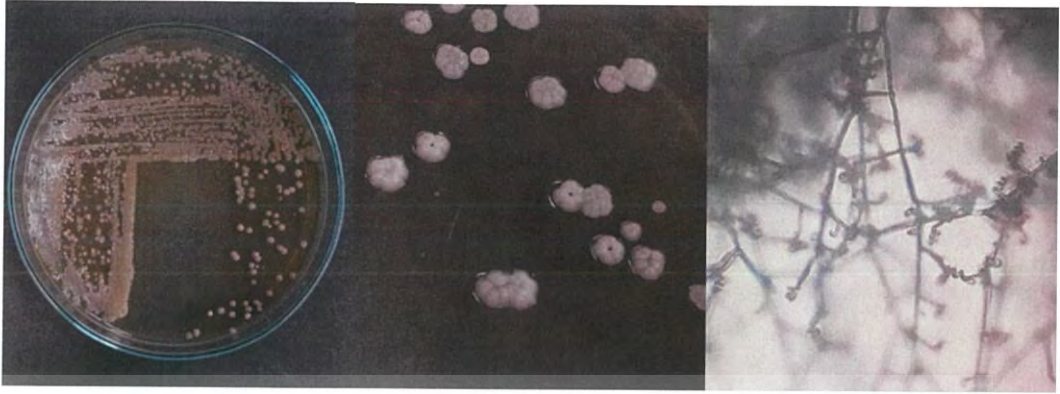


ไอโซเลต CALR109



เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ปรากฏในรูปเล่มของเอกสารฉบับนี้ การคัดลอก การนำเอกสารฉบับนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร หรือการนำเอกสารฉบับนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร ถือว่าผิดกฎหมาย

## ไอโซเลต CALR111



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# รูปผลการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่างๆ

วิธี Dual culture

ไอโซเลต CARR101 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CARR102 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR201 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CARR202 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR203 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CARR204 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR205 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CARR206 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CARR207 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CANC201 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANC202 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

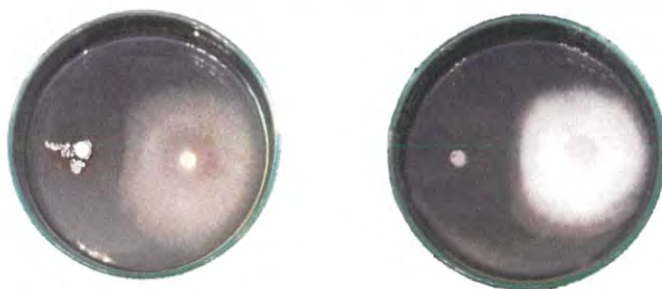
ไอโซเลต CANR101 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน *Fusarium* sp. Isolate 4 การศึกษา *Fusarium* sp. Isolate 5 ปรึกษาขอคำแนะนำการดำเนินงาน  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR102 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CANR103 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR104 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



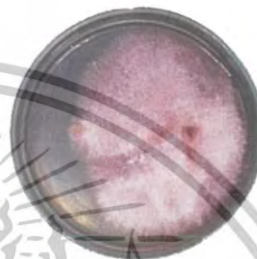
*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CANR105 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



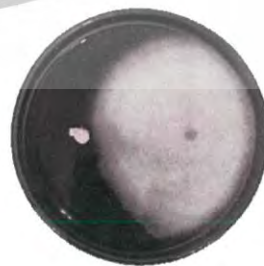
*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR106 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CANR201 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR301 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

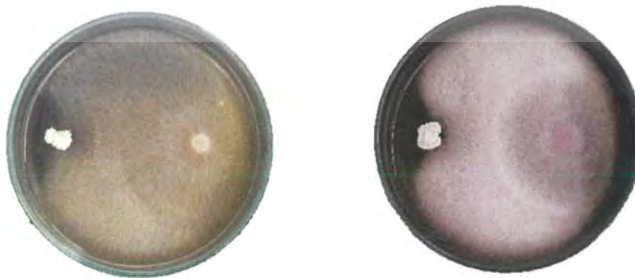
ไอโซเลต CANR302 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR303 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR101 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR102 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR103 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



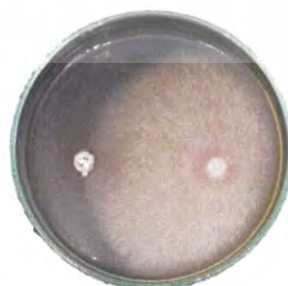
*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



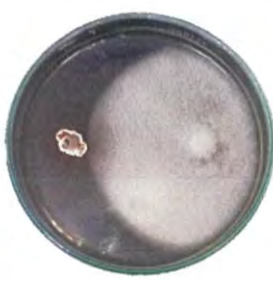
*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR104 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



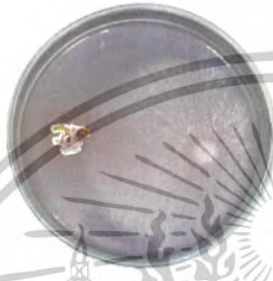
*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR105 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



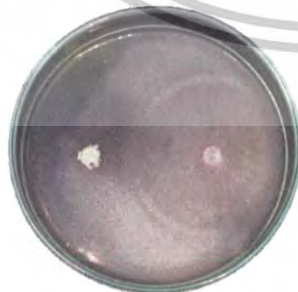
*Fusarium* sp. Isolate 1



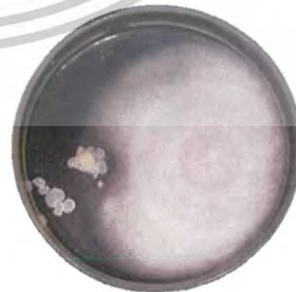
*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR106 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4

*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR107 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



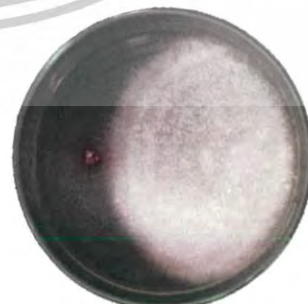
*Fusarium* sp. Isolate 1

*Fusarium* sp. Isolate 2

*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR108 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR109 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR110 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

ไอโซเลต CALR111 แสดงกิจกรรมการต้านต่อเชื้อ *Fusarium* spp.



*Fusarium* sp. Isolate 1



*Fusarium* sp. Isolate 2



*Fusarium* sp. Isolate 3



*Fusarium* sp. Isolate 4



*Fusarium* sp. Isolate 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

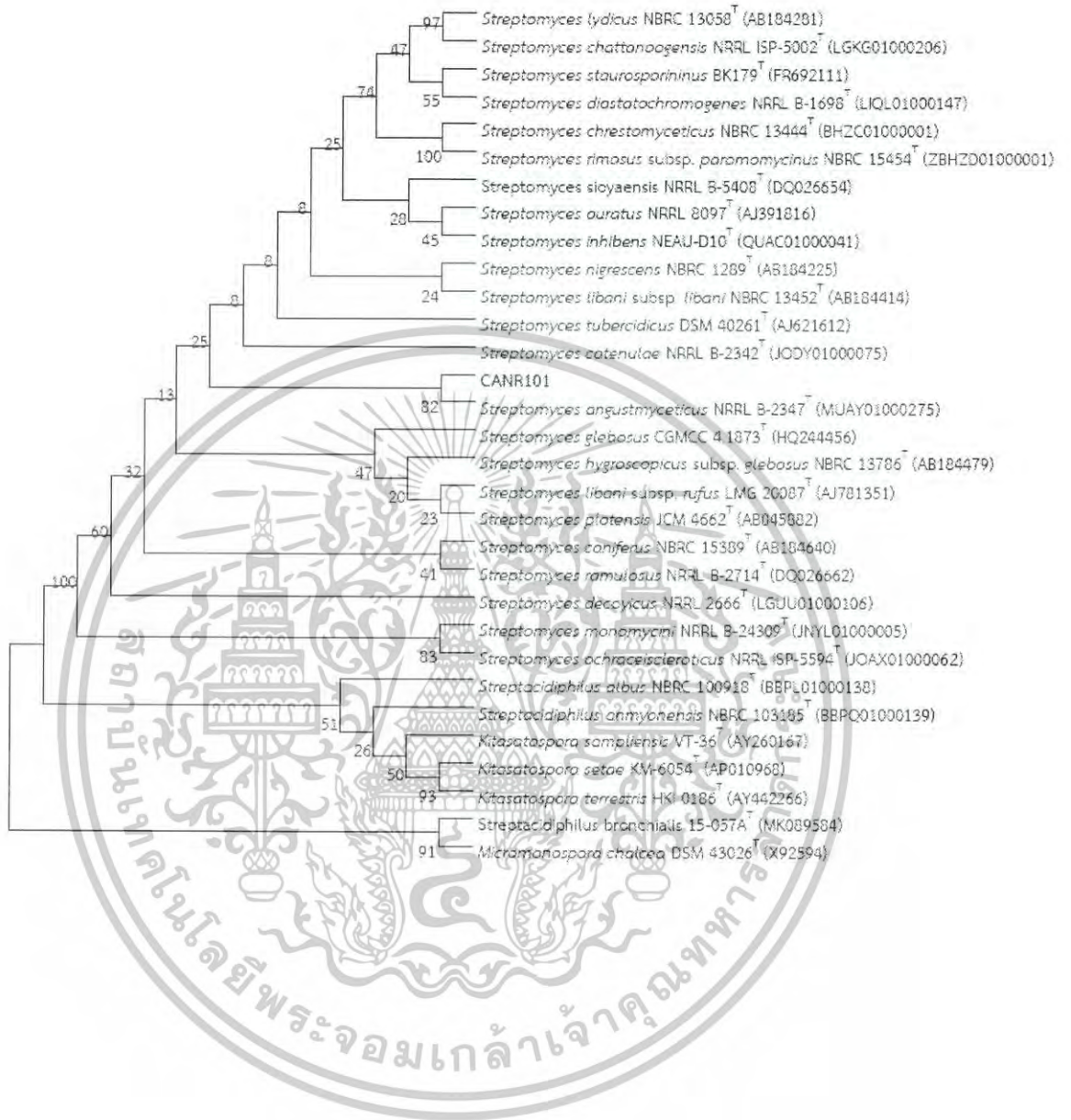
การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ตามลำดับวิธี  
maximum parsimony method

ไอโซเลต CARR205



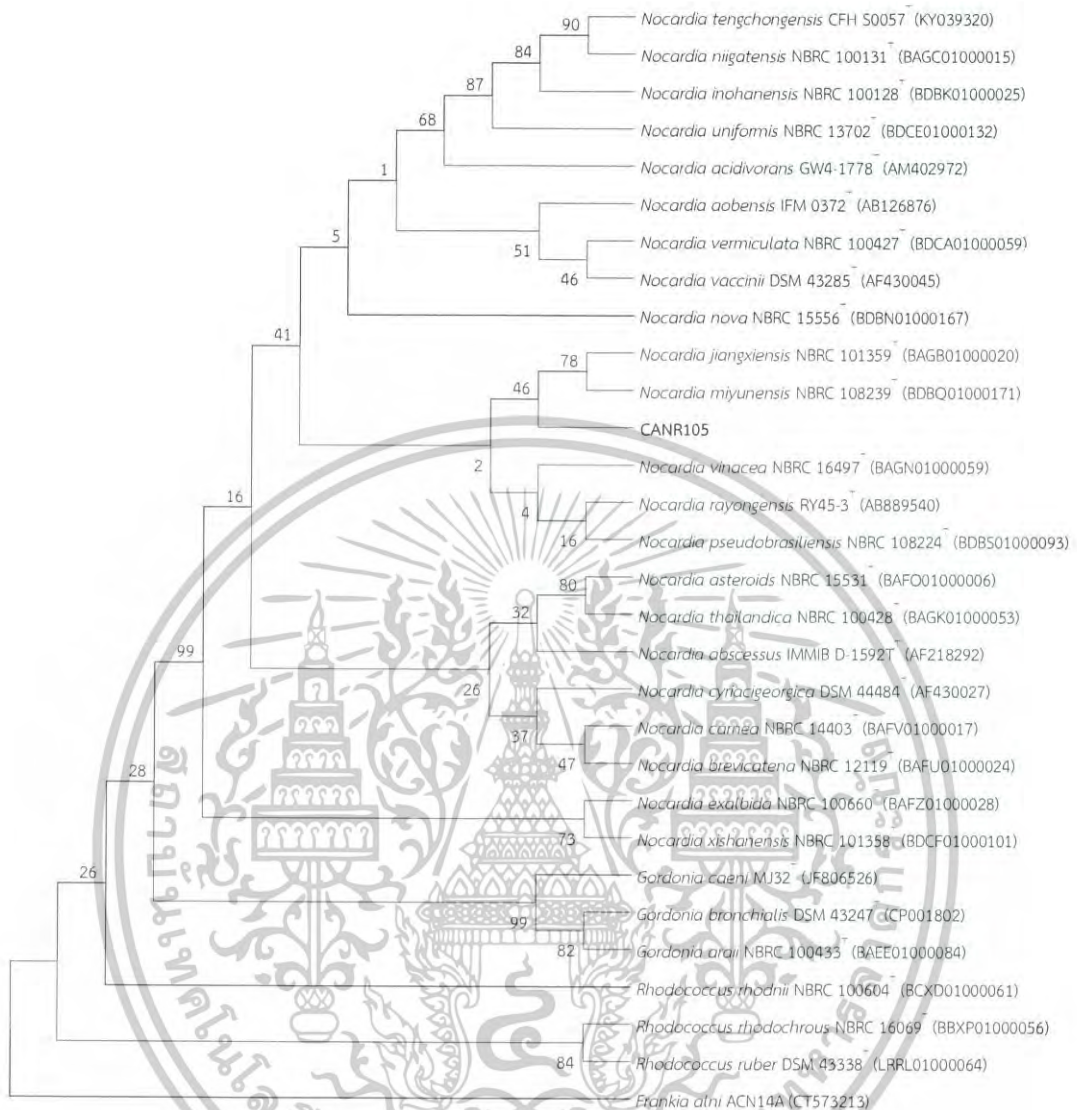
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR101



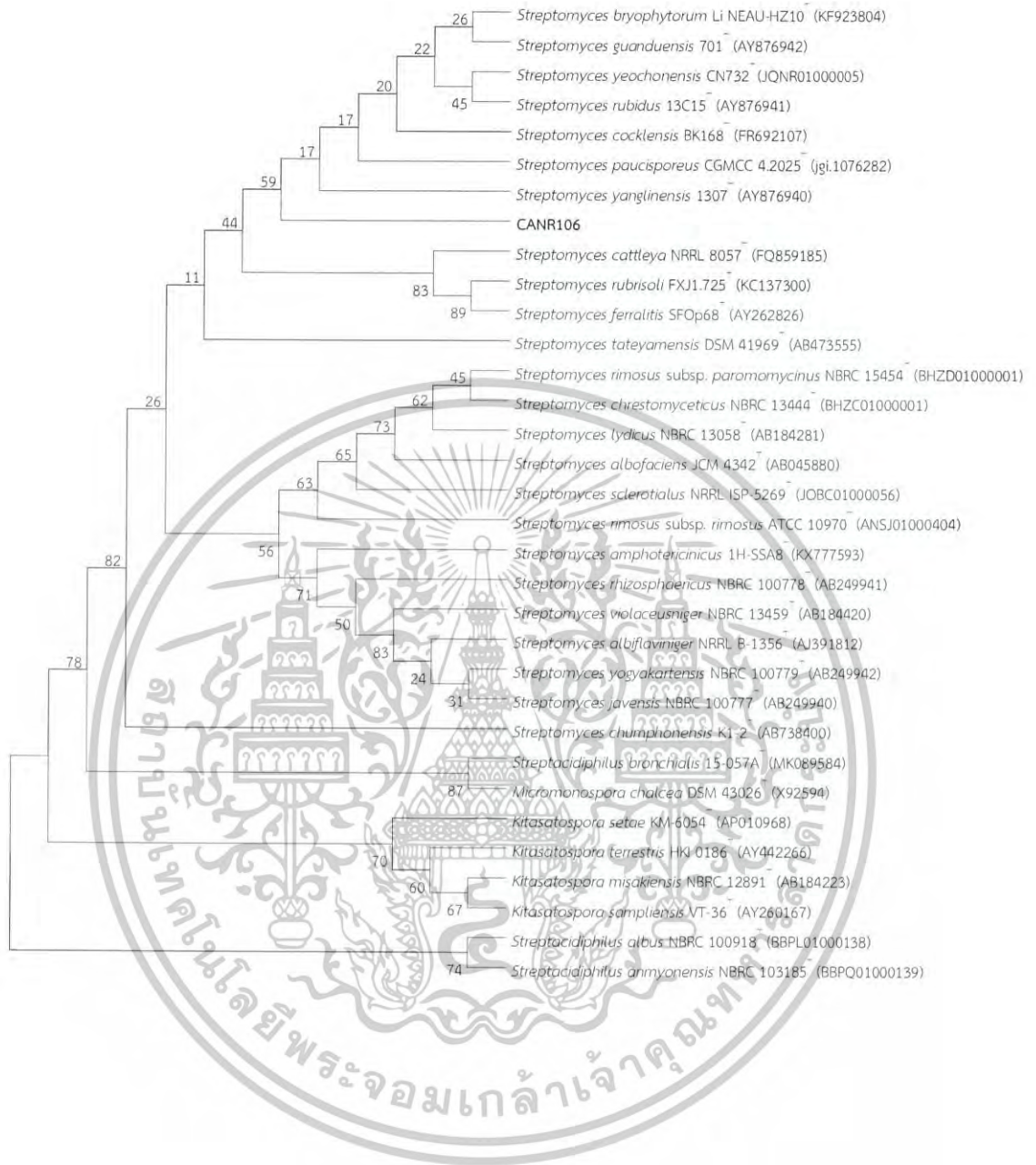
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CANR105



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR106



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CANR303



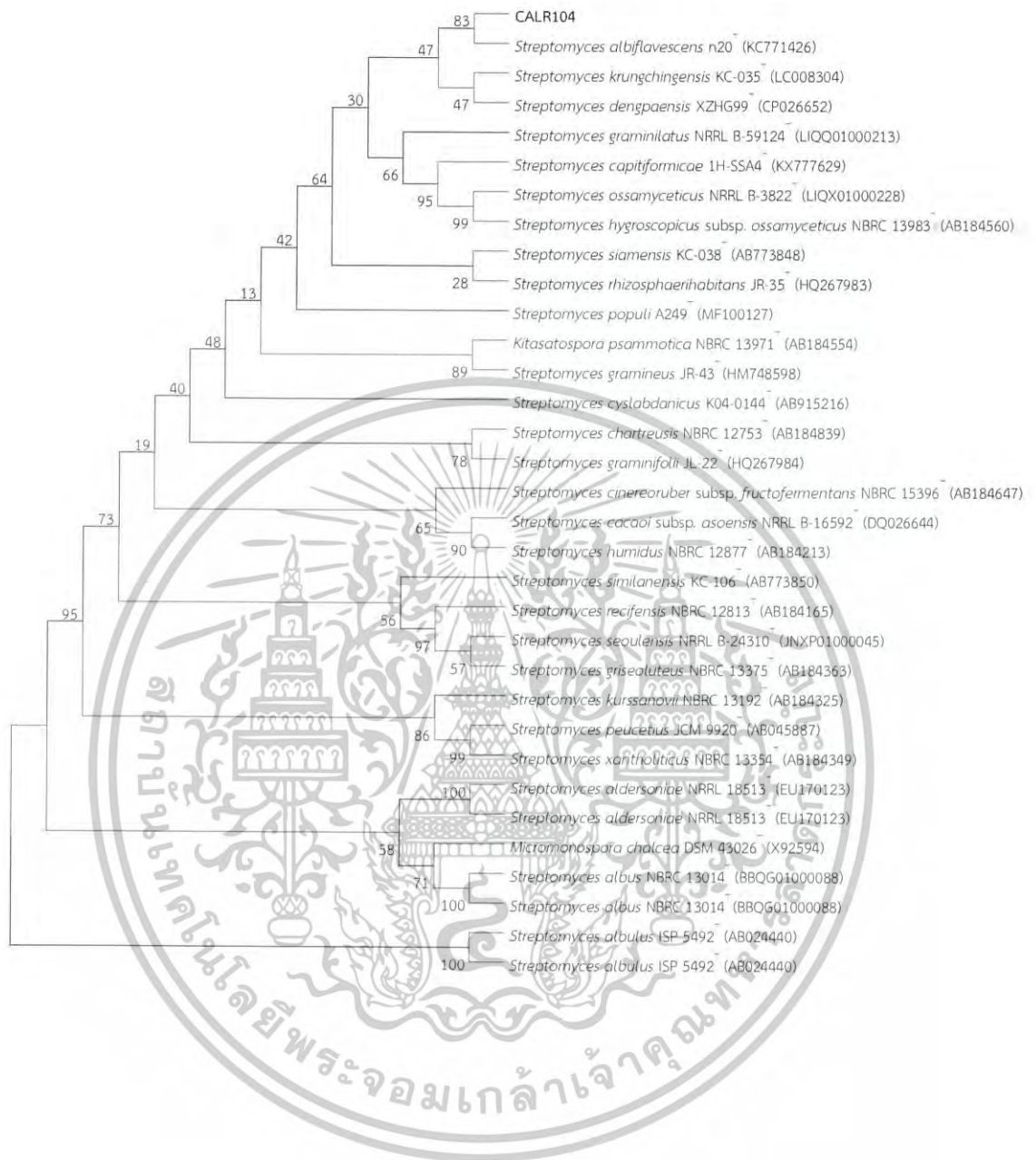
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR102



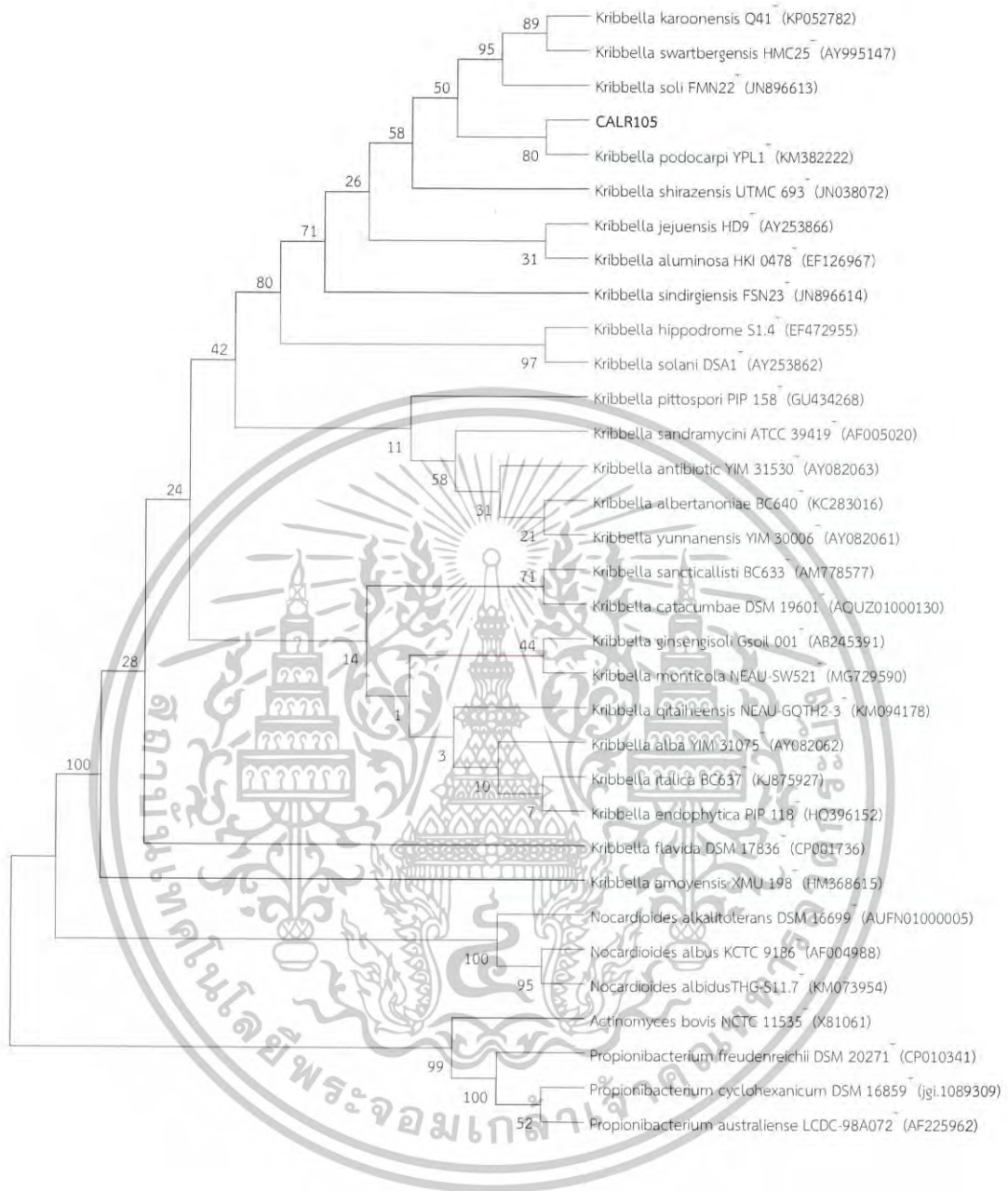
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR104



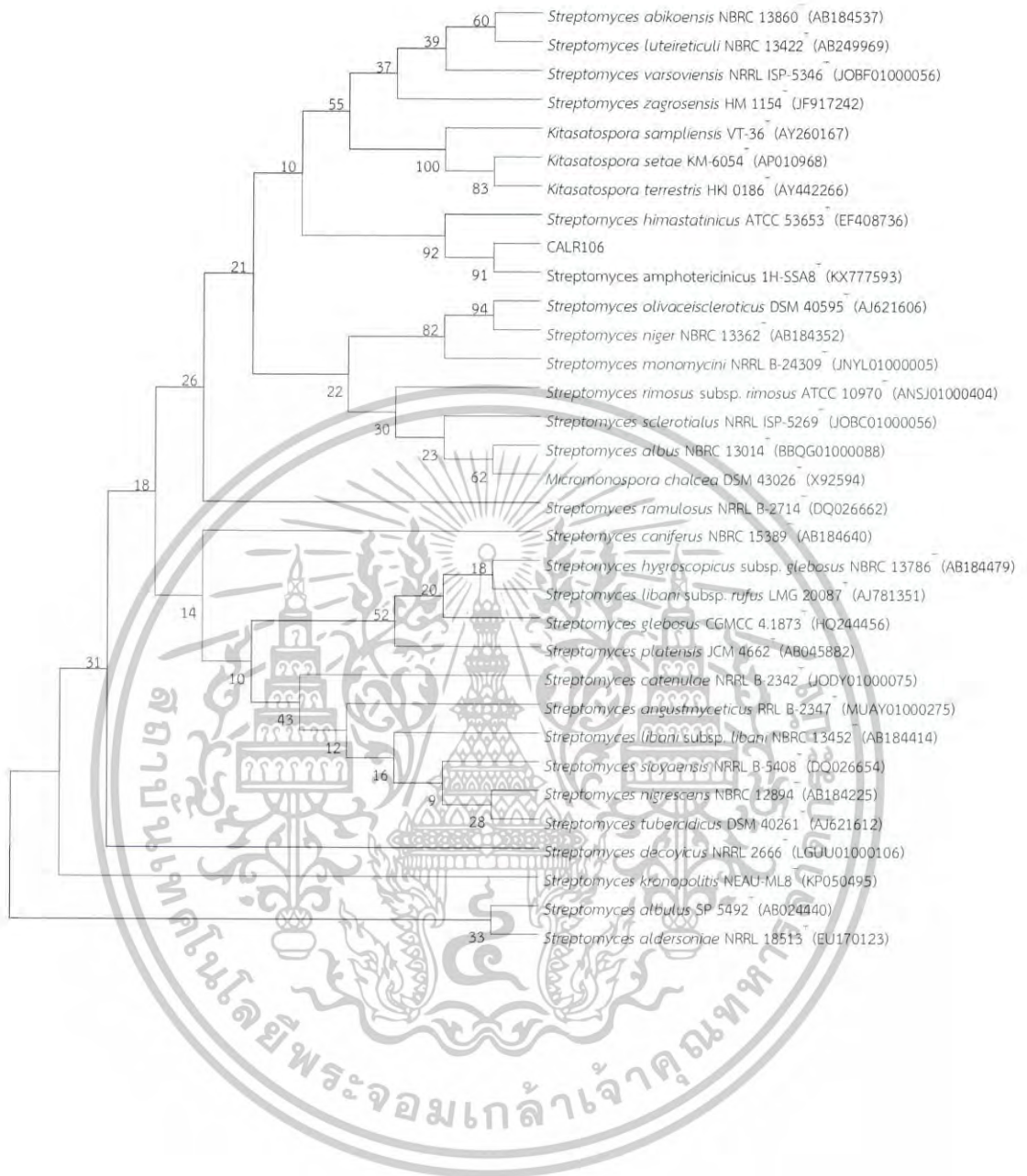
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR105



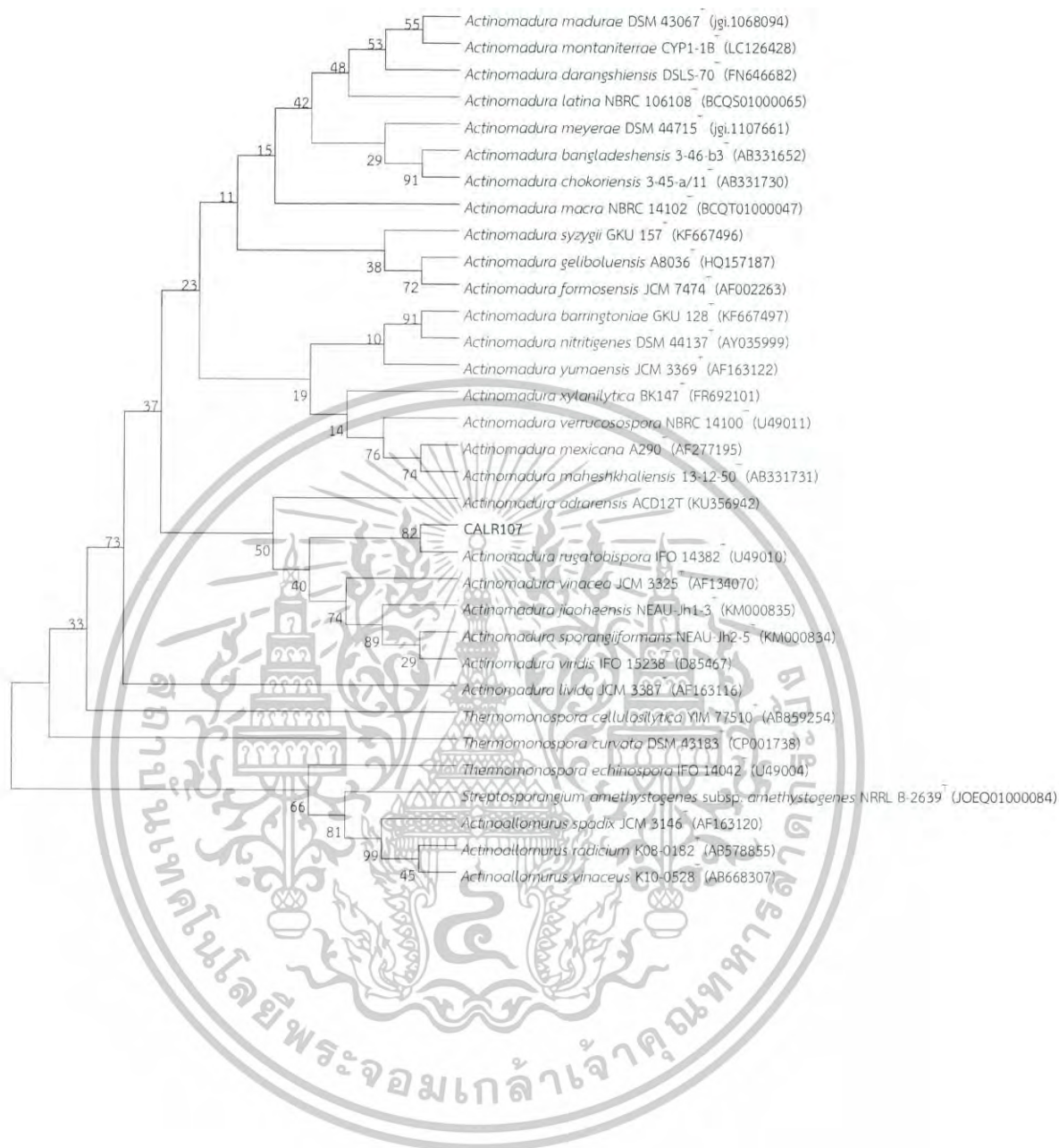
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR106



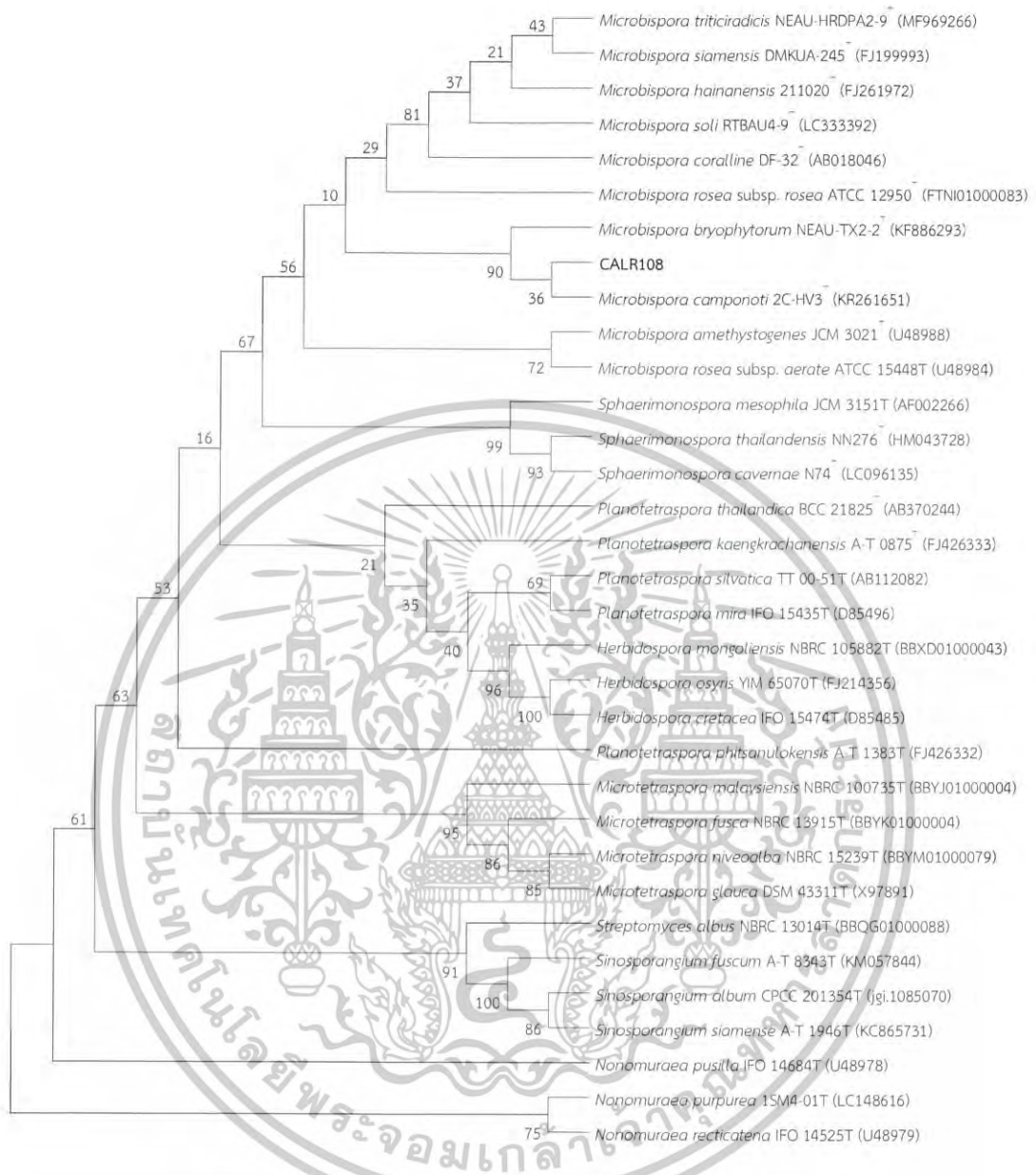
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR107



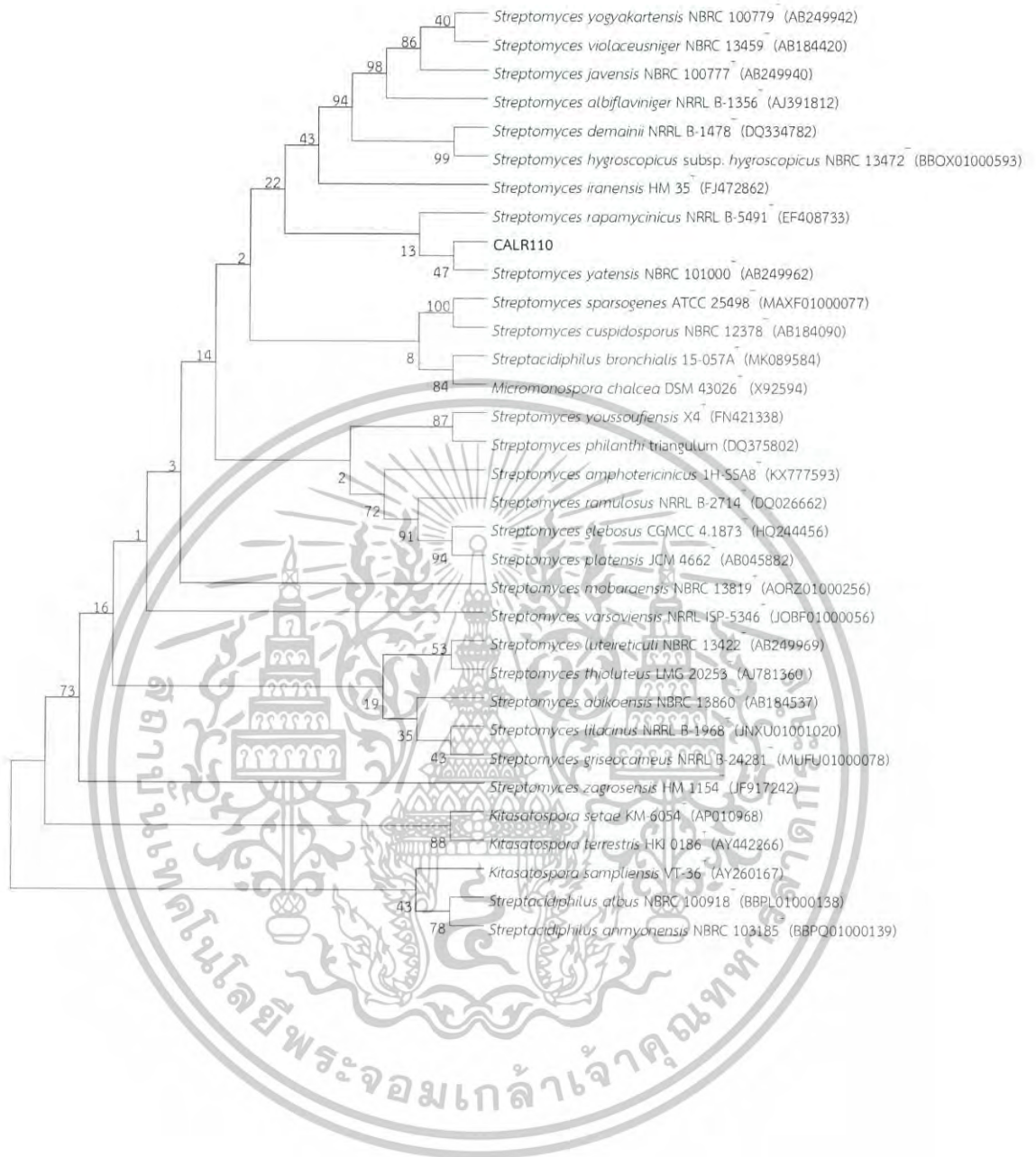
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR108



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR110



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ตามลำดับวิธี maximum likelihood

ไอโซเลต CARR205



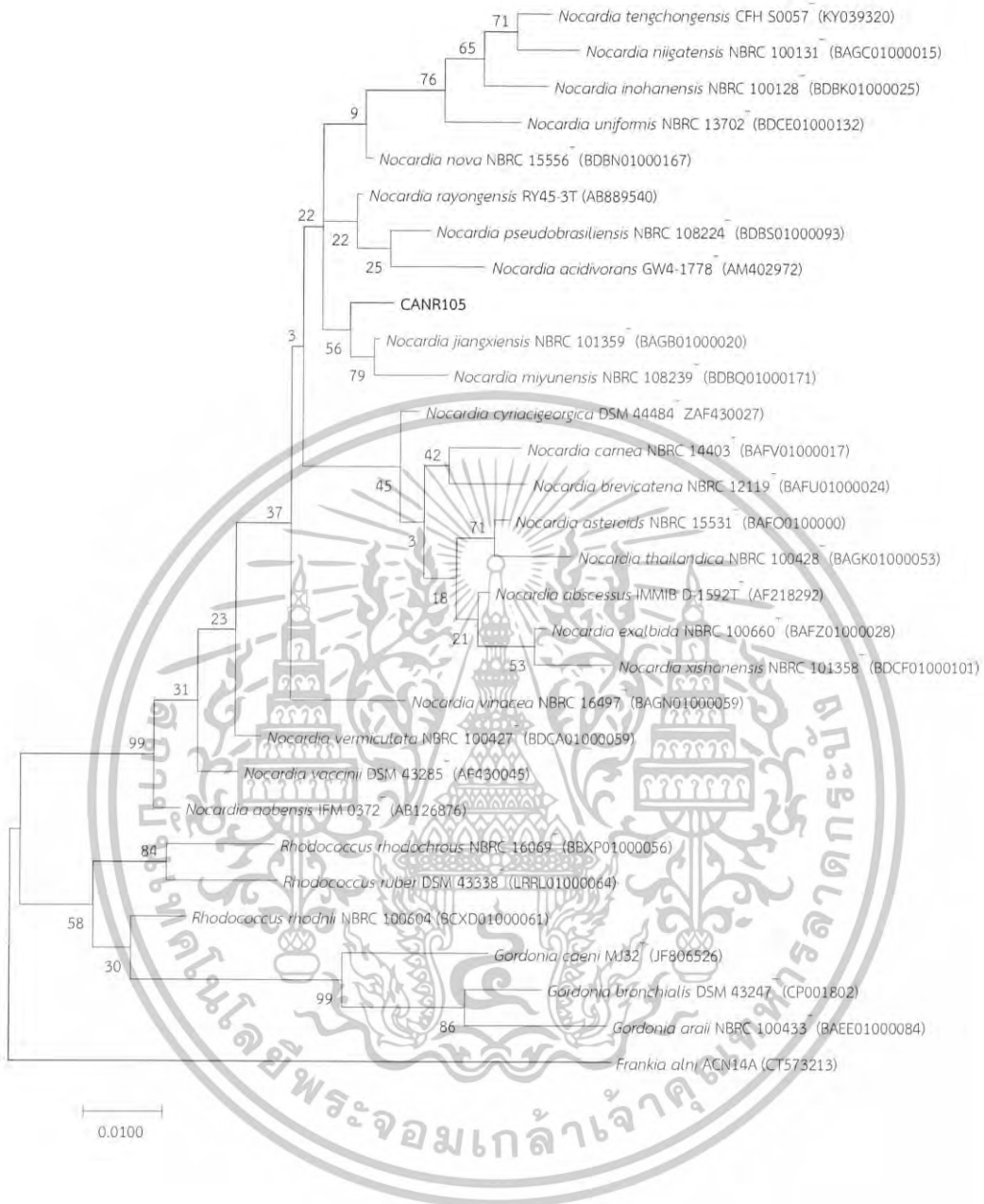
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR101



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CANR105



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ไอโซเลต CANR106



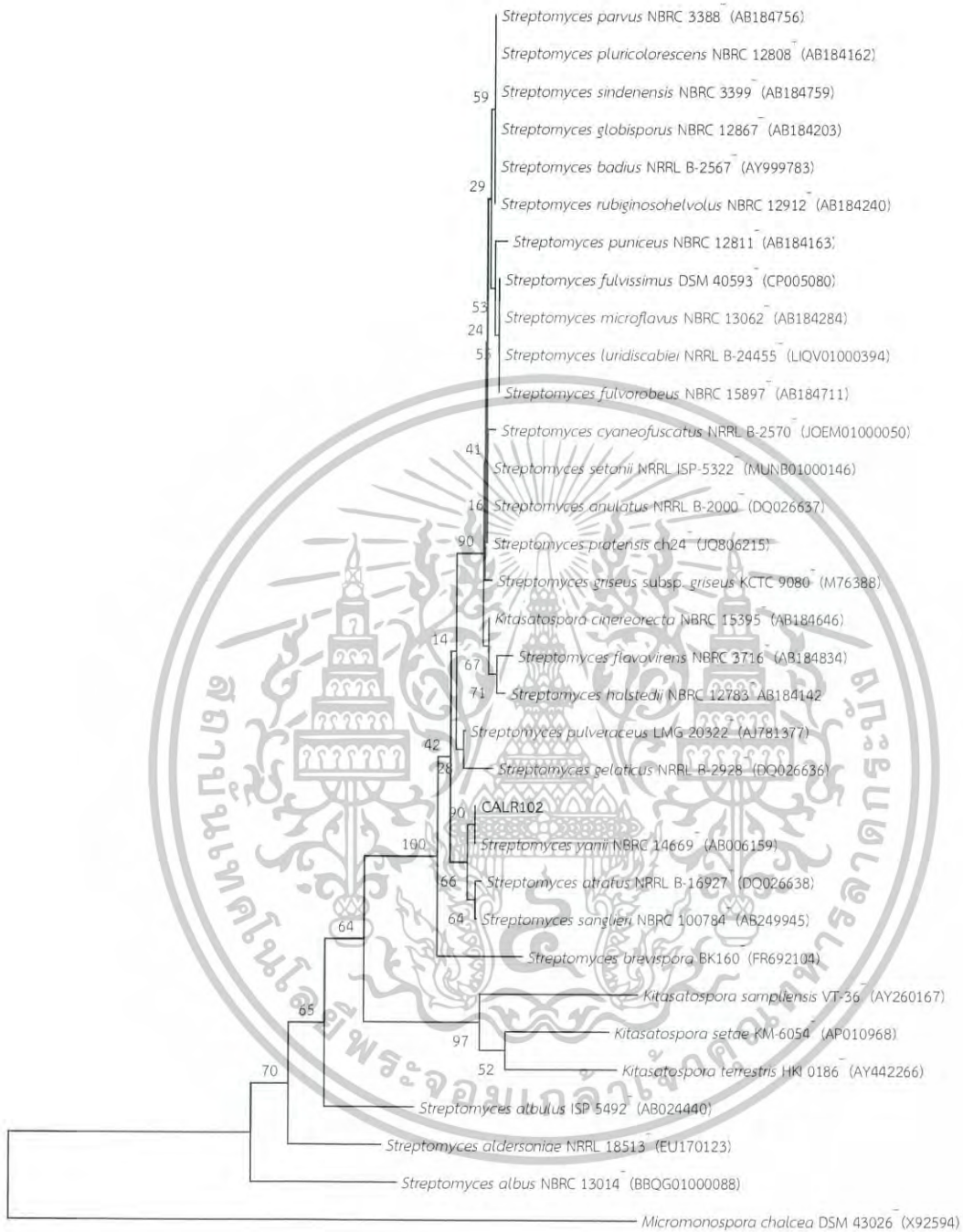
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CANR303



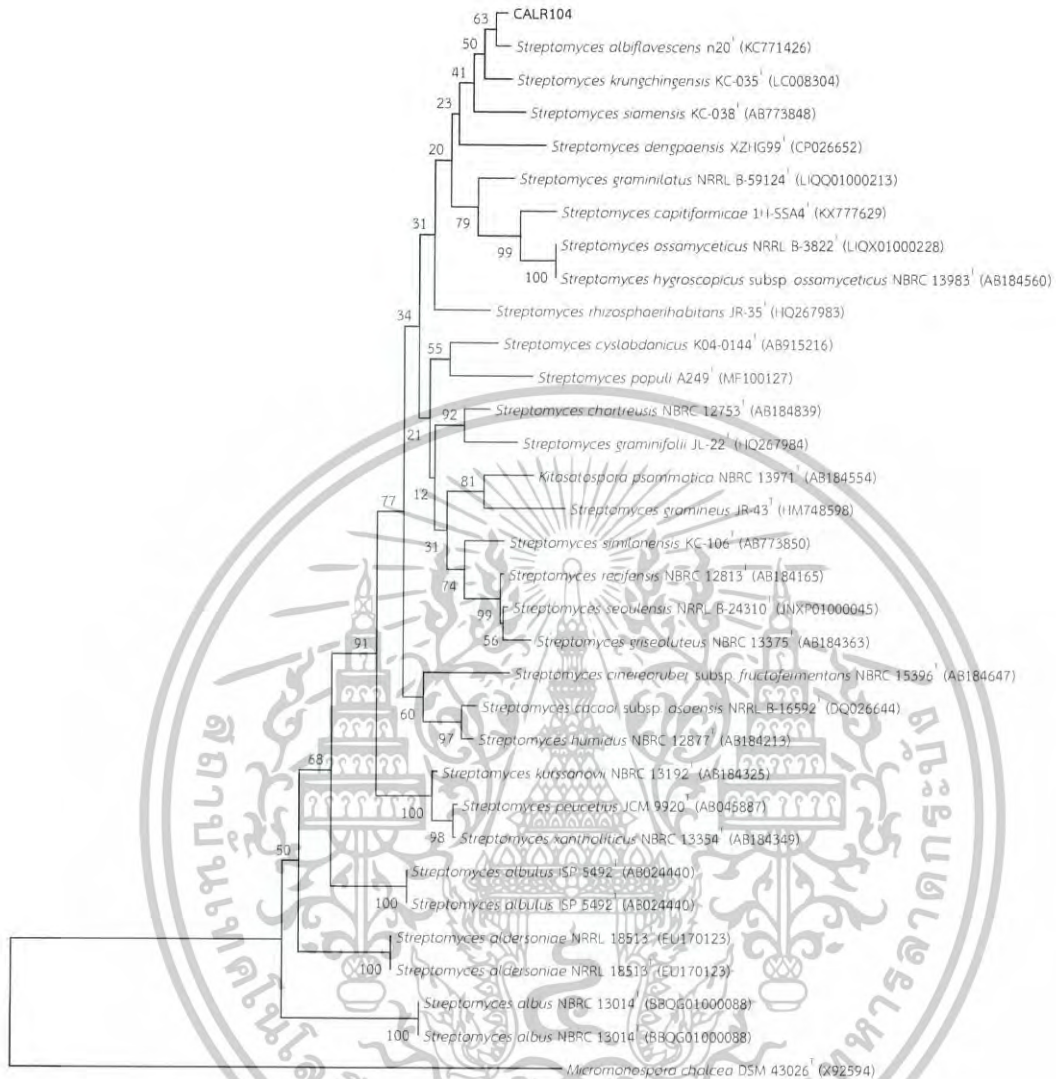
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR102



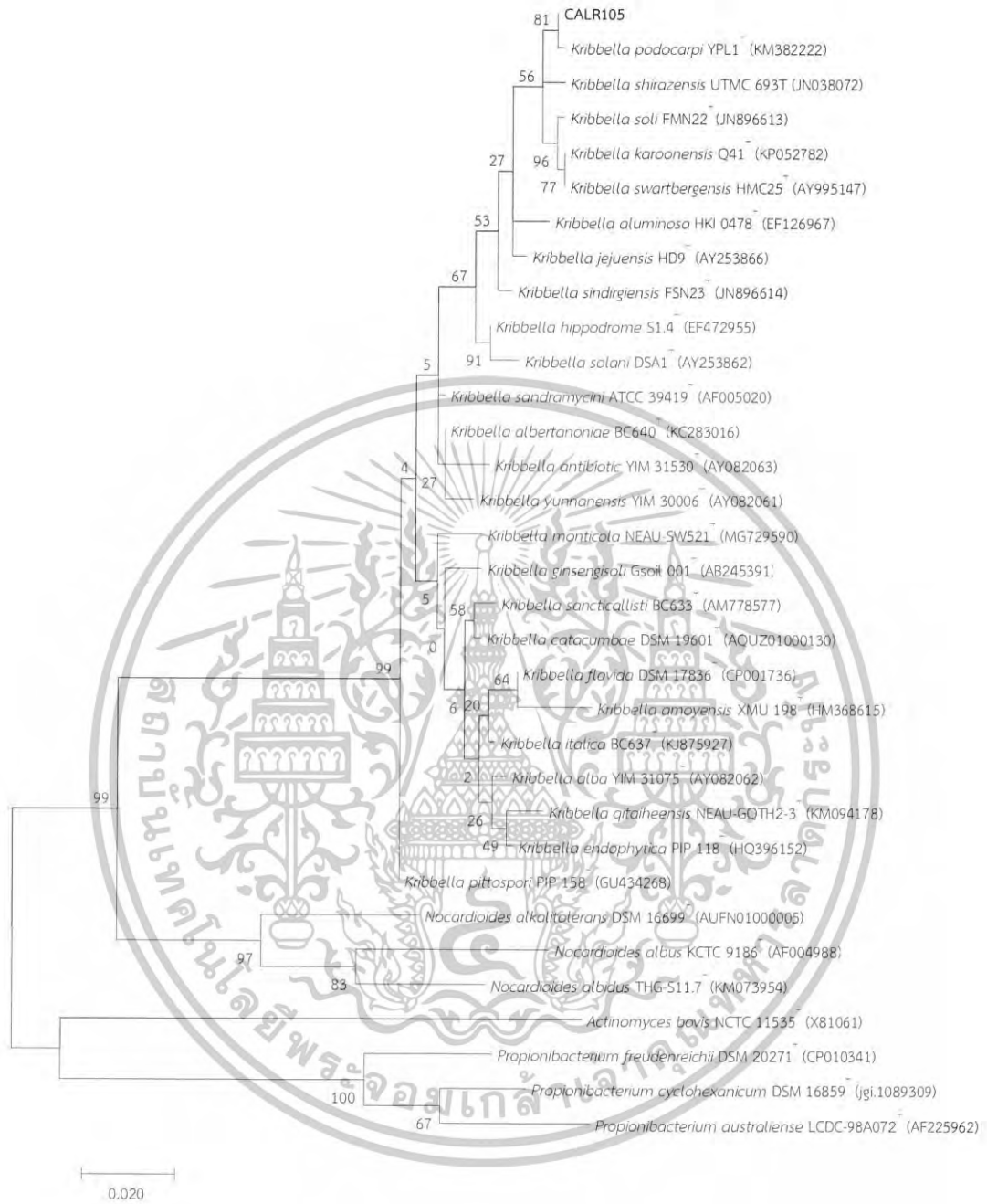
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR104



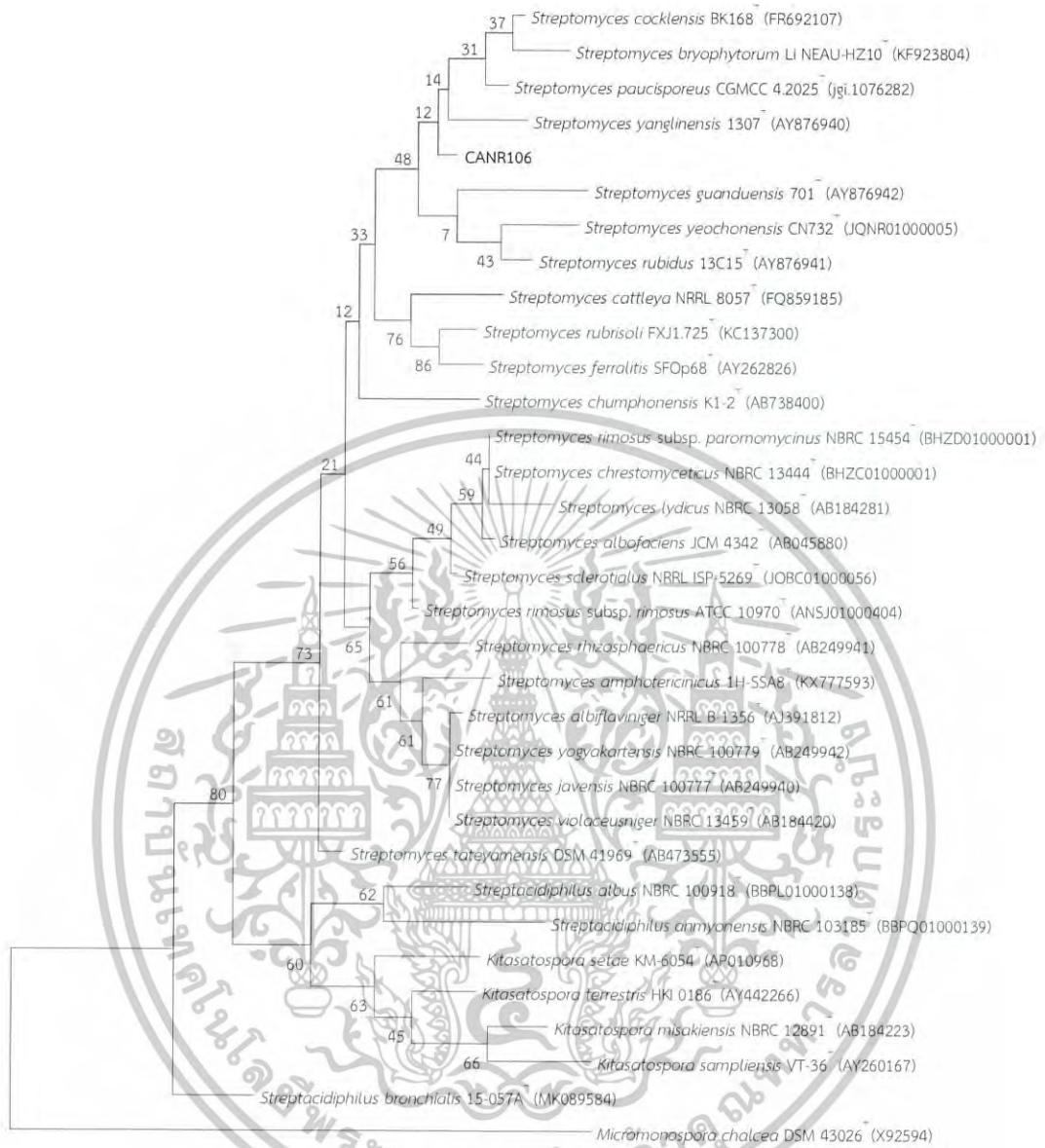
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR105



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR106



0.0100

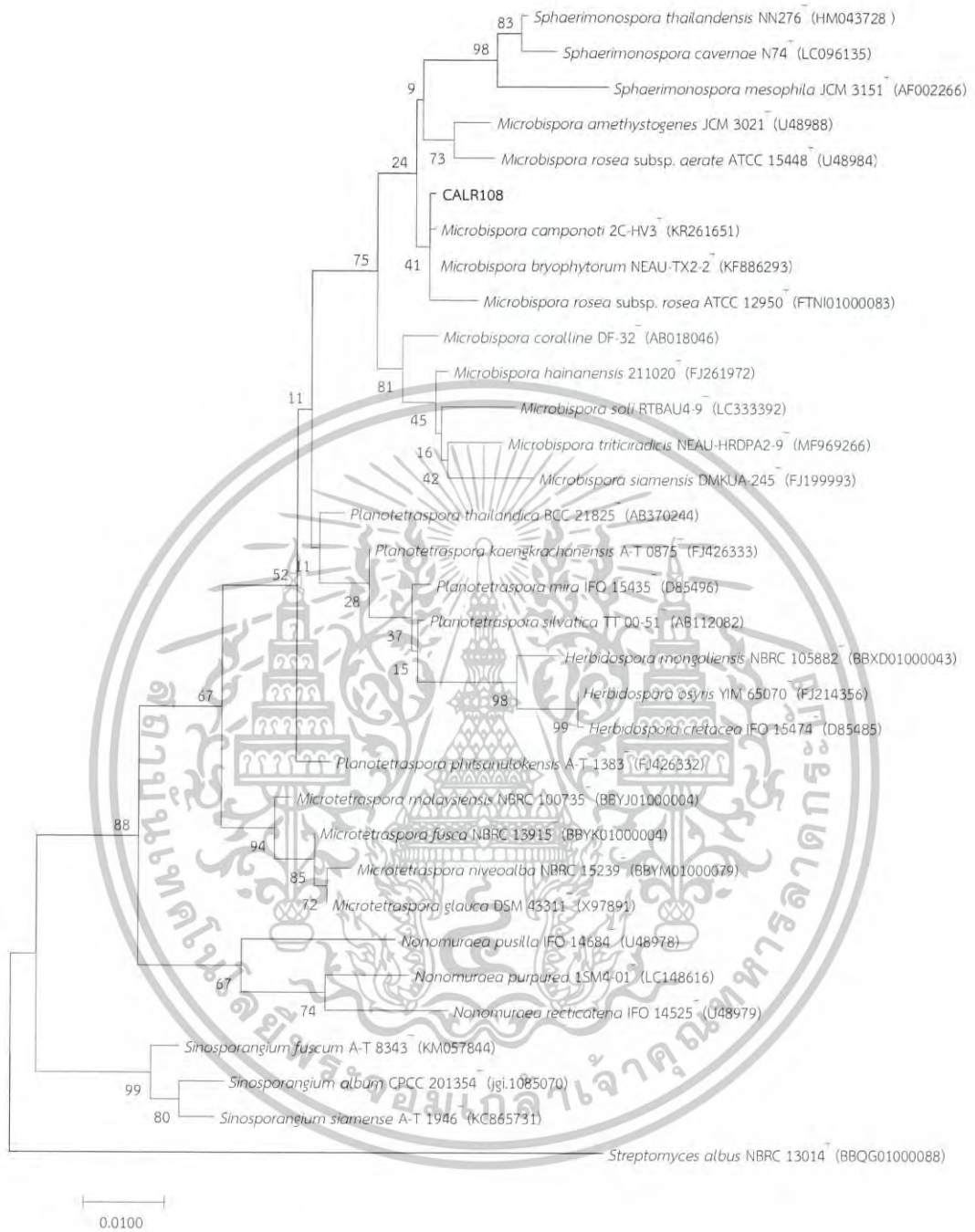
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR107



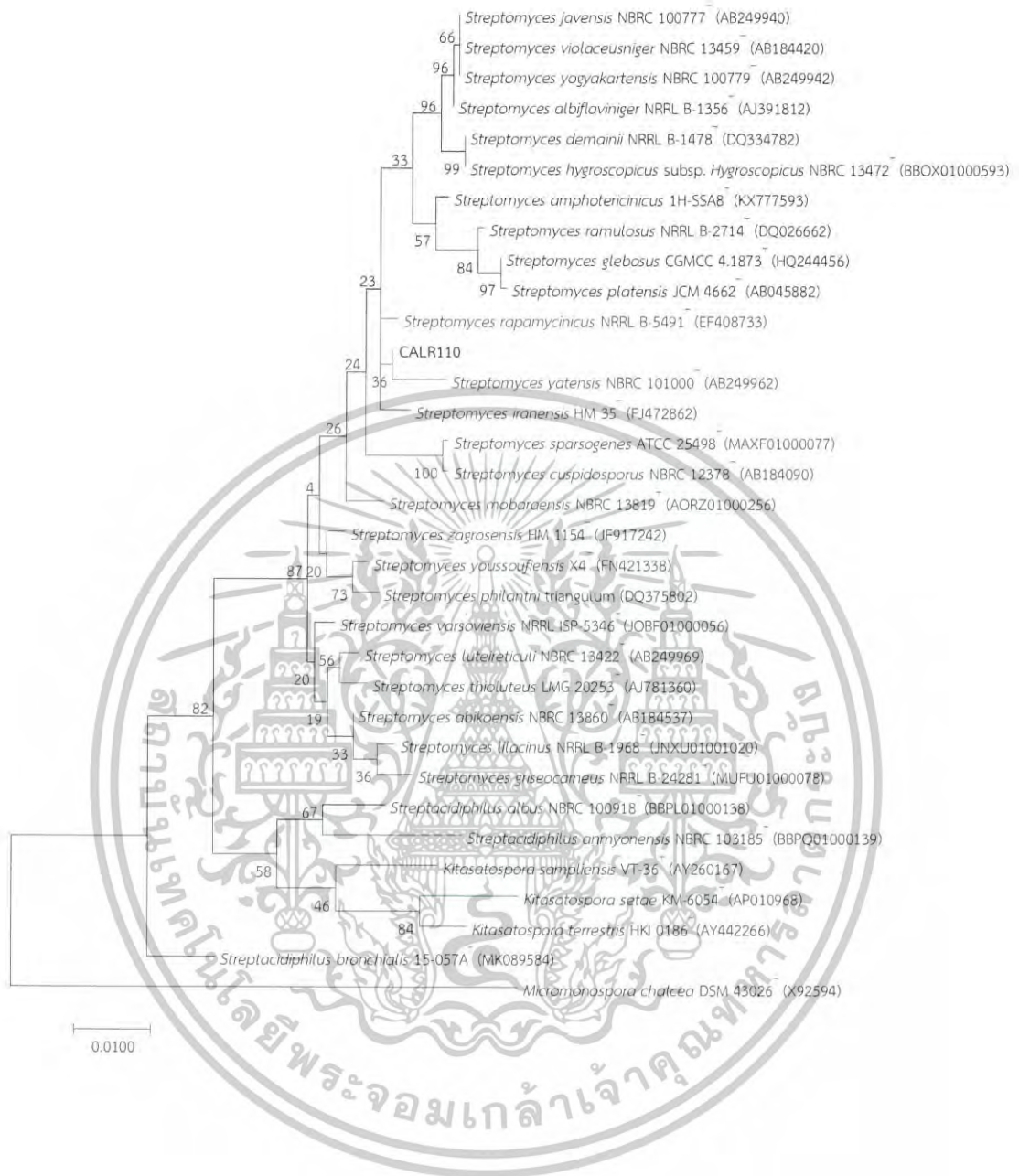
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CALR108



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ไอโซเลต CALR110



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้