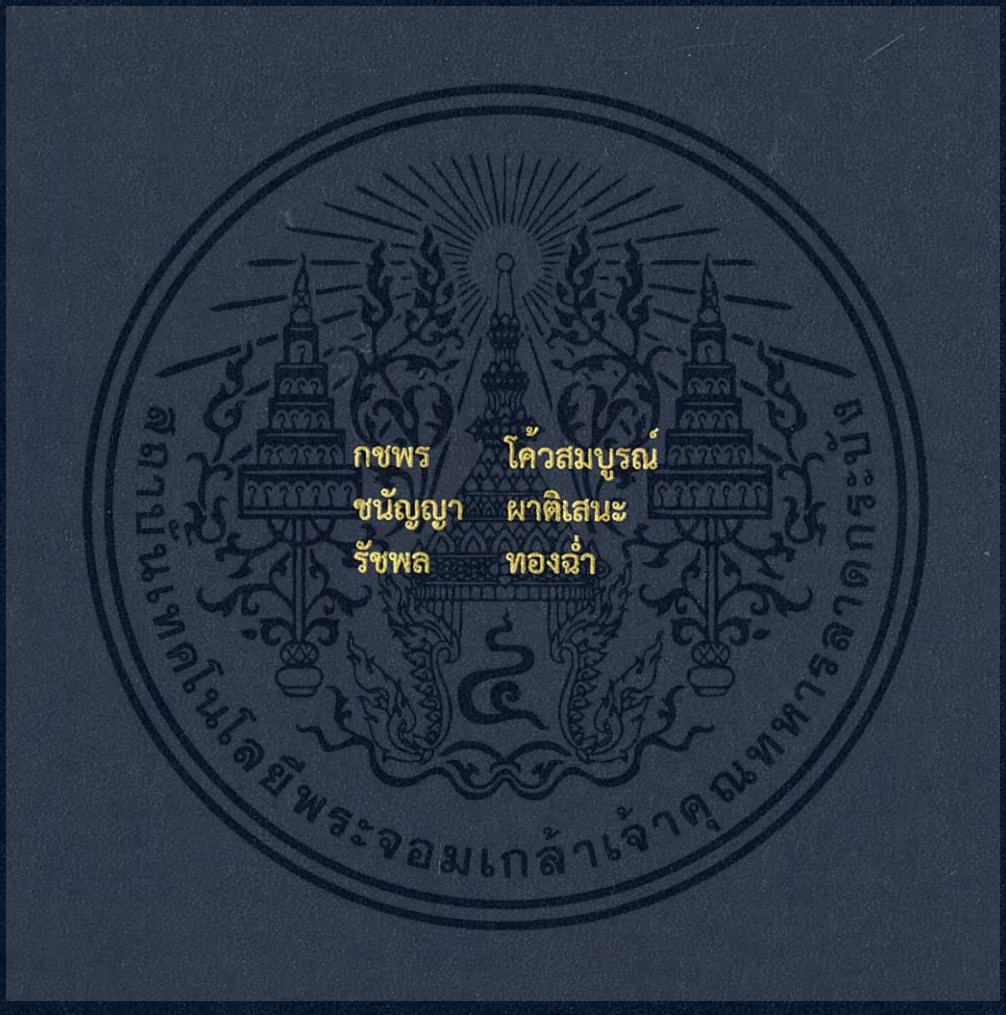
การศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว โดยแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

STUDY ON RICE BLAST DISEASE CONTROL USING ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES



กชพร โค้วสมบูรณ์
ชนัญญา ผาติเสนะ
รัชพล ทองฉ่ำ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว โดยแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

STUDY ON RICE BLAST DISEASE CONTROL USING ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES

T149248

กชพร โค้วสมบูรณ์

ชนัญญา ผาติเสนะ

รัชพล ทองฉ่ำ

วิทย
ว112 ก
2558
ลขหมู่.....
ลขทะเบียน 149248
วัน,เดือน,ปี 30 ส.ค. 2561

b00266104
b.12881624
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON RICE BLAST DISEASE CONTROL USING ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES

KOTCHAPHORN KHOWSOMBOON

CHANANYA PATISAENA

RATCHAPHOL THONGCHUM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวโดยแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ Study on rice blast disease control using antibiotic producing actinomycetes
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชพร โค้วสมบูรณ์ รหัสนักศึกษา 55051051 นางสาวชนัญญา ผาติเสนะ รหัสนักศึกษา 55051072 นายรัชพล ทองฉ่ำ รหัสนักศึกษา 55051101
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2/2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ดวงกมล เรือนงาม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 1/2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ	
ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
รศ.ดร. จิตติ ท่าไว กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว โดยแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชพร โค้วสมบูรณ์ รหัสนักศึกษา 55051051
	นางสาวชนัญญา ผาติเสนะ รหัสนักศึกษา 55051072
	นายรัชพล ทองฉ่ำ รหัสนักศึกษา 55051101
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2/2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไว

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยสีท จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ RRS-8, RRL-8 และ RRB-2 ถูกเลือกมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าว คือเชื้อ *Pyricularia oryzae* แอคติโนมัยสีททุกไอโซเลตถูกระบุชนิดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. oryzae* โดยวิธี Dual culture บนอาหารแข็ง ปรากฏว่า เชื้อทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *P. oryzae* ได้ทั้งหมด น้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ที่เลี้ยงในอาหาร Yeast extract Malt extract ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่า (180 r.p.m.) ถูกนำมาทำให้แห้งด้วยความเย็น จนกลายเป็นผงแข็ง ผงของน้ำหมักเชื้อถูกใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราอีกครั้ง ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าผงของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต RRS-8 ที่ระดับความเข้มข้น 0.4% (W/V) แสดงความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae* จากการพ่นสารละลายของผงน้ำหมักของเชื้อ RRS-8 ที่ละลายในสารละลาย 0.025% tween 20 ในน้ำลงบนใบข้าวที่เลี้ยงในโรงเรือนก่อนที่จะทำการใส่เชื้อ *P. oryzae* (2.53×106 spores/ml) 12 ชั่วโมง แสดงผลว่า สามารถลดการเกิดโรคใบไหม้ในข้าวได้ถึง 97.9% ในขณะที่การพ่นสารละลายผงน้ำหมักเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 0.4% หลังจากใส่เชื้อราก่อโรคไปแล้ว 12 ชั่วโมง แสดงการลดลงของโรคได้ต่ำกว่า

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี, แอคติโนมัยสีท, โรคไหม้ในข้าว, *Pyricularia oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on rice blast disease control using antibiotic producing actinomycetes
Student	Miss Kotchaphorn Khowsomboon 55051051
	Miss Chananya Patisaena 55051072
	Mr. Ratchapon Thongchum 55051101
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Biotechnology
Academy Year	2/2015
Seminar Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

ABSTRACT

Three actinomycete isolates, RRS-8, RRL-8 and RRB-2 were selected for anti-fungal activity against the blast disease pathogen, *Pyricularia oryzae*. All isolates were identified as *Streptomyces*. The result of growth inhibition of *P. oryzae* using dual culture method on solid medium revealed that all isolates could inhibit the mycelial growth of *P. oryzae*. The fermentation broths of these isolates grown in yeast extract-malt extract medium at 30 $^{\circ}$C for 14 days on rotary shaker (180 r.p.m.) were freeze dried into the solid powder. These solid powders were used for testing the anti-fungal activity. The result showed that the solid powder at 0.4% (W/V) of isolate RRS-8 exhibited the best concentration for suppressing the mycelial growth of *P. oryzae*. Applying the 0.4% solution of solid powder of RRS-8 in 0.025 % tween 20 in water on the leaf of rice grown in the greenhouse at 12 h pre-inoculate with *P. oryzae* (2.53×10^{6} spores/ml) exhibited 97.9% disease reduction of rice blast while the 0.4% solution application after pathogen inoculation revealed even lower rates of disease reduction.

Keyword: Biological control, Actinomycetes, Blast disease, *Pyricularia oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษที่ได้รับหมอบหมายฉบับนี้เป็นการศึกษาค้นคว้างานวิจัยเรื่อง การใช้สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้ง 3 ไอโซเลตเพื่อควบคุมโรคไหม้ในข้าว จนได้รายงานฉบับนี้ที่สำเร็จสมบูรณ์ได้ ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่านที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ได้แก่

บิดา มารดา ผู้ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนเกี่ยวกับการดำเนินงานต่างๆ

รศ.ดร.จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ให้คำปรึกษาคำแนะนำ เกี่ยวกับคำศัพท์วิทยาศาสตร์การตรวจทาน และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่างๆ

ผศ.ดร. สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ที่ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขผลทางสถิติ

รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ที่ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำเกี่ยวกับทางด้านการเกษตร

นางสาวนริศรา ก่ำแก้ว ที่ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ ตลอดการศึกษาการทำโครงงานพิเศษ

นางสาวปัฐวี อมรพิพัฒน์ ที่ให้เมล็ดข้าวพันธุ์ดอกหอมมะลิ 105 มาทำการทดลองในการทำโครงงานพิเศษ

นายประสิทธิ์ แผ้วบาง, นายวิทยา เขียวเขิน และนายสมัคร แสงจันทร์ ที่ให้คำแนะนำและการสนับสนุนอุปกรณ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการทดลองในการทำโครงงานพิเศษ

ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาส นี้

หากรายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้สนใจท่านใดก็ตามคณะผู้จัดทำขอยกความดีให้แก่ทุกท่านที่กล่าวขอบคุณมาข้างต้น และ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้

นางสาวกชพร โค้วสมบูรณ์

นางสาวชนัญญา ผาติเสนะ

นายรัชพล ทองฉ่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความสำคัญของข้าว	5
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	6
2.3 นิเวศวิทยาของข้าว	7
2.4 ข้าวพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105	8
2.5 โรคของข้าวที่ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ	9
2.5.1 โรคไหม้ในข้าว (Blast disease)	9
2.6 สารเคมีไตรไซคลาโซล (tricyclazole)	10
2.7 แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria)	10
2.5.1 นิเวศวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย	11
2.5.2 การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย	12
2.5.3 สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย	12
2.5.4 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย	17
2.8 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.	18
2.6.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.	18
2.6.2 ความสำคัญของเชื้อ *Streptomyces* spp.	18
2.6.3 เชื้อ *Streptomyces* spp. กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	19
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ 23

3.2 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ 24

3.2.1 เตรียมเชื้อต้านทานโรค 24

3.2.2 เตรียมเชื้อก่อโรค 24

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ 24

3.4 การศึกษาอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของเชื้อ 24

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype) 24

3.4.1.1 การศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมี 24

3.4.1.1.1 การใช้แหล่งคาร์บอน 24

3.4.1.1.2 ความสามารถในการย่อยแป้ง 25

3.4.1.1.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน 25

3.4.1.1.4 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต 25

3.4.1.1.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน 26

3.4.1.1.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหาร ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 26

3.4.1.1.7 ความสามารถในการเจริญของเชื้ออุณหภูมิต่างๆ 26

3.4.1.1.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหาร ที่มีความเป็นกรด-ด่างในระดับต่างๆ 26

3.4.1.1.9 ความสามารถในการสร้างกรดคาร์โบไฮเดรต 26

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotype) 27

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ 27

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 27

3.4.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์ 28

3.4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16s rRNA gene 29

3.4.2.5 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.5 การเตรียมสารสกัด	30
3.6 การยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (dual culture)	30
3.7 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง	31
3.7.1 ใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (crude extract) มาทำการเพาะเลี้ยง	31
3.7.2 ใช้ส่วนของสารสกัด (solid extract) มาทำการเพาะเลี้ยง	31
3.8 การควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรคในระดับโรงเรือน	32
3.8.1 การป้องกันโรคไหม้ในข้าว	32
3.8.2 การยับยั้งโรคไหม้ในข้าว	32
3.9 การวิเคราะห์ความรุนแรงอัตราการเกิดโรค	33
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	
4.1 ผลการวิจัย	34
4.1.1 ผลอนุกรมวิธาน	34
4.1.2 ความสามารถของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต ในการต่อต้านเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยใช้เทคนิค dual culture	44
4.1.3 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตบนอาหารแข็ง	46
4.1.3.1 การวิเคราะห์การศึกษาภายในจานเพาะเชื้อโดยใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (crude extract)	46
4.1.3.2 การวิเคราะห์การศึกษาภายในจานเพาะเชื้อโดยใช้ส่วนของสารสกัด (solid extract)	72
4.1.4 การประเมินผลการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรคในระดับโรงเรือน	79
4.2 การอภิปรายผล	84
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	86
5.2 ข้อเสนอแนะ	87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	92
ภาคผนวก ข สารเคมี	98
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	99
ภาคผนวก ง การประเมินผลการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค ในระดับโรงเรือน	108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	28
3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	28
3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	29
3.4 โปรแกรม Big_dye	29
4.1 แสดงสีของแอคติโนมัยสีทบนอาหารต่างๆเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน	42
4.2 แสดงผลการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของแอคติโนมัยสีท	43
4.3 แสดงผลการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของแอคติโนมัยสีท	43
4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต	44
4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต	71
4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต	72
4.7 ผลการป้องกันการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี (tricyclazole) ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ในระดับโรงเรือนที่ชั่วโมงต่างๆ	79
4.8 ผลการยับยั้งการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี (tricyclazole) ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ในระดับโรงเรือนที่ชั่วโมงต่างๆ	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	รูปแสดงลักษณะของต้นข้าว	5
2.2	รูปแสดงระบบรากของข้าว	6
2.3	รูปแสดงลักษณะของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105	9
2.4	รูปแสดงลักษณะของต้นข้าวที่เป็นโรคไหม้	9
2.5	รูปแสดงขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	12
2.6	รูปแสดงการสร้าสปอร์เดี่ยว	13
2.7	รูปแสดงลักษณะสปอร์เป็นสาย	14
2.8	การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*	15
2.9	รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร	16
2.10	รูปทรงของอับสปอร์	17
4.1	รูปแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8	35
4.2	รูปแสดงแสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRS-8 บน Phylogenetic tree	36
4.3	รูปแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8	38
4.4	รูปแสดงแสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRL-8 บน Phylogenetic tree	39
4.5	รูปแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2	40
4.6	รูปแสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRB-2 บน Phylogenetic tree	41
4.7	รูปแสดงลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	48
4.9	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	50
4.10	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	53
4.11	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	56
4.12	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	59
4.13	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง	61
4.14	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.15	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	67
4.16	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง	69
4.17	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	74
4.18	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง	76
4.19	รูปแสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง	78
4.20	รูปแสดงประสิทธิภาพของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการป้องกัน	80
4.21	รูปแสดงประสิทธิภาพของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการยับยั้ง	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญญาหารหลักของชาวโลก จัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกับหญ้าซึ่งนับได้ว่า เป็นหญ้าที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลกและมีความหลากหลายทางชีวภาพ สามารถปลูกขึ้นได้ง่าย มีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิ ประเทศในโลกไม่ว่าจะเป็นถิ่นแห้งแล้งแบบทะเลทราย พื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึง หรือแม้กระทั่ง บนเทือก เขาที่หนาวเย็น ข้าวก็ยังสามารถงอกงามขึ้นมาได้อย่างทรหดอดทน สำหรับประเทศไทยข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญมากต่อคนไทยเนื่องจากเป็นอาหารหลักและมีความสำคัญในแง่เศรษฐกิจและสังคม โดยข้าวเป็นสินค้าที่ส่งออกที่สำคัญเป็นตัวนำรายได้ให้กับประเทศ

ปัจจุบันการเพาะปลูกข้าวใช้การควบคุมโรคในข้าวมีอยู่หลายวิธี แต่วิธีที่เกษตรกรมักนิยมใช้คือ การใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อเสียหลายอย่าง คือ สารเคมีที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงยังอาจเป็นอันตรายต่อแมลงและจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้สารเคมียังสามารถสะสมก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ในปัจจุบันจึงหันมาใช้การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม การจัดการโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพเป็นการควบคุมโรคโดยวิธีธรรมชาติหรือเลียนแบบธรรมชาติ โดยปกติในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตต่างๆจะมีการส่งเสริมซึ่งกันและกัน หรือมีการแข่งขันต่อสู้กันเพื่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีพ ดังนั้นการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพจึงเป็นการนำเอาสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่เรียกว่า สิ่งมีชีวิตปฏิปักษ์ หรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ (เรียกรวมๆ ว่า “เชื้อปฏิปักษ์”) มายับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อโรคพืชไม่ให้ทำอันตรายต่อพืชนั่นเองเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อไวรัส ที่สามารถควบคุมและยับยั้งเชื้อโรคพืชได้ดีหากมีการนำมาใช้โดยใส่ลงในดิน พ่นบนใบ หรือฉีดเข้าไปในต้นพืช ปัจจุบันประเทศไทยและหลายประเทศทั่วโลกมีการผลิตเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ออกจำหน่ายหรือแจกจ่ายให้เกษตรกรนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีกันอย่างกว้างขวาง และเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่จะนำมาใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ผลิตสินค้าเกษตรเพื่อจำหน่ายต้องให้ความสนใจพัฒนากรรมวิธีการผลิตด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ปลอดภัยและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการจัดการโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรผู้ผลิตนอกจากจะสามารถนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีแล้ว ยังทำให้ผลผลิตมีคุณภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

โรคที่สำคัญที่ส่งผลกระทบอย่างมากในการผลิตข้าวและเป็นปัญหาต่อเกษตรกรในการเพาะปลูกข้าวส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา โรคไหม้ (blast disease) โรคนี้ระบาดทั่วไป ในทุกภาคของประเทศไทย เกิดจากเชื้อราชื่อ ไพริคูลาเรีย ออไรซี (*Pyricularia oryzae*) ซึ่งเมล็ดสืบพันธุ์ (conidia) ของเชื้อรานี้แพร่กระจายไปได้โดยปลิวไปกับลม ฉะนั้น โรคไหม้จึงแพร่กระจายไปโดยลม เมื่อเมล็ดสืบพันธุ์ของเชื้อราตกลงบนส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่มีความชื้นสูง มันก็จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายต้นข้าว ปกติโรคนี้จะทำให้ใบของต้นกล้าเกิดเป็นแผล รูปกลมหรือคล้ายรูปตาของคน เป็นสีเทา และบางครั้ง จะมีขอบของแผลเป็นสีน้ำตาลด้วย เมื่อใบข้าวถูกเชื้อโรค เข้าทำลายอย่างรุนแรง แต่ละใบก็จะมีแผลเป็นจำนวนมาก แล้วทำให้ใบข้าวแห้งตาย ถ้าใบข้าวจำนวนมาก แห้งตายไปเพราะโรค ในที่สุดก็จะทำให้ต้นกล้าแห้งตายไปด้วย นอกจากนี้ เชื้อรายังสามารถทำให้คอรวงข้าวเน่าเป็นสีน้ำตาลแก่ ทำให้เมล็ดลีบ ดังนั้น เชื้อรานี้สามารถทำให้ต้นข้าวเป็นโรคตั้งแต่ระยะ ต้นกล้าจนถึงออกรวง สำหรับประเทศไทย โรคนี้ รุนแรงมากในฤดูฝน ในระยะที่ต้นข้าว เป็นต้นกล้าและกำลังออกรวง ความรุนแรงของโรคจะมีมากยิ่งขึ้น ถ้าชาวนาปลูกข้าวด้วยพันธุ์ที่ไม่มีความต้านทานโรค และใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราสูงลงในดินนา (Rossman *et al*., 2011) โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* เป็นโรคที่ระบาดมากในช่วงฤดูฝนส่งผลให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ชูเกียรติ, 2551) ซึ่งการใช้สารเคมีควบคุมโรคในข้าว ปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับหลายๆ ประเทศรวมทั้งประเทศไทย (Burges, 1998) จึงมีความพยายามที่จะพัฒนาเทคนิคและวิธีการควบคุมโรคที่นำไปใช้อย่างเหมาะสม เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีในการผลิต คำนึงถึงสิ่งแวดล้อม รักษาสมดุลทางธรรมชาติความหลากหลายทางชีวภาพ และสุขภาพของเกษตรกรตลอดจนผู้บริโภค

สำหรับแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบนิเวศซึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่ทำให้ระบบนิเวศเกิดความสมดุลคือ แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) หรือแอคติโนมัยสีท (actinomycetes) ซึ่งแอคติโนมัยสีทแพร่กระจายเป็นจำนวนมาก ในแหล่งที่มีการเน่าเปื่อยของอินทรียวัตถุตลอดจนในสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ พบมากบริเวณผิวหน้าดินเพราะต้องการออกซิเจนในการเจริญโดยทั่วไปพบ แอคติโนมัยสีทประมาณ 100,000 – 1,000,000 เซลล์ต่อดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งกรัม เจริญได้ดีในดินที่เป็นด่างและเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อราคือมี mycelium แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากราที่สำคัญของ แอคติโนแบคทีเรียคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต และขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา (Martin, 1961; Mark, 1960)

แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่ดี ปรับตัวตามสิ่งแวดล้อมได้ง่าย และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญได้ดี ซึ่งจากงานวิจัยหลายๆงานวิจัยจึงได้มีการใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์ที่ใช้ในการรักษาโรคในพืชและจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด

จากงานวิจัยการศึกษาประสิทธิภาพของสาร SPM5C-1 และ SPM5C-2 ที่สามารถสกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. PM5 ในการยับยั้งโรคไหม้และโรคกาบใบไหม้ของข้าว ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae Rhizoctonia solani* ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างสมบูรณ์ (Prabavathy และคณะ, 2006) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า เมื่อนำสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวมาผสมกับเชื้อ *Streptomyces sindeneusis* แล้วนำไปฉีดพ่นบนต้นกล้าของข้าวทำให้ต้นกล้าเกิดอาการไหม้น้อยลง (Zarandi และคณะ, 2009)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อระบุชนิดแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคข้าวเบื้องต้น
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าวของสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยสีท
3. เพื่อศึกษาการต่อต้านการเจริญต่อเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าวในระดับโรงเรือนหรือแปลงปลูก

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การวิจัยครั้งนี้มีการใช้แอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลต ได้แก่ RRS-8 RRL-8 และ RRB-2 เพื่อทำการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว (blast disease)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถระบุชนิดและศึกษาคุณสมบัติของแอคติโนมัยสีท ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว (blast disease)

2. สามารถใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสีทในการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว (blast disease)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของข้าว

ข้าว เป็นเมล็ดของพืชในสกุลข้าวที่พบมากในเอเชีย ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย จากข้อมูลเมื่อปี 2553 ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองทั่วโลก รองจากข้าวโพด

ปกติการปลูกข้าวเป็นแบบปีต่อปี ทว่าในเขตร้อน ข้าวสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายปีและสามารถไว้ตอ (ratoon) ได้นานถึง 30 ปี ต้นข้าวสามารถโตได้ถึง 1–1.8 เมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดินเป็นหลัก มีใบเรียว ยาว 50–100 เซนติเมตร และกว้าง 2–2.5 เซนติเมตร ช่อดอกห้อยยาว 30-50 เซนติเมตร เมล็ดกินได้เป็นผลธัญพืชยาว 5–12 มิลลิเมตร และหนา 2-3 มิลลิเมตร

การเตรียมดิน เป็นการเตรียมพื้นที่ให้เหมาะสำหรับการปลูกข้าว ซึ่งจะส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของข้าว โดยปรับสภาพดินให้เหมาะสมกับการงอกของเมล็ดข้าว การเจริญเติบโตของข้าว รวมถึงการช่วยควบคุมวัชพืช โรค แมลงศัตรูข้าวและสัตว์คัตรูข้าวที่อาศัยอยู่ในดิน การเตรียมดินยังส่งผลให้ฟางข้าว ตอซังข้าวและวัชพืชถูกไถกลบลงไปในดินเป็นการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดิน นอกจากนี้ยังทำให้ธาตุอาหารพืชที่สะสมอยู่ในดินชั้นล่างกลับขึ้นมาอยู่บนผิวดิน วิธีการเตรียมดินเพื่อปลูกข้าวนั้น ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดินและสภาพแวดล้อมในแปลงนาก่อนการปลูก

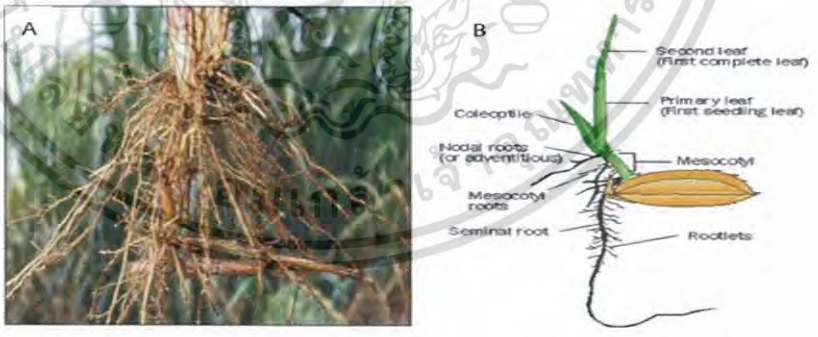
รูปที่ 2.1 รูปแสดงลักษณะของต้นข้าว
ที่มา: (https://kasetmodern.wordpress.com/2014/10/07/rice-music/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชปีเดียว ความสูง 80-130 เซนติเมตร อาจมีความสูงได้ถึง 5 เมตร ในพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตในสภาพน้ำท่วม ระบบรากเป็นแบบรากฝอย มีรากพิเศษเจริญออกมาจากส่วนโคนของลำต้นแล้วหยั่งลงไปในดิน มีการเจริญของลำต้นแบบแตกเป็นกอ ลำต้นแต่ละลำมีข้อและปล้องชัดเจน จำนวนข้อของลำต้นขึ้นกับพันธุ์และฤดูกาลในการเติบโต แต่ละข้อมีใบหนึ่งใบอาจมีกิ่งสั้นๆ หรือรากพิเศษเจริญออกมาจากข้อของลำต้น ปล้องที่บริเวณโคนลำต้นมักเป็นปล้องสั้นๆ และค่อยๆ ยืดยาวมากขึ้นเมื่อเจริญไปทางส่วนปลายลำต้น การเรียงใบแบบสลับ โดยเรียงเป็นสองแถวทางด้านข้างของลำต้น มีกาบใบหุ้มลำต้นซ้อนขึ้นไปเรื่อยๆ จนปกคลุมส่วนปล้องของลำต้นไว้มิดชิด ลิ้นใบมีลักษณะเป็นแผ่นรูปสามเหลี่ยม ยาว 1-1.5 เซนติเมตร มักแยกออกจากกัน พบเขี้ยวใบมีลักษณะเป็นเส้นหรือฟันเลื่อยยาวๆ เกิดขึ้นที่โคนของแผ่นใบ แผ่นใบยาว 24-60 เซนติเมตร กว้าง 0.6-2.2 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบจนถึงมีขนกระจายทั่วแผ่นใบ มักมีขนเล็กๆ คล้ายหนามที่ขอบของแผ่นใบ (ชาญ, 2536; Vergara and De Datta, 1996)

ราก : ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) (รูปที่ 2.2A)ประกอบด้วยรากที่พัฒนามาจากส่วนแรดิเคิล (radicle) เรียกว่า primary root หรือ first seedling root และรากที่แตกแขนงออกมาเรียกว่า secondary root หรือ lateral root รากที่เกิดจาก scutellar node เรียกว่า seminal root ส่วนรากที่เกิดจากข้อใต้ดินตั้งแต่ coleoptilar node ขึ้นไป เรียกว่า adventitious root (รูปที่ 2.2B)



รูปที่ 2.2 ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system)(A), รากที่เกิดจากข้อใต้ดินตั้งแต่ coleoptilar node(adventitious root)(B)

ที่มา: (http://www.baanjomyut.com/library_2/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำต้น (haulm หรือ culm) ประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) ข้อประกอบด้วย วงเจริญ (growth ring) ปุ่มกำเนิดราก (root primordia) ตา (bud) และรอยกาบใบ (leaf scar) ข้าวมีการแตกหน่อ (tillering) ลำต้นหลัก เรียกว่า main culm หน่อที่เจริญจาก main culm เรียกว่า primary tiller หน่อที่เจริญจาก primary tiller เรียกว่า secondary tiller และหน่อที่เจริญจาก secondary tiller เรียกว่า tertiary tiller ตามลำดับ

ใบ (leaf) ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ประกอบด้วย กาบใบ (leaf sheath) และแผ่นใบ (leaf blade) บริเวณรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ (leaf collar) มีเยื่อกันน้ำหรือลิ้นใบ (ligule) หูใบหรือเขี้ยวใบ (auricle) ส่วนที่มีลักษณะคล้ายใบแต่ไม่มีเส้นกลางใบ เป็นสัน 2 สัน พบระหว่างหน่อหรือแขนงที่แตกจากลำต้นเรียกว่า prophyllum

ช่อดอกและดอก : ลักษณะช่อดอกเป็นแบบ panicle ปล้องสุดท้ายของลำต้น (uppermost internode) เป็นก้านช่อดอก (peduncle) แกนกลางช่อดอกเรียกว่า rachis หรือ panicle axis กิ่งที่แตกจาก rachis เรียกว่า primary branch และกิ่งที่แตกจาก primary branch เรียกว่า secondary branch ดอกข้าวเกิดเป็นกลุ่มเรียกว่า spikelet ประกอบด้วย กลีบดอกที่หุ้ม spikelet 2 กลีบ ได้แก่ กลีบด้านนอก (outer glume) และกลีบด้านใน (inner glume) แต่มองเห็นไม่ชัด (rudimentary glume) ดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 3 ดอก มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวที่มีการเจริญ เรียกว่า flowering glume ส่วนดอกย่อยที่ไม่เจริญเหลือเฉพาะส่วน lemma เรียกว่า sterile lemma หรือ non-flowering glume

ผลและเมล็ด เป็นแบบ caryopsis ประกอบด้วยเยื่อหุ้มผล (pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) มีเปลือกหุ้มซึ่งเป็นส่วนของ lemma และ palea เรียกว่า hull ผลของข้าวที่เก็บเกี่ยวมาเรียกว่า ข้าวเปลือก (hulled grain) เมื่อแกะส่วนของเปลือกหุ้มออกเห็นเยื่อหุ้มผล และเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีน้ำตาล เรียกว่า ข้าวกล้อง (brown rice grain) เมื่อขัดส่วนของเยื่อหุ้มสีน้ำตาลออกจะเป็น ข้าวสาร (kernel) ส่วนหัวของข้าวสารมีสีขาวขุ่น เรียกว่า จมูกข้าว หรือคัพภะ (embryo) ที่เหลือเป็นเอนโดสเปิร์ม (endosperm)

2.3 นิเวศวิทยาของข้าว

ข้าวท้องถิ่นมักเป็นข้าวที่ไวต่อแสงต้องได้รับช่วงวันสั้นจึงจะมีการออกดอก แต่ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่มักเป็นข้าวที่ไม่ไวแสง ช่วงวันวิกฤติของข้าวที่ไวแสงประมาณ 12.5-14 ชั่วโมง ข้าวจะให้ผลผลิตสูงเมื่อได้รับแสงแดดจัดเต็มที่ นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดข้าวที่เจริญในช่วงฤดูแล้งมีปริมาณผลผลิตสูงกว่าในช่วงฤดูฝน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-38 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส มีผลให้ดอกย่อยของข้าวเป็นหมันได้ นอกจากนี้อุณหภูมิต่ำทำให้เมล็ดข้าวมีความงอกต่ำ ต้นกล้าตาย ใบข้าวเปลี่ยนเป็นสีเหลือง การแตกกอน้อย ช่อดอกย่อยเหี่ยวลีบ มีความเป็นหมันสูง ต้นเตี้ยแคระให้ผลผลิตเมล็ดข้าวต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความอุดมสมบูรณ์ของดินและอุณหภูมิของน้ำที่ท่วมในนาข้าว มีผลต่อปริมาณธาตุอาหาร การเติบโตและปริมาณผลผลิตของข้าวด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอกการบานของดอก และการถ่ายเรณูอยู่ที่ระดับสูงกว่า 21 องศาเซลเซียส ดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวมีตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินโคลนมีปริมาณอินทรียสาร 1-50 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH ตั้งแต่ 3-10 เกลือ 0-1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแร่ธาตุต่างๆ อยู่ในระดับต่ำมากจนถึงสูงมากได้ ดังนั้นสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์เดียวกันต่างกันไปด้วย ปริมาณน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดการเติบโตของข้าว ข้าวซึ่งปลูกบนที่ดอนต้องการน้ำฝนอย่างน้อย 750 มิลลิเมตร ตลอดระยะเวลาของการเติบโตในช่วง 3-4 เดือน และไม่ทนทานต่อการถูกน้ำท่วมขัง ขณะที่ข้าวซึ่งปลูกในที่ลุ่ม ต้องอยู่ในสภาพที่ได้รับน้ำท่วมขังอยู่ตลอดเวลา จึงนิยมปลูกกันในบริเวณพื้นที่ราบลุ่ม ที่ราบริมฝั่งแม่น้ำและบริเวณปากแม่น้ำ บริเวณน้ำที่ข้าวเหล่านี้ต้องการประมาณ 1,200 มิลลิเมตรต่อหนึ่งฤดูกาล ข้าวมีการเจริญเติบโตในสภาพที่มีความชื้นในดินและในอากาศสูง สามารถปลูกได้ตั้งแต่พื้นที่ราบระดับน้ำทะเล จนกระทั่งบนยอดเขาสูงระดับ 1,230 เมตร ในประเทศฟิลิปปินส์ และ 2,300 เมตร ทางตะวันออกเฉียงเหนือของเทือกเขาหิมาลัย โดยพบว่าระดับความสูงของพื้นที่แทบไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว (Vergar and De Datta, 1996)

2.4 ข้าวพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

ลักษณะทั่วไป: เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสง ต้นสูงประมาณ 140-150 เซนติเมตร อายุเก็บเกี่ยว ข้าวจะออกดอกประมาณวันที่ 20 ตุลาคม และสุกแก่เก็บเกี่ยวได้ ประมาณวันที่ 20 พฤศจิกายนของทุกปีระยะพักตัวของเมล็ด ประมาณ 8 สัปดาห์ ขนาดเมล็ดข้าวกล้องยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก เมล็ดเรียวยาวก้นงอน สีฟาง

ข้อดี: มีกลิ่นหอม เมล็ดอ่อนนุ่มเมื่อนำ มาหุงต้ม ทนต่อสภาพแล้ง ทนต่อดินเปรี้ยวและดินเค็ม คุณภาพการขัดสีดี เมล็ดข้าวสารใส แข็ง มีท้องไข่น้อย นวดง่าย เนื่องจากเมล็ดหลุดร่วงจากรวงได้ง่าย เป็นที่ต้องการของตลาด ขายได้ราคาดี

ข้อจำกัด: ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคใบสีส้ม โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคไหม้ และโรคใบหงิก ไม่ต้านทานแมลงบั่ว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ต้นอ่อนล้มง่าย ถ้าปลูกในบริเวณที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์สูง

การปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง: ต้องคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ให้บริสุทธิ์ ไม่ให้มีเมล็ดพันธุ์อื่นหรือสิ่งเจือปน เช่น เมล็ดวัชพืชและเปอร์เซ็นต์การงอกสูง 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปและเลือกวิธีการปลูกและช่วงเวลาที่เหมาะ

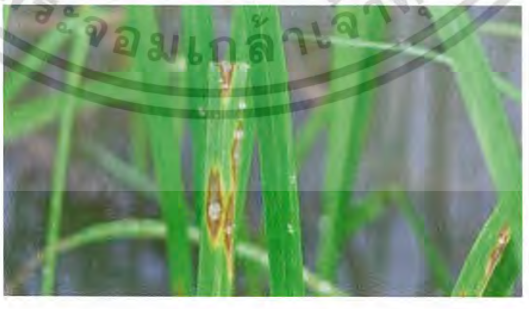
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 รูปแสดงลักษณะของเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

2.5 โรคของข้าวที่ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ

2.5.1 โรคไหม้ในข้าว (Blast disease)

โรคนี้ระบาดทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทยเกิดจาก เชื้อราชื่อ ไพริคูลาเรีย ออไรซี (*Pyricularia oryzae*) ซึ่งเมล็ดสืบพันธุ์ (conidia) ของเชื้อรานี้แพร่กระจายไปได้โดยปลิวไปกับลม ฉะนั้น โรคไหม้จึงแพร่กระจายไปโดยลม เมื่อเมล็ดสืบพันธุ์ของเชื้อราตกลงบนส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่มีความชื้นสูง มันก็จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายต้นข้าว ปกติโรคนี้จะทำให้ใบของต้นกล้าเกิดเป็นแผลรูปกลมหรือคล้ายรูปตาของคน เป็นสีเทา และบางครั้ง จะมีขอบของแผลเป็นสีน้ำตาลด้วย เมื่อใบข้าวถูกเชื้อโรค เข้าทำลายอย่างรุนแรง แต่ละใบก็จะมีแผลเป็นจำนวนมาก แล้วทำให้ใบข้าวแห้งตาย ถ้าใบข้าวจำนวนมาก แห้งตายไปเพราะโรค ในที่สุดก็จะทำให้ต้นกล้าแห้งตายไปด้วย นอกจากนี้ เชื้อรายังสามารถทำให้คอรวงข้าวเน่าเป็นสีน้ำตาลแก่ ทำให้เมล็ดลีบ ดังนั้น เชื้อรานี้สามารถทำให้ต้นข้าวเป็นโรคตั้งแต่ระยะ ต้นกล้าจนถึงออกรวง สำหรับประเทศไทย โรคนี้ รุนแรงมากในฤดูฝน ในระยะที่ต้นข้าว เป็นต้นกล้าและกำลังออกรวง ความรุนแรงของโรคจะมีมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.4 รูปแสดงลักษณะของต้นข้าวที่เป็นโรคไหม้

ที่มา: (http://1.bp.blogspot.com/-2qJ-uG2ZI7I/UgzOig-6GQI/AAAAAAAADeA/-HDM3DIN0FE/s1600/IMG_3536.JPG)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 สารเคมีไตรไซคลาโซล (tricyclazole)

การออกฤทธิ์: เป็นสารกำจัดเชื้อรา triazolobenzothiazole ประเภทดูดซึม

ความเป็นพิษ : มีพิษเฉียบพลันทางปาก (หนูอัลบิโน) 250 มก./กก. (หนู) 305 มก./กก. ทางผิวหนังมากกว่า 2,000 มก./กก.

โรคพืชที่กำจัดได้ : โรคใบไหม้ ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* และโรคจุดสีน้ำตาล ที่เกิดจากเชื้อ *Drechslera spp.*

สูตรผสม: 75% ดับบลิวพี

อัตราใช้และวิธีใช้ : ถ้าฉีดพ่นใช้อัตรา 10-16 กรัม ผสมกับน้ำ 20 ลิตร ถ้าคลุกเมล็ด ใช้อัตรา 2 กรัม ต่อเมล็ดหนัก 1 กก. คลุกเมล็ดก่อนปลูก

อาการเกิดพิษ: ถ้าเข้าตาจะทำให้เกิดอาการระคายเคือง

การแก้พิษ: ถ้าถูกผิวหนังหรือดวงตาให้ล้างด้วยน้ำสะอาดจำนวนมาก ๆ ถ้ากลืนกินเข้าไปให้คนไข้ดื่มน้ำ 1-2 แก้ว แล้วทำให้อาเจียนด้วยการล้วงคอ หรือให้ดื่มน้ำเกลืออุ่น แล้วนำส่งแพทย์ ไม่มียาแก้พิษโดยเฉพาะ รักษาตามอาการ

ข้อควรรู้ - เป็นพิษต่อปลา

- ในขณะฉีดพ่น ให้เขย่าถังฉีดอยู่เสมอ
- ดูดซึมและเคลื่อนย้ายในต้นพืชได้อย่างรวดเร็ว
- อาจใช้ผสมในขณะฉีดพ่นกับสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ได้

2.7 แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria)

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมี mycelium แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากราที่สำคัญของแอคติโนแบคทีเรีย คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอตและขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่าราซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขุรขระคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดอาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆเช่น สีส้ม สีครีม สีเทา เป็นต้น ส่วนการเจริญของเส้นใยสามารถเจริญไปเป็นเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศเรียกว่า aerial mycelium และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่า substrate mycelium ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวนานกว่าแบคทีเรียมากแอคติโนแบคทีเรียจึงเจริญได้อย่างช้า ๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอคติโนแบคทีเรีย จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถนำมาใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกหมวดหมู่ของแอคติโนแบคทีเรียได้ (Martin, 1961)

2.7.1 นิเวศวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

สภาพดินที่พบแอคติโนแบคทีเรียเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันคือ นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้วยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากๆ ในโคลนแม่น้ำ ใต้ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร พบว่าในดินทั่วไปมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นด่าง จะพบแอคติโนแบคทีเรียในจำนวนมากกว่า เช่น ดินที่มี pH 6.5-8 จะมีจำนวนสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินมี pH เป็นด่างทั่วๆ ไปจะพบประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาพที่เหมาะแก่การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียได้แก่บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์แต่ในดินที่ทาการเกษตรจะพบน้อยและจะไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด ชนินทร์ และคณะ (2546) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง โดยคัดแยกแอคติโนมัยสีท 160 และ 186 ไอโซเลต ตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* Wang *et al.* (2001) รายงานการค้นพบแอคติโนมัยสีท สกุล *Actinopolymorpha* จากดินในป่าเขตร้อน (tropical rainforest) ในประเทศสิงคโปร์ นอกจากนี้สามารถพบแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือและอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนในสิงคโปร์ ป่าภูเขาในญี่ปุ่น ป่าใบแข็งในออสเตรเลีย เป็นต้น El-Tarabily (2006) คัดแยก Streptomycesและ non-Streptomycete actinomycetes จากดินบริเวณรอบพืชแตงกวา ซึ่งไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

การทนความแห้งแล้ง เนื่องจากความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดีจึงพบแอคติโนแบคทีเรียในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น โดยสภาพดินแห้งจะมีจานวนมาก

การทนความร้อน โดยทั่วไปสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนได้สูงกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น พบว่าสปอร์ถูกทาลายที่อุณหภูมิ 39°C

ความสามารถในการแข่งขัน จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ในสภาพธรรมชาติ แต่แอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

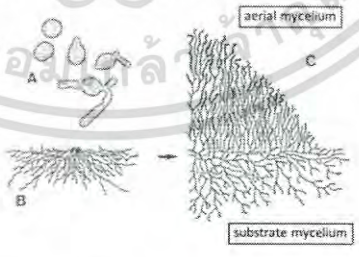
ในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอคติโนแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว (งามนิจ, 2547)

2.7.2 การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียหรือแอคติโนมัยสีทแต่ละกลุ่ม จะมีความต้องการอาหารที่แตกต่างกันไป อาหาร Actinomycete isolation agar ใช้เป็นอาหารสาหรับการคัดแยกเชื้อโดยทั่วไป ส่วนวิธีการแยกเชื้อและอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อเฉพาะกลุ่มจะมีความแตกต่างกันของวิธีการ และส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่นการคัดแยกเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด ควรจะต้องมี ไคติน แป้ง กลีเซอรอล อาร์จินิน แอสปาราจีน เคซีน และไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญ และจะต้องมีการเติมสารแอนติไบโอติกในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อราในความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อลิตร เช่น cycloheximide หรือ nystatin และควรบ่มจานเพาะเลี้ยงไว้นาน 14 วันที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส การแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่หายาก จะต้องมีการนำดินตัวอย่างไปทำ pre-treatment ด้วยวิธีการต่างๆ ก่อนที่จะนำดินนั้นมาทำการคัดแยก เพื่อเป็นการกำจัดแบคทีเรียและเชื้อราในดินออกบ้าง ขณะเดียวกันก็เป็นการลดจานวนเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ไม่ต้องการลงและกระตุ้นการงอกของสปอร์แอคติโนแบคทีเรียที่อยู่ในระยะพักให้พร้อมที่จะเจริญขึ้น (รัตนาภรณ์, มรกต และชินจิ, 2548)

2.7.3 สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

การสร้างโคโลนี โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยวอับสปอร์ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย

B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปในอาหาร (substratemycelium)

C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

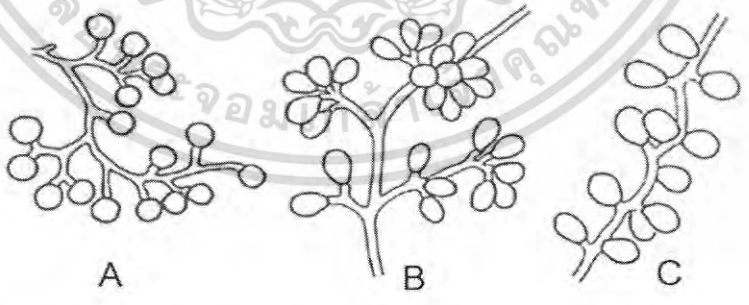
ที่มา: (http://webcache.googleusercontent.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่น ใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัดทำให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียฟูหรือเรียบแบนบางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์มีความหลากหลายตั้งแต่นูน เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ นูน ขรุขระหรือเป็นเกล็ดขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

การสร้างสปอร์ แอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

1) การสร้างสปอร์เดี่ยว การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัวจากนั้นมีการสร้างผนังกั้นและสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทาให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, Thermomonospora และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (รูปที่ 2.6)

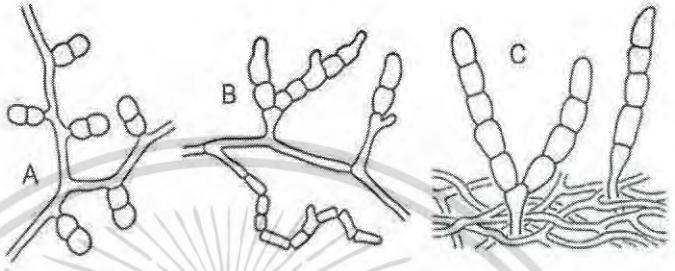


รูปที่ 2.6 การสร้างสปอร์เดี่ยว *Micromonospora* (A) *Thermomonospora* (B)
Saccharomonospora (C)
ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

2. การสร้างสปอร์เป็นสาย ในแอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมากสามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจานวนของสปอร์นั่นคือ di หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bisporous, oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ(รูปที่ 2.7) นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกั้นตรงกลาง



รูปที่ 2.7 ลักษณะสปอร์เป็นสาย การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora* (A) การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* (B)และ *Catellatospora* (C)
ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์ (รูปที่ 2.7) บนสายใยอาหารในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ *N. brevicatena* และ *S.rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปีชีส์ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสปอร์สายสั้นๆบนสายใยอากาศ จานวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ และจนถึง 10 -20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อน 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptoverticllium* มีลักษณะเฉพาะคือก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์เป็นเกลียวซ้อนติดกันกับเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะเกิดการบิดสายสปอร์สั้น อาจจะตรงโค้งงอปลายเป็นขอ การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora, Microcelosporia* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้นหรือสายสั้นๆ บนสายใยอาหาร สายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์กลม *Catellatopora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนโค้งงอ มีสปอร์ 5 – 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหารเป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง

แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญ สปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ (รูปที่ 2.8) สปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มี สปอร์มากกว่ามักเรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มรา ในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ คือ

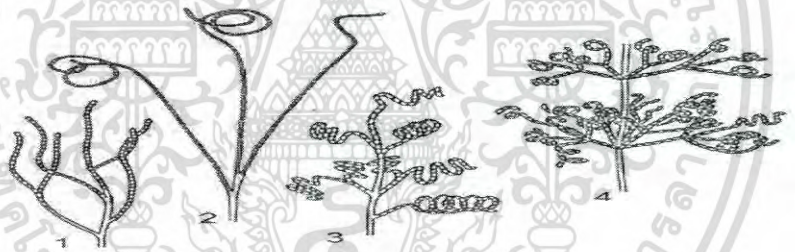
1) Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ

2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1–3 ชั้น

3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น

4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย และแตกแขนงกันแน่น

ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiopsis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง งอ หรือซิกแซก



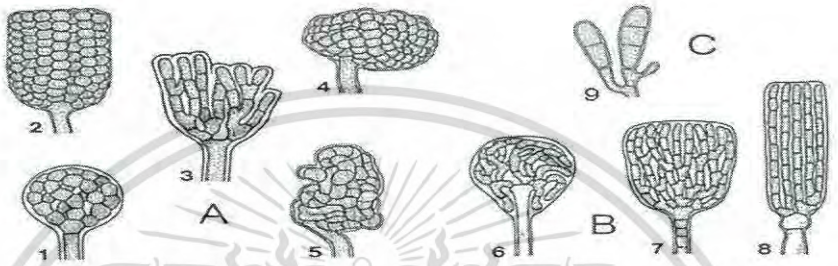
รูปที่ 2.8 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* แบบ Rectiflexbiles (1) แบบ Retinaculiaperti (2) แบบ Spira (3) และแบบ Verticillati (4)
ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

3. การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ ซึ่งการสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมายสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

3.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 15 ไมโคเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม (รูปที่ 2.9) สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Atinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจานวนสปอร์แบบ Oliosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ

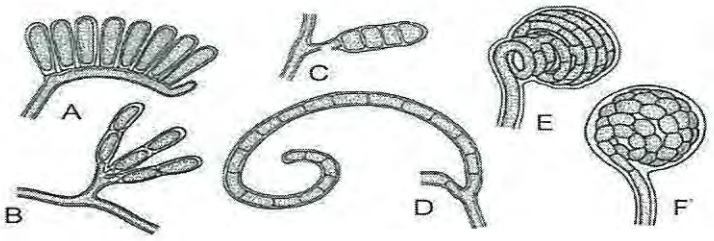


รูปที่ 2.9 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*) ทรงกลม(1) 2. ทรงกระบอก(2) เป็นพู(3) กึ่งทรงกลม(4) และไม่เป็นรูปทรง(5), B: สกุล *Pilimelia* ทรงรี(6) รูปทรงระฆัง(7) และ ทรงกระบอก(8), C: สกุล *Dactylosporangium* รูปทรงกระบอก(9)
ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

3.2) กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ (รูปที่ 2.10) ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จานวนมากภายในสปอร์อับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบบยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จานวนมหาศาลต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกั้นเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ในภายในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ สกุล *Spirllospora* มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่งและโค้งงอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.10 รูปทรงของอับสปอร์

A:สกุล *Planomospora* : monosporous, รูปกระบอง

B: สกุล *Planobispora*:disporous ทรงกระบอก

C: สกุล *Planotatraspora* :tetrasporous, ทรงกระบอก

D: สกุล *Planopolyspora* : polysporous, รูปทรงคล้ายท่อ

E: สกุล *Spirllspora* : polysporous, ทรงกลม

F: สกุล *Streptosporangium* : polysporous, ทรงกลม

ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

2.7.4 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย

ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่นๆได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยสีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990) เอนไซม์ที่แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น เอนไซม์ amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายจีนัสที่สามารถผลิต amylase ได้ ได้แก่ *Micromonospora, Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 1996) เอนไซม์ amylase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือการผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ chitinase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของราหรือเป็นองค์ประกอบของexoskeleton ของพวก arthropod จีนัสที่สามารถผลิต chitinase ได้ ได้แก่ *Streptomyces* (Dahiya, 2006) เอนไซม์ chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149248

ในด้านต่างๆ ได้เช่น นำมาทำ protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ การนำมาเป็น สารควบคุมทางชีวภาพเช่นใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และ การนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม

2.8 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.

2.8.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ Streptomycetacee เป็นสกุลที่มีจำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุยหมัก น้ำ ละอองฝุน อากาศเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสรางเสนใยอาหาร (substrate mycelium) ฝงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสรางเสนใยอากาศ (aerial mycelium) ลักษณะ เสนใยไมมีผนังกั้น เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เสนใยอากาศจะสรางสายสปอรที่ไมเคลื่อนที่ ซึ่งมีรูปแบบตาง ๆ ไดแกแบบเสนตรง (rectiflexibile) แบบลูป (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว(spiral) ลักษณะผิวสปอรมี 5 แบบ คือผิวเรียบ (smooth) ผิวเปนหนาม (spiny) ผิวเปนขน (hairy) ผิวเปนปุมปม (warty) และผิวยน (rugose) (Tresner, Davies and Backus, 1961 ; Dietz and Methews, 1971) ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเสนใยอากาศจะพัฒนา เปนสปอรทำใหผิวโคโลนีมีลักษณะคลายแปง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสีไดแก ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และมวง ซึ่งเปนสีของสปอรที่อยูดานบน สวนดานลางโคโลนีมีเสนใยอาหารเปนสีฟ้าตาลสวนใหญแตอาจพบสีอื่น เชนเดียวกับสีสปอร*Streptomyces* spp. สรางรงควัตถุหลายชนิด นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (Trans-1, 10-dimethyl decalol) มีกลิ่นคลายกลิ่นดิน(earth odor) *Streptomyces* spp. ใชออกซิเจนในการเจริญเติบโตเปนพวก chemo-organotrophic เมตาบอลิซึมเปนแบบ oxidative สามารถรีดิวซไนเตรทใหเปนไนไตรท ย อยอะดีนีน (adenime) เอสคูลิน(esculin) เคซีน (casein) เจลาติน(gelatin) ไฮโปแซนธีน (hypoxanthine) แปงและไทโรซีน (Ltyrosine) เจริญไดดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH 6.5-8.0 สวนใหญเปนพวก mesophile มีบางชนิดที่เปนพวก psychrophile และ thermophile เปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ลมีสวนประกอบหลักเปน L-diaminopimelic (LL-DAP) และไกลซีน (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ใชแหลงคารบอนและไนโตรเจนเปนแหลงพลังงาน เชน กลูโคส กลีเซอรอลและเปบโตน เปนตน ทนเค็มไดดีที่ 3 เปอรเซ็นต (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด บางชนิดทนไดถึง 13 เปอรเซ็นตสำหรับการสรางสารปฏิชีวนะStreptomyces spp. จำเปนตองใชแรธาตุบางชนิดไดแกโซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และฟอสเฟตเปนตน (Williams, Goodfellow and Alderson, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 ความสำคัญของเชื้อ *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. สามารถสรางสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไดหลายชนิดไดแกสารตอตานแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เชน ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสรางเปนวงเบตาแลคแทม (β-lactamring) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสรางเปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ลแบคทีเรีย โอลีนโดมัยซิน(oleandomycin) เปนสารพวกแมคโครไลด (macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, Rodriguez, Vilches, Mendez and Salas, 1994) ซึ่งจะจับกับไรโบโซมและยับยั้งการสังเคราะหโปรตีนสารตอตานเชื้อรา (anti-fungal agent) เชน แคนดิซิดิน (candicidin) เปนสารพวกโพลีอีนแมคโครไลด (polyene macrolide) ผลิตโดย *S. griseus* (Lechevalier, Acker, Corke, Haenseler and Waksman, 1953) มีฤทธิ์ตอผนังเซลล์ลของเชื้อรา nystatin มีโครงสรางเปน polyene มีสมบัติฆาเชื้อราไดหลายชนิด polyoxin มีโครงสรางเปน nucleoside มีผลตอการสรางผนังเซลล์ลเชื้อรา anthracycline นอกจากเปนสารตอตานเชื้อรายังเปนสารตอตานมะเร็งดวยโดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม topoisomerase II ในเชื้อรา ทำใหไมสามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได

นอกจากสารปฏิชีวนะแลว *Streptomyces* spp. ยังสรางสารตอตานมะเร็ง (anti-tumour agent)เชน บลีโอมัยซิน (bleomycin) เปนสารพวกไกลโคเปบไทด (glycopeptide) ผลิตโดย *S. verticillus* (Umezawa, Maeda, Takeuchi and Okami, 1966) มีผลทำใหสายดีเอ็นเอขาด limocrocin ยับยั้งเอนไซม reverse transcriptase ของไวรัสที่เปนสาเหตุของโรค สารปฏิชีวนะที่สรางโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรียหลายชนิด

Streptomyces spp. สามารถสรางสารที่ออกฤทธิ์เปนสารฆาแมลง (insecticidal agent) ได แก นิกโกมัยซิน (nikkomycin) เปนสารพวกนิวคลีโอไซด (nucleoside) ผลิตโดย *S. tendae* (Muller, Further, Zahner and Rast, 1981) มีผลตอการสังเคราะหไคตินและสารในกลุม macrolide เชน avermectin ซึ่งมีผลยับยั้งการลอกคราบของแมลงและยังพบสารฆาวัชพืช (herbicidal agent) เชน ไบอะลาฟอส (bialaphos) เปนสารพวกเปบไทดผลิตโดย *S. hygroscopicus* มีผลตอเอนไซมกลูตามีนซินธีเทส (glutamine synthetase) (Tachibana and Kaneko, 1986)

นอกจากนี้มีการนำ *Streptomyces* spp. ไปใชในการผลิตเอนไซมตาง ๆ ซึ่งมีความสำคัญทาง ดานอุตสาหกรรม และทางการแพทยเพราะมีความจำเพาะกับสับสเตรทและความคงตัวสูงกวาเอนไซมจากแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่น ๆ เชน เอนไซม glucose isomerase ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเปนน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งใหความหวานมากกวาน้ำตาลทรายหลายเทา (Crawford, Barder, Pometto and Crawford, 1982 ; McCarthy, 1987 ; Pasti-Grigsby, Paszczynski, Goszczynski, Crawford and Crawford, 1992) เอนไซมอื่นที่มีความสำคัญทางการคา เชน chitinase, cellulase, amylase, protease (Taguchi., Kojima, Terabe,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumazawa, Suzuki, Miura And Momose, 1997) xylanases (Wateewuthajam and Pinphanichakarn, 2000) และ lipases (Vujaklijal, 2003)

2.8.3 เชื้อ *Streptomyces* spp. กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

มีการศึกษาการใช้ *Streptomyces* spp. เพื่อควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่กอโรคในมะเขือเทศ พบวาเมื่อนำเมล็ดของมะเขือเทศเคลือบด้วยสปอรของสเตรปโตมัยสีทกอนนำไปปลูก สามารถควบคุมเชื้อกอโรคไดดีที่สุดและจากการทดลองในสภาพห้องทดลอง น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* หรือ *S. canescens* เขมขน 80 เปอรเซ็นตสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici, Verticillium alboatrum* และ *A. solani* (El-Abyad, El-Abyad, El-Shanshoury and ElSabbagh, 1993) สารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* spp. สรางสวนใหญจะเปนสารตอตานแบคทีเรีย (Anti–bacterial agent) เชน โอลีนโดมัยซิน (Oleandomycin) เปนสารพวกแมคโครไลด (Macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, Rodriguez, Vilches, Mendez and Salas,1994) ซึ่งจะไปจับกับไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะหโปรตีน สาร clavams ผลิตโดย *S. clavuligerus* (Muller, Toome, Pruess, Blount and Weigele, 1983) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซมเบตาแลคแทมเมส (β-lactamase) ที่ผลิตโดย Staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด สเตรปโตมัยซินผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และนีโอมัยซิน (neomycin) ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman, Horodniceanu, Gritaenco, Antohi and Surdeanu, 1964) ออกฤทธิ์ตานแบคทีเรียแกรมลบชนิด แทงและกลมบาง ชนิดรวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางชนิดและยังมีผลตอ *Mycobacterium tuberculosis* ดวย นอกจากนี้ Blasticidin S ผลิตโดย *S. griseochromogenes* (Takeuchi, Hirayama, Ueda, Sakai and Yonehara, 1958) ตอตานเชื้อราและแบคทีเรียกอโรคพืชบางชนิดโดยยับยั้งการพัฒนาเสนใย การสังเคราะหโปรตีน การงอกของสปอรและการสรางสปอรของ *Pyricularia oryzae* โดยออกฤทธิ์เหมือน organomercuric fungicide แตมีความเปนพิษนอยกวาสาร Kasugamycin ผลิตโดย *S. kasuagensis* และ *S. kasugaspinus* ออกฤทธิ์ตอตานยีสตและเชื้อรารวมทั้ง *P. oryzae* และแบคทีเรียบางชนิด เชน Pseudomonas โดยจะยับยั้งการพัฒนาเสนใยของ *P. oryzae* ในขาว ยับยั้งการสังเคราะหโปรตีน แตไมปรากฏวายับยั้งการงอกของสปอร (Sato, 1983) Polyoxin ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* จะไปยับยั้งการสังเคราะหไคตินซึ่งเปนสวนประกอบของผนังเซลล์ลของเชื้อราและทำใหเซลล์ลเกิดการบวม (Isono, Nagatsu, Kobinata, Sasaki and Suzuki, 1965) นอกจากนี้ Mahadevan และ Crawford (1997) พบวา *S. lydicus* WYEC108 สามารถสราง chitinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการตอ ตานเชื้อราไดหลายชนิดโดยสารดังกลาวจะเขาไปยอยสลายผนังเซลล์ลของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ขณะที่ Ranjeet et al., (2002) พบวา *S. lydicus* WYEC108 นอกจากสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราได้ แลวยังสามารถเพิ่มขยายจำนวนบริเวณรอบรากตนถั่ว (*Pisum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sativum) ได้ดีและได้มีการนำมาผลิตในชื่อการค้า Actinovate (Brain and Deborah, 2002) เช่นเดียวกับ *S. griseoviridis* ที่ได้นำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เช่น *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp. และ *Botrytis* sp. ซึ่งได้นำมาผลิตในชื่อการค้า Mycostop นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเจริญได้บริเวณรอบรากพืช ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มมากขึ้น

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aseri และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษา การเข้าอาศัยของไมคอร์ไรซาและแอคติโนมัยสีทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคใบแห้งในทับทิม เนื่องจากประเทศอินเดียเป็นประเทศหนึ่งที่มีการผลิตทับทิมมากที่สุด มีการจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคใบแห้งในทับทิมคือ *Xanthomonas axonopodis* ส่งผลให้ผลทับทิมเกิดความเสียหาย ทำให้ราคาผลิตภัณฑ์หรือทับทิมราคาต่ำลง จึงได้มีการพยายามทำการควบคุมโรคโดยการฉีดพ่นสารเคมี แต่วิธีนี้ไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก และยังมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมโรคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการนำสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทมาทำการฉีดพ่นลงบนใบทับทิมที่เป็นโรค และได้ค้นพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป รอยแผลบนใบทับทิมลดลง นั่นคือ สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคแห้งในทับทิม

Zarandi และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการนำเอาสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวมาผสมกับเชื้อ *Streptomyces sindeneusis* แล้วนำไปฉีดพ่นบนต้นกล้าของข้าวและได้ค้นพบว่าต้นกล้าเกิดการไหม้น้อยลง

Qili Li และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว และได้ค้นพบว่ากลุ่มแอคติโนมัยสีทมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคในข้าว

Burr และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษา การใช้วิธีควบคุมโรคด้วยชีววิธี (Biocontrol) แทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงเกิดการดื้อยาตามมา และได้ค้นพบว่า สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น (Secondary Metabolite) สามารถยับยั้งรวมไปถึงการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคในระยะยาวได้ และลดต้นทุนการผลิต เป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sawai Boukaew และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษา การนำเอา culture filtrate (สารสกัดที่ได้จากแอคติโนมัยสีท) มาทำการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคกาบใบแห้งในข้าว และได้ค้นพบว่าผลของการยับยั้งโรคกาบใบแห้ง สามารถยับยั้งได้มากกว่า 65 % อีกทั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณมัดเส้นใยและจำนวนเมล็ดข้าวอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 บริษัท Denver ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HM-35V บริษัท Hung Ta Instrument ประเทศไทย
4. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipette)
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX31 บริษัท Olympus
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น UC4-1320 ประเทศไทย
8. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น LF BH-120 บริษัท Unitech Science ประเทศไทย
9. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น SG-120 Steris ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น ULE-500 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
11. ตู้แช่แข็ง (freezer) รุ่น DLT-21V-85V12 บริษัท Harris ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) รุ่น Modulyo 98 บริษัท Edwards
13. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Kuhner ISF-1-X บริษัท Kuhner ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Sorvall RC5C plus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

3.2.1 เตรียมเชื้อต้านทานโรค

ทำการเลี้ยงแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลต ได้แก่ RRS-8, RRL-8 และ RRB-2 โดย RR ย่อมาจาก Rhizosphere soil of rice โดยแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลท ถูกแยกมาจากดินบริเวณรากพืช เพื่อใช้ทดสอบการต้านทานโรค (Disease suppression test) โดยนำแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร International Streptomyces Project (ISP) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อที่จะใช้ ในการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของเชื้อ

3.2.2 เตรียมเชื้อก่อโรค

ทำการเลี้ยงเชื้อก่อโรค *Pyricularia oryzae* เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต้านทานโรคในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค โดยนำมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วใช้มีดที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วในการตัดชิ้นส่วนวุ้นของเชื้อก่อโรค เพื่อนำมาย้ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA ใหม่

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลต ได้แก่ RRS-8, RRL-8 และ RRB-2 ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ประมาณ 3-4 ลูป มาใส่ลงในอาหารเหลว Glycerol Peptone Molasses (GPM broth) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร และทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.4 การศึกษาอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของเชื้อ

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต เพื่อทำการพิจารณาจากลักษณะสปอร์และเส้นใยที่เจริญบนอาหาร ที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) (Shirling และ Gotttlieb. 1966) โดยสูตรอาหาร Yeast extract-Malt extract agar (ISP2) นอกจากนี้ดูลักษณะการผลิต melanin pigment หรือรงควัตถุ (สี) ที่แพร่ลงสู่อาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเชื้อจะถูกนำมาวิเคราะห์ศึกษาหลังจากผ่านไป 14 วัน ตรวจผลโดยการดูการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-IBCC color system) และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

3.4.1.1.1 การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล เอการ์ (basal agar medium, ISP9)(ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gotttlieb. 1966) ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผล โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบกับชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

(1) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)

(2) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวกให้บันทึกผลเป็นปานกลาง (±)

(3) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะลาบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟีโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-เมลิบไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-มอลโตส (D-maltose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล(glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.4.1.1.2 ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (Inorganic salt-starch agar,ISP4) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gotttlieb. 1966) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำสารละลายไอโอดีนลาดลงบนผิวอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.4.1.1.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

สารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวบูลอิลลอน เจลาติน (Bouillion gelatin broth) (ภาคผนวก ก) (Arai. 1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจผลโดยการนำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

3.4.1.1.4 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

สารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวเปปโตน โพแทสเซียมไนเตรต (peptone KNO_3) (ภาคผนวก ก) (Arai. 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ปริมาตร 3 หยด (ภาคผนวก ข) หากมีการเปลี่ยนรูป ไนเตรตเป็นไนไตรต์ และสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

3.4.1.1.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

สารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวสกิมมิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) (Gordon และคณะ. 1974) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.4.1.1.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลเอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 1.5 2 3 4 5 6 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.4.1.1.7 ความสามารถในการเจริญของเชื้ออุณหภูมิต่าง ๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลเอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.4.1.1.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลเอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.4.1.1.9 การสร้างกรดคาร์โบไฮเดรต (acid production from carbohydrates)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล อินออร์แกนิก ไนโตรเจน (basal inorganic nitrogen medium) (ภาคผนวก ก) (Gordon และคณะ. 1974) ที่เติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบโดยหากเชื้อสามารถสร้างกรดได้อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทดสอบ คือ คือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะลาบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟีโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส(D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-เมลิบไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-มอลโตส (D-maltose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล (glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotype)

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (Glucose-yeast extract broth) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยน้ำหนักที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) 1 ครั้ง เติม TE buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 มโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไวจนดีเอ็นเอแห้ง แล้วนำไปละลายในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร (Yukphan.2006)

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส(polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอ 16S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตรดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงหลอดขนาดเล็กผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคิล (thermal cycle) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ตั้งไว้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ดังตารางที่ 3.2 (Yukphan และคณะ. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 20F*	10 pmol/µl	4.0 µl
Primer : 1425R*	10 pmol/µl	4.0 µl
dNTP	2.0 mM	8.0 µl
10X Taq buffer	10X	10.0 µl
Mgcl2	25.0 mM	8.0 µl
Taq DNA Polymerase	5 Unit/µl	0.5
Milli Q water	-	63.5 µl
Template DNA	100-200 ng/µl	2.0 µl
รวม		100

*primer : 20F (5'GAG TTT GAT CCT GCT CAG'3)

*primer : 1425R (5'GTT ACC TTG TTA CGA CTT'3)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Denaturation step
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซลเซียส	1 นาที		Annealing step
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		Extension step
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	
รวมเวลาทั้งสิ้น 2 ชั่วโมง 30 นาที			

3.4.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ให้มีความบริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit ของบริษัท Geneaid ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิลก์ (Microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PB solution ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้เทใส่ลงในคอลัมน์ QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวส่วนที่ตกลงคอลัมน์ทิ้งเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายลงคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิลก์ (Microcentrifuge) อัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ เติม EB buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงตงกลางคอลัมน์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene (DNA sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 16S rRNA gene โดยใช้ bigdye termination cycle sequencing ready reation kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.4 (Yukphan และคณะ. 2005)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Big dye terminator	-	2.0 µl
5X sequencing buffer	5 เท่า	1.5 µl
Sequencing primer*	1.6 (pmol/µl)	1.0 µl
น้ำปราศจากไอออน	-	3.5 µl
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	-	2.0 µl
รวม		10.0 µl

*primer 27F : AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T

520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG

1492R: TAC CAG GGT ATC TAA TCC

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม Big_dye

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
96 องศาเซลเซียส	3 วินาที	1
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	25
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 วินาที	1

3.4.2.4 การวิเคราะห์วิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับสายวิวัฒนาการนิวคลีโอไทด์ของเชื้อคัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ alignment software ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W Program package จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ(phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรม MEGA V.7 (www.megasoftware.net) (Yukphan และคณะ. 2005)

3.5 การเตรียมสารสกัด (solid extract)

โดยการเตรียมสารสกัดในชั้นน้ำ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Glycerol Peptone Molasses (GPM broth) เป็นเวลา 14 วัน มาทำการกรองเซลล์ออกผ่านสำลี นำส่วนของเหลวที่กรองได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer ผลผลิตที่ได้จะเป็นสารสกัดหยาบผงแห้งสีน้ำตาล

3.6 การยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีท ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (dual culture)

โดยการทดสอบฤทธิ์ของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต กับเชื้อราที่เป็นสาเหตุเกิดโรคไหม้ในข้าว ทำได้โดยตัดชิ้นส่วน Mycelium plug ของเชื้อ *P. oryzae* ที่มีเส้นใยปกคลุมบนแผ่นวุ้น ตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร โดย cork borer แล้วนำมาวางบนอาหาร PDA เพลทใหม่บริเวณตรงกลางเพลท จากนั้นนำแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ RRS-8 RRL-8 และ RRB-2 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร International Streptomyces Project (ISP) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญ มาทำการ streak ห่างจากชิ้น Mycelium plug 35 มิลลิเมตร ตรวจสอบผลเทียบกับชุดควบคุมที่มีแต่ Mycelium plug จากนั้นนำมาบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชโดยการวัดระยะห่าง (มิลลิเมตร) จากเชื้อต้านทานโรคจนถึงระยะที่เชื้อราก่อโรคที่สามารถเจริญได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยสามารถคิดได้จากสูตร

$$\%\text{การยับยั้ง} = [(R_1-R_2)/R_1] \times 100$$

โดยที่ R_1 = รัศมีของเชื้อราก่อโรค (ตัวควบคุม)

R_2 = รัศมีการเพาะเลี้ยงร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ด้วยวิธี Agar diffusion ที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

3.7.1 การทดสอบโดยใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ

โดยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Glycerol Peptone Mollasses (GPM broth), Yeast extract-Malt extract agar (ISP2) และ Potato Dextrose Broth (PDB) ทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จะทดสอบที่ความเข้มข้นที่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ทำการเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ปริมาตร 50, 49.75, 49.5, 48.5, 47.5, 46.5, 45, 42.5 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องออโตเครบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตทั้ง 3 อาหาร เป็นเวลา 14 วัน ทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm นำมาผสมตามอัตราส่วนที่ปริมาตร 0, 0.25, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 5, 7.5 และ10 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเทอาหารลงบนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหาร PDA แห้ง นำชิ้นส่วนวุ้นหรือ Mycelium plug ของเชื้อ *P. oryzae* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ในแต่ละเพลท ในส่วนของชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหาร PDA ที่ปราศจากน้ำเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงทำการวัดรัศมีของเส้นใยที่เจริญขึ้น เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับรัศมีของเส้นใยของตัวควบคุม

3.7.2 การทดสอบโดย ใช้ส่วนของสารสกัด

โดยแต่ละไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Glycerol Peptone Mollasses (GPM broth) จะทดสอบที่ความเข้มข้นที่ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ทำการเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องออโตเครบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลต ที่น้ำหนัก 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm นำมาผสมตามอัตราส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ หลังจากนั้นเทอาหารลงบนจานเพาะเชื้อ ในส่วนของอาหาร PDA ที่ไม่มีการใส่สารสกัดจะถูกใช้เป็นตัวควบคุม และนำชิ้นส่วนวุ้นหรือ Mycelium plug ของเชื้อ *P. oryzae* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางบนอาหาร PDA ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงทำการวัดรัศมีของเส้นใยที่เจริญขึ้น เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับรัศมีของเส้นใยของตัวควบคุม ซึ่งจะคำนวณและแสดงผลที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้จากสูตร

$$\%\text{การยับยั้ง} = 100 - [(r^2/R^2) \times 100]$$

โดยที่ r = รัศมีของเชื้อราก่อโรคบนอาหาร PDA ที่มีน้ำหมักหรือสารสกัด

R = รัศมีของเชื้อราก่อโรค (ตัวควบคุม)

3.8 การควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรคในระดับโรงเรือน

การทดสอบนี้ใช้ต้นกล้าข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 ที่มีอายุ 25-30 วันและเชื้อที่เตรียมในขั้นต้น โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ระยะดังนี้

3.8.1 การป้องกันโรคไหม้ในข้าว (Preventive Test)

เป็นการควบคุมโรคโดยใช้ สารเคมี Tricyclazole 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารสกัดของเชื้อต้านทานโรค รวมกับสารละลาย 0.025% Tween20 โดยฉีดพ่นไปที่ต้นกล้าปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นเชื้อ conidia suspension ของ *P. oryzae* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคไหม้ในข้าว (2.53×10^6 เซลล์ล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. oryzae* ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) เป็นเวลา 14 วัน และในส่วนของชุดควบคุมฉีดพ่นด้วย conidia suspension ของ *P. oryzae* ผสมกับสารละลาย 0.025% Tween20 โดยฉีดพ่นไปที่ต้นกล้า หลังจากผ่านไป 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดผลที่ 3, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 30 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ความรุนแรงของอัตราการเกิดโรค

3.8.2 การยับยั้งโรคไหม้ในข้าว (Curative Test)

จะทำการฉีดพ่นเชื้อ conidia suspension ของ *P. oryzae* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคไหม้ในข้าว (2.53×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงไปในต้นกล้าก่อน หลังจากผ่านไป 12 ชั่วโมง จะควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี Tricyclazole 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารสกัดของเชื้อต้านทานโรค รวมกับสารละลาย 0.025% Tween20 โดยฉีดพ่นไปที่ต้นกล้า 3 มิลลิลิตรต่อต้น และชุดควบคุมฉีดพ่นด้วย conidia suspension ของ *P. oryzae* ผสมกับสารละลาย 0.025% Tween20 โดยฉีดพ่นไปที่ต้นกล้า จากนั้นทำการวัดผลที่ 3, 12, 24 และ48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 30 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ความรุนแรงของอัตราการเกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การวิเคราะห์ความรุนแรงอัตราการเกิดโรค

การประเมินความรุนแรงและอัตราการเกิดโรคโดยจะติดตามผลและให้คะแนน (rate scale) แบ่งเกณฑ์คะแนนได้เป็น ดังนี้

0 : ไม่เกิดบาดแผลริ้วรอยบนใบข้าว

1 : เกิดรอยแผลเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กขนาดเข็ม

2 : เกิดบาดแผลเป็นจุดสีน้ำตาลไหม้ขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม

3 : เกิดบาดแผล เป็นจุดกลมรีขนาด 1-2 มิลลิเมตร

4 : เกิดบาดแผลรอยไหม้รูปไข่ 1-2 เซนติเมตร

5 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ น้อยกว่า 10% ของพื้นที่ใบ

6 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 10-25 % ของพื้นที่ใบ

7 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 26-50 % ของพื้นที่ใบ

8 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 51-75 % ของพื้นที่ใบ

และ 9 : ลักษณะใบไหม้ทั้งใบ

สูตรที่ใช้สำหรับคำนวณ

$$\text{อัตราการเกิดโรค} = \frac{\sum(\text{ระดับของการเกิดโรค} \times \text{จำนวนใบข้าวในระดับที่เกิดโรค})}{\text{จำนวนใบข้าวทั้งหมด} \times 9} \times 100$$

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์คำนวณข้อมูลที่ได้ในเชิงสถิติ ด้วยวิธี ANOVA วิเคราะห์ความแปรปรวน ที่เกิดขึ้นโดย Software โปรแกรม Minitab โดยค่าต่าง ๆ คำนวณโดยใช้วิธีของ Duncan's Range test (DMST) และ $P < 0.05$ ซึ่งบ่งบอกถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 การศึกษาอนุกรมวิธาน (Taxanomy) ของเชื้อ

1. สกุล *Streptomyces*

ประกอบด้วย 3 ไอโซเลต คือ RRS-8 RRL-8 และ RRB-2

เชื้อไอโซเลต RRS-8

ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype)

ไอโซเลต RRS-8 มีลักษณะโคโลนีสีขาว สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงต่อกัน เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1-6 พีเอช 4-12 ช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศา-เซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง ย่อยสลายเจลาติน ย่อยสลายโปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้ สามารถใช้น้ำตาลทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ยกเว้นน้ำตาล Sucrose และสามารถใช้น้ำตาล D-Xylose, D-Mannose, Lactose, D-Glucose, D-Fructose, L-Arabinose และ Glycerol เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในการสร้างกรด

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 ไม่สามารถสร้างสามารถกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ทั้งในสภาวะเขย่าและสภาวะนิ่ง สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ และไม่ย่อยสลายฟอสเฟต

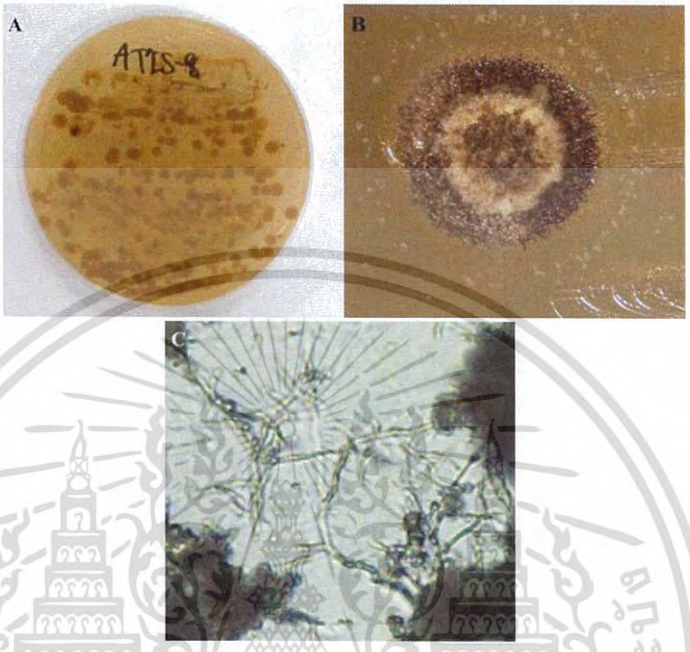
จากการตรวจสอบความสามารถในการเจริญร่วมกัน พบว่า แอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 สามารถเจริญร่วมกันได้กับแอคติโนมัยสีทเกือบทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง

ลักษณะทางจีโนไทป์ (Geniotype)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces malaysiensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความล้ายคลึงของนิววคลีโอไทด์ (%Similarity) เท่ากับ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 52 (รูปที่ 4.2)

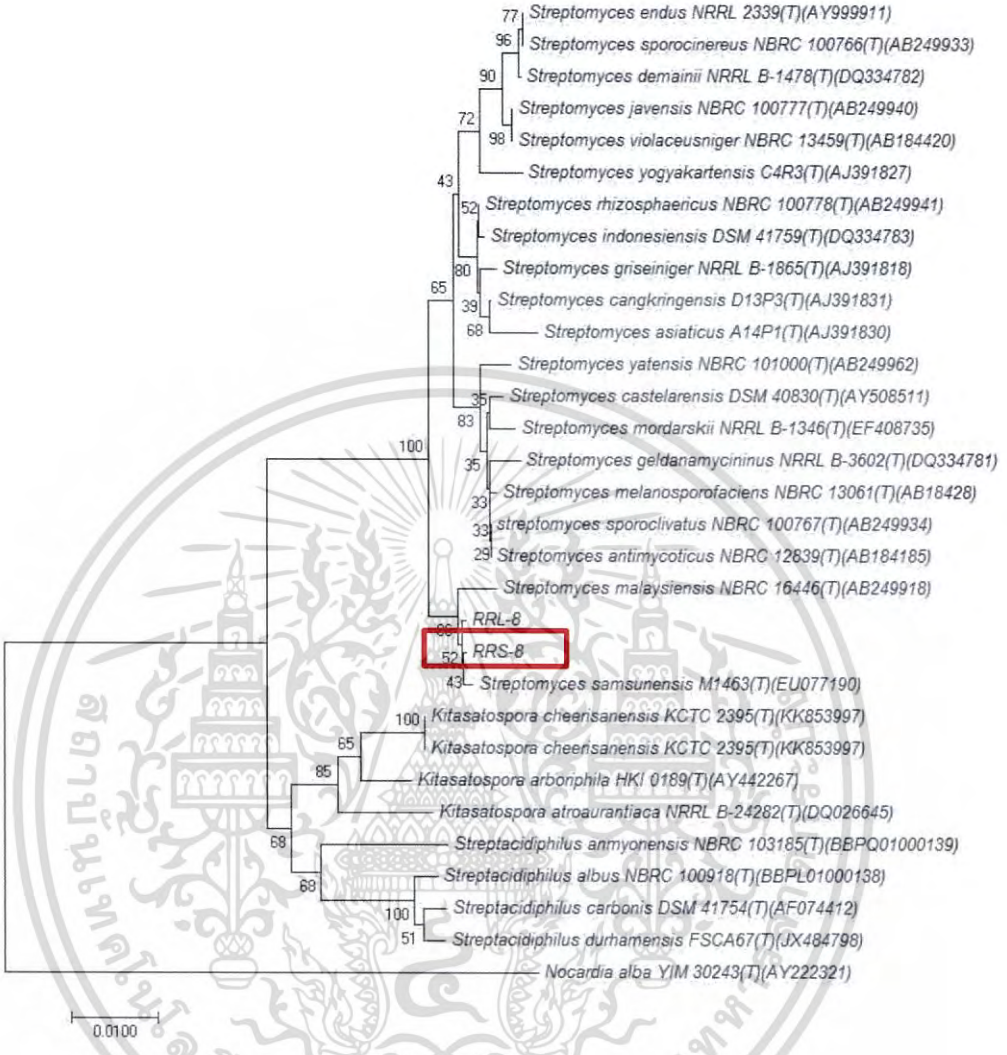
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์สามารถ ยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต RRS-8 นี้จัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RRS-8
(A) และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (C) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRS-8 บน phylogenetic tree

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต RRL-8

ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype)

ไอโซเลต RRL-8 มีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเหลือง สปอร์มีลักษณะกลมต่อกันแบบโค้งงอ เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1-8 พีเอช 4-12 ช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง ย่อยสลายเจลาติน ย่อยสลายโปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้ สามารถใช้น้ำตาลทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ยกเว้นน้ำตาล Sucrose และสามารถใช้น้ำตาลทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในการสร้างกรด จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRL-8 สามารถสร้างกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ได้ในสภาวะเขย่า แต่ไม่สามารถสร้างได้ในสภาวะนิ่ง สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ และไม่ย่อยสลายฟอสเฟต

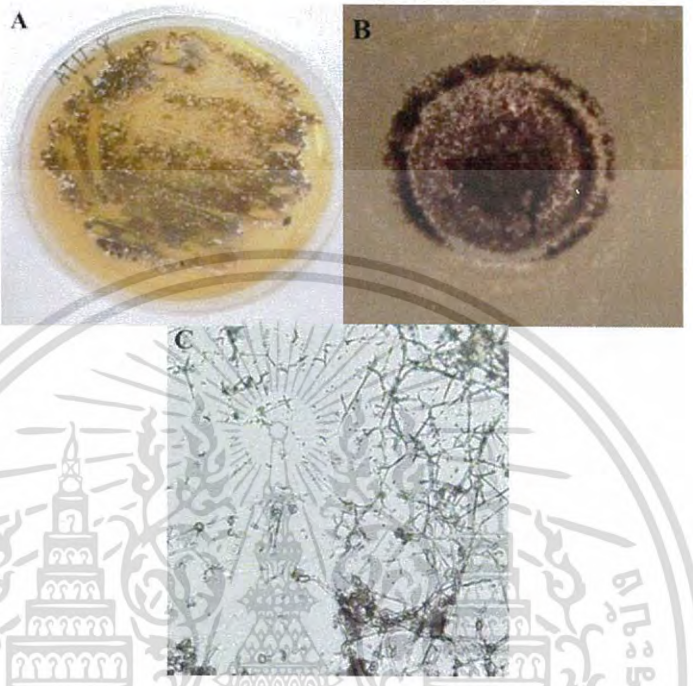
จากการตรวจสอบความสามารถในการเจริญร่วมกัน พบว่า แอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRL-8 สามารถเจริญร่วมกันได้กับแอคติโนมัยสีทเกือบทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง

ลักษณะทางจีโนไทป์ (Geniotype)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRL-8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces malaysiensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%Similarity) เท่ากับ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 86 (รูปที่ 4.4)

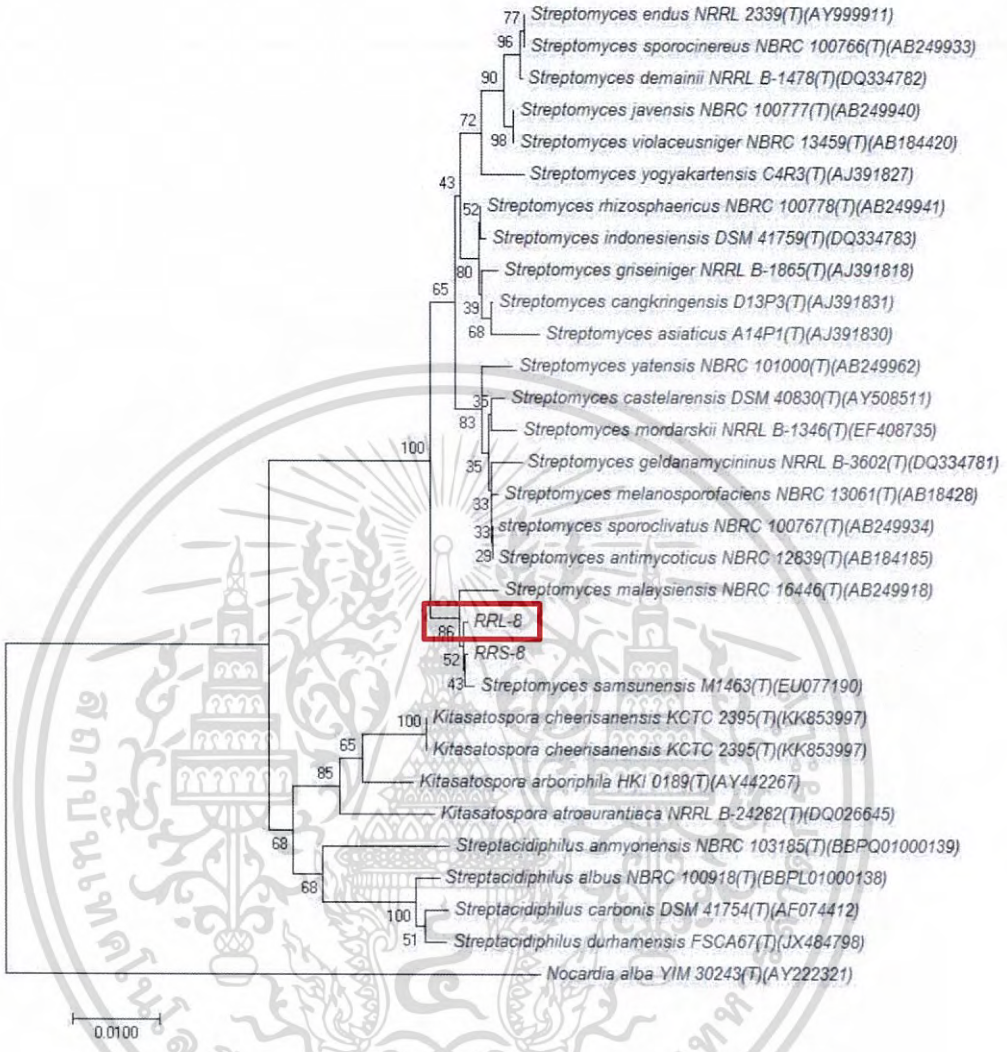
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์สามารถ ยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต RRL-8 นี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RRL-8
(A) และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (C) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRL-8 บน phylogenetic tree

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต RRB-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype)

ไอโซเลต RRB-2 มีลักษณะโคโลนีสีขาว สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงต่อกัน เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1-6 พีเอช 4-12 ช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศา-เซลเซียส

ลักษณะทางจีโนไทป์ (Geniotype)

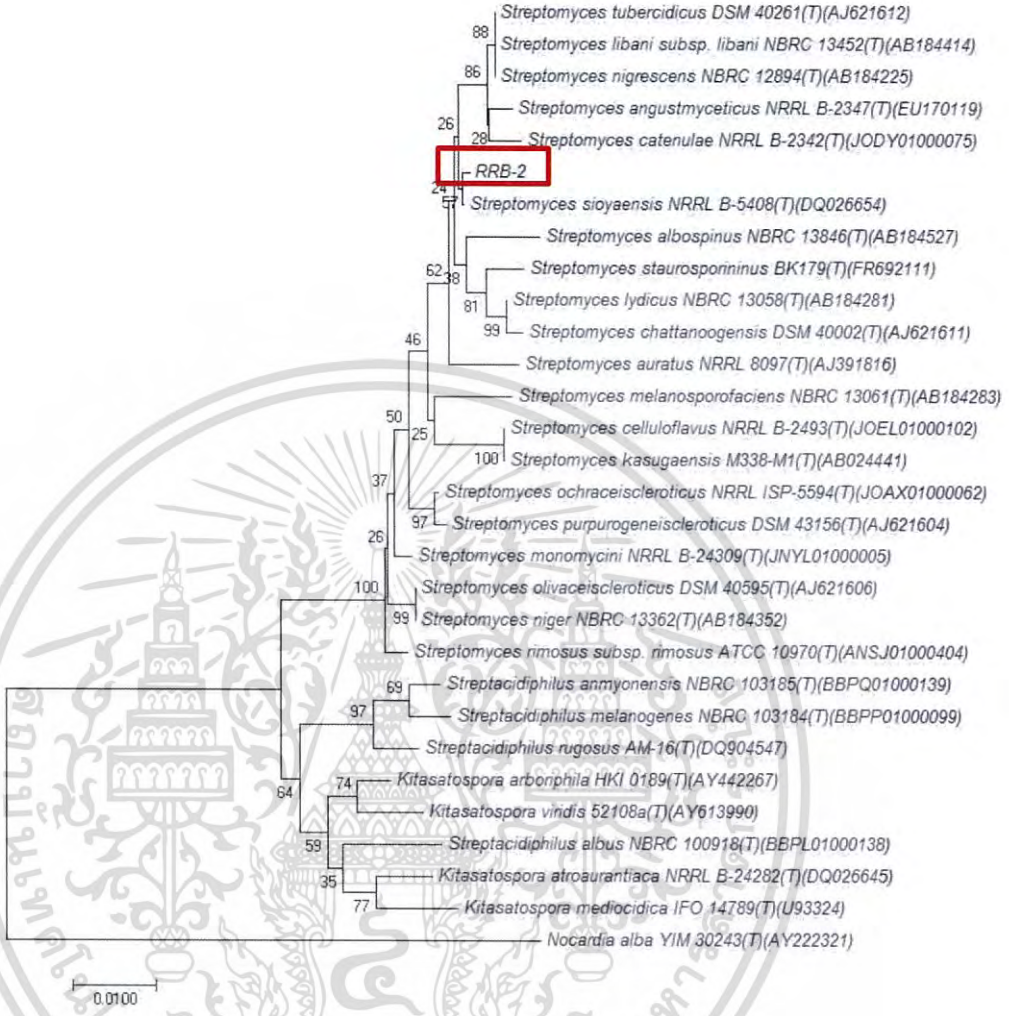
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRB-8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces sioyaensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%Similarity) เท่ากับ 99.62 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 57 (รูปที่ 4.6)

จากลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์สามารถ ยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต RRB-2 นี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*

รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RRB-2

(A) และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (C) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RRB-2 บน phylogenetic tree

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงสีของแอคติโนมัยสีทบนอารหารต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system, 1964)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร								
	Glucose aspragines agar	Czapek's sucrose agar	Nuntrient agar	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7
RRS-8	Yellowish White	Light Bluish Gray	Pale Yellow	Grayish Yellow	Brilliant Greenish Yellow	Light Grayish Yellowish Brown	Grayish Yellow	Yellowish White	Light Yellow
RRL-8	Pale Yellow	Light Olive	Deep Greenish Yellow	Light Olive Gray	Purplish Gray	Moderate Yellow	Grayish Greenish Yellow	Greenish White	Light Greenish Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแอคติโนมัยสีท

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นเกลือ(ร้อยละ)										ความเป็นกรด – ด่าง									อุณหภูมิ (℃)				การย่อยแป้ง	การย่อยเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยโปรตีน
	1	1.5	2	3	4	5	6	7	8	9	4	5	6	7	8	9	10	11	12	25	30	37	40				
RRS-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RRL-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแอคติโนมัยสีท

รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน										
	D-Glucose	D-Fructose	D-Mannitol	Glycerol	D-Raffinose	Lactose	Galactose	L-Arabinose	Sucrose	D-Mannose	
RRS-8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
RRL-8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต									
	Sucrose	D - Xylose	D-Mannitol	Lactose	D – Glucose	D -Fructose	D – Raffinose	L – Arabinose	Glycerol	Galactose
RRS-8	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
RRL-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ความสามารถของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต ในการต่อต้านเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture)

การศึกษาภายในจานเพาะเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน (dual culture) พบว่า เชื้อ RRS-8 มีผลยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อก่อโรค โดยทดสอบบนอาหาร PDA ที่มีเชื้อ *P. oryzae* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 64% ถึง 72%, เชื้อ RRL-8 มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 76% ถึง 84% และเชื้อ RRB-2 มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 89% ถึง 96% (ตารางที่ 4.4)

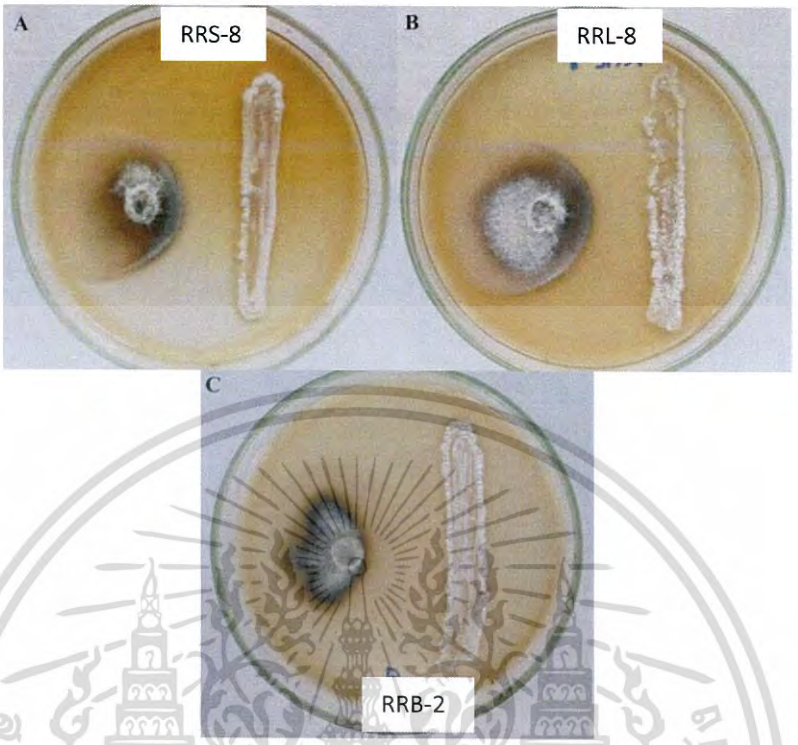
ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต

แอคติโนมัยสีท	%การยับยั้ง
RRS-8	68.8c*
RRL-8	80.8b*
RRB-2	93.8a*

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลทดลองด้วยวิธีการทดลองสองปัจจัย (Two Factorial Experiment) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completily Randomize Design) ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า ไอโซเลต RRB-2 มีค่าเปอร์เซนต์ยับยั้งสูงสุด ร้อยละ 93.8 รองลงมาคือ ไอโซเลต RRL-8 และไอโซเลต RRS-8 ตามลำดับโดยแสดงผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิคเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด บนอาหาร PDA ดังภาพประกอบ (รูปที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

(A) ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อราก่อโรค (*Pyricularia oryzae*)

(B) ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีท ไอโซเลตRRL-8 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อราก่อโรค (*Pyricularia oryzae*)

(C) ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 เพาะเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อราก่อโรค (*Pyricularia oryzae*)

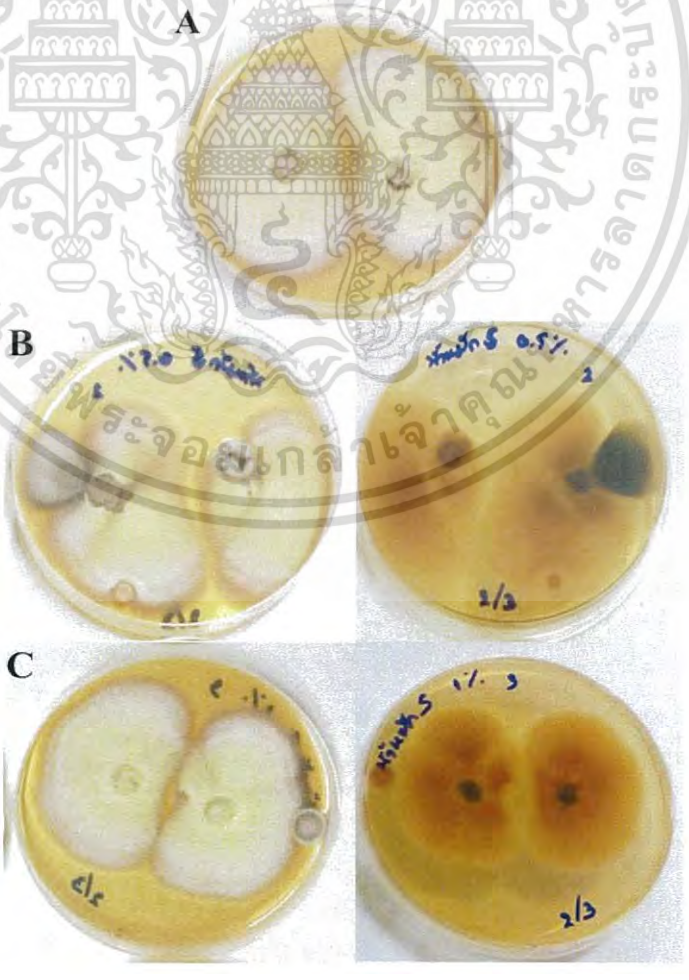
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

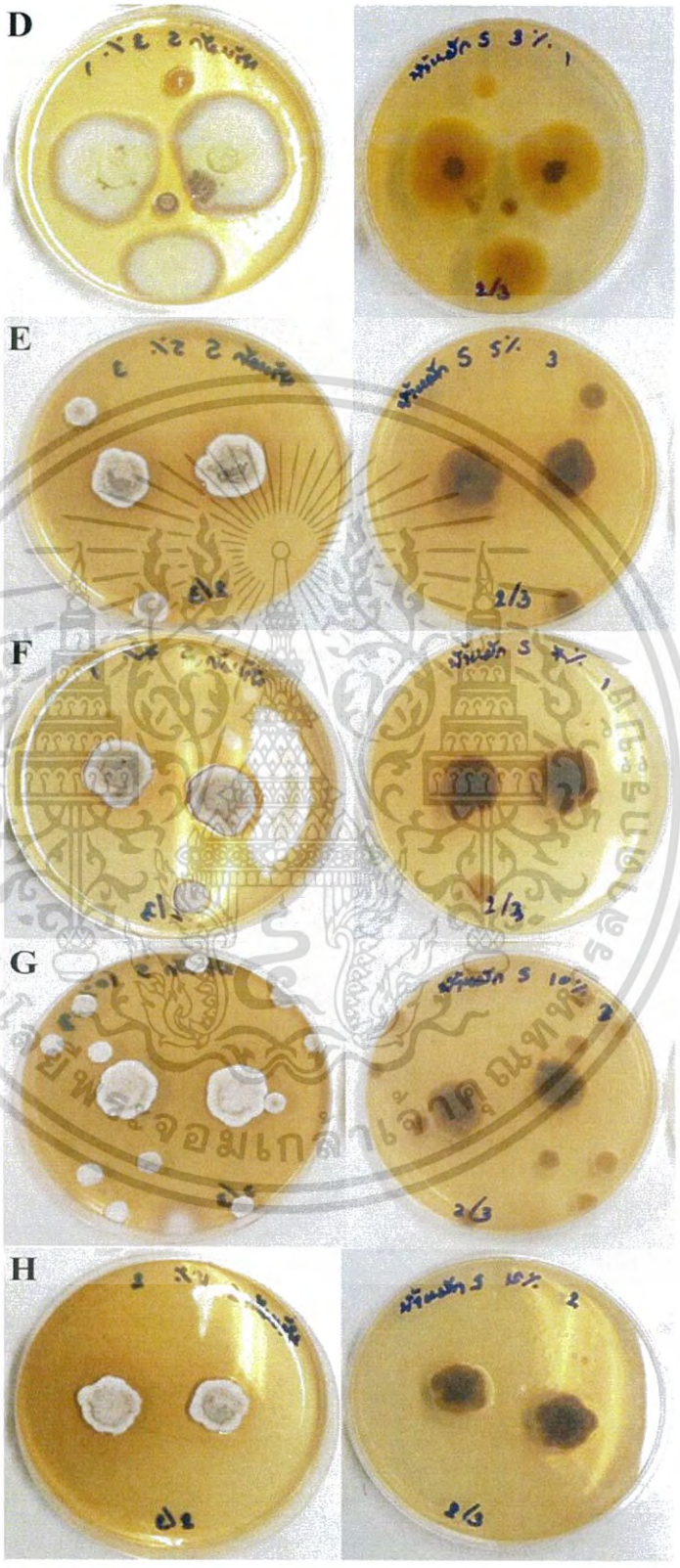
การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

4.1.3.1 การวิเคราะห์การศึกษาภายในจานเพาะเชื้อ โดยใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (crude extract) ผลการทดสอบแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหาร Glycerol Peptone Molasses (GPM broth) พบว่า เชื้อ RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5-5.0% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 40.08-79.5% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 7.0-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 84.6-95.98% (รูปที่ 4.8), เชื้อ RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 42.91-53.56% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 3.0-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 82.17-97.25% (รูปที่ 4.9) และเชื้อ RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5-15.0% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 24.73-78.78% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 84% (รูปที่ 4.10)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 5%

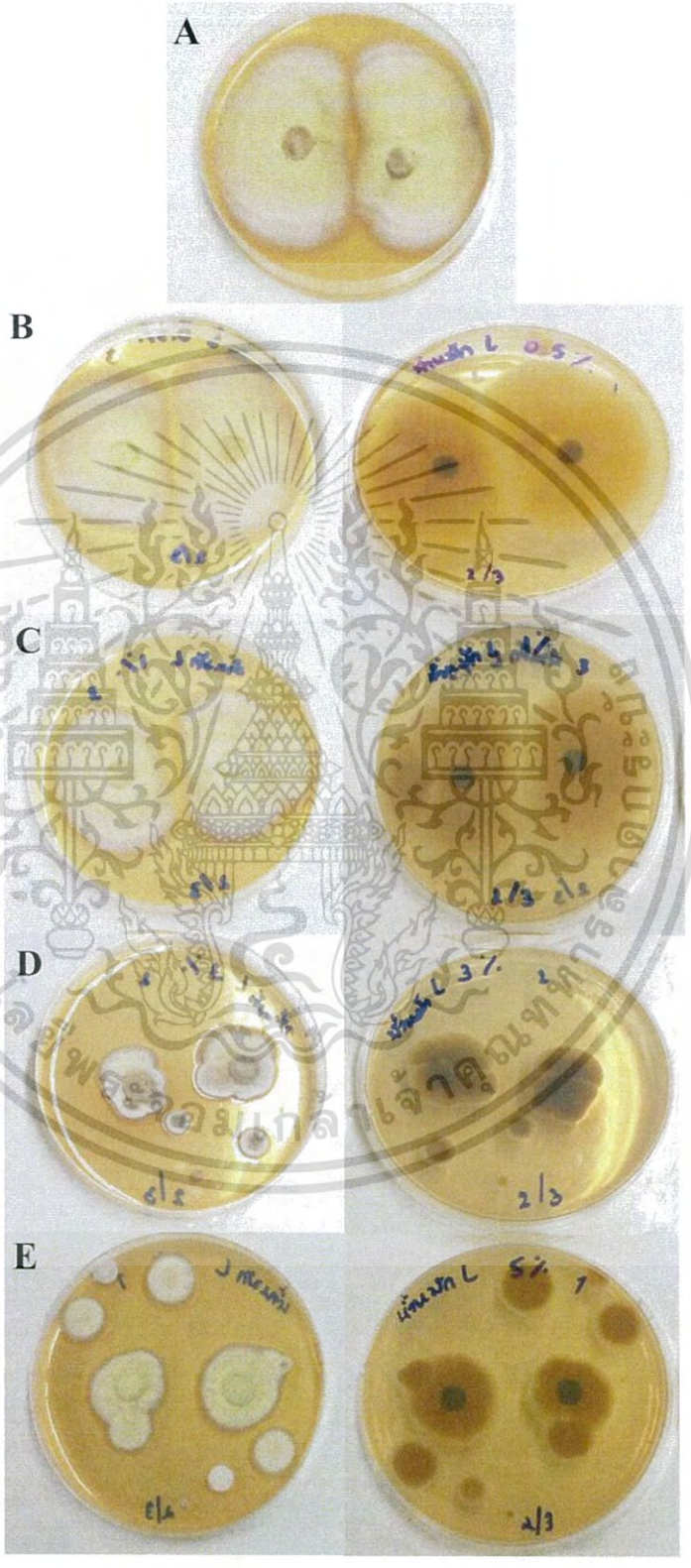
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 10%

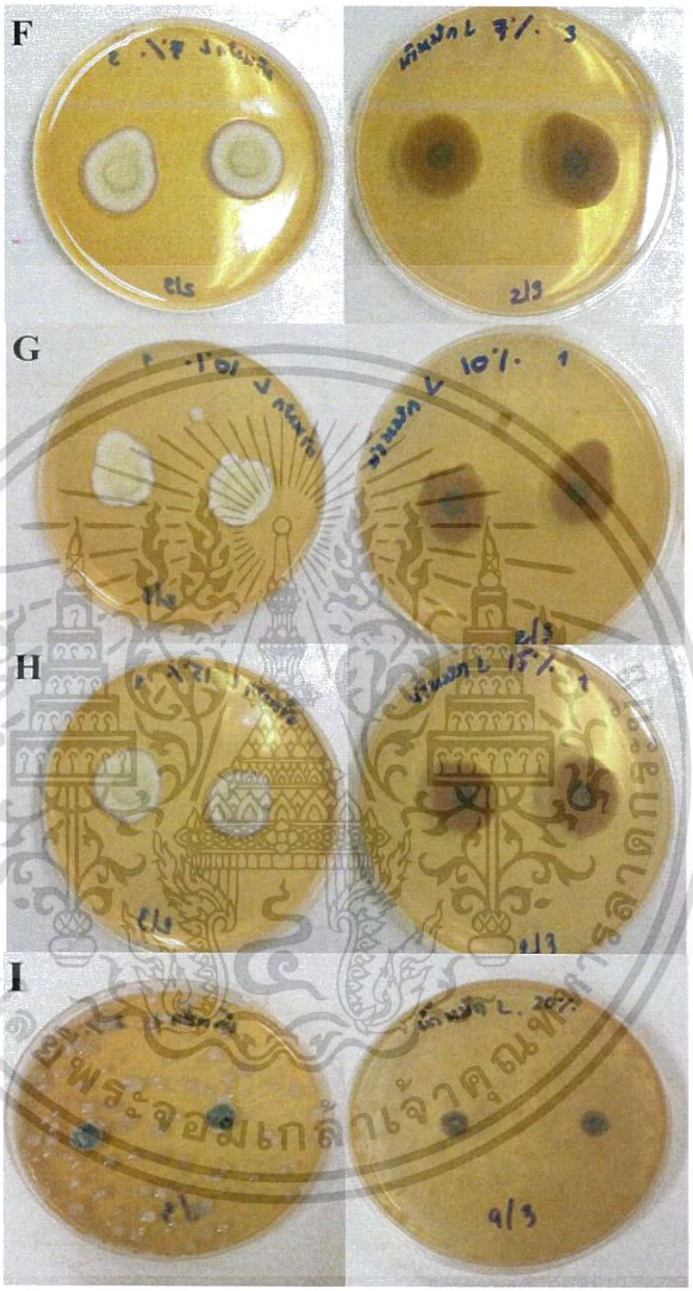
(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 3%

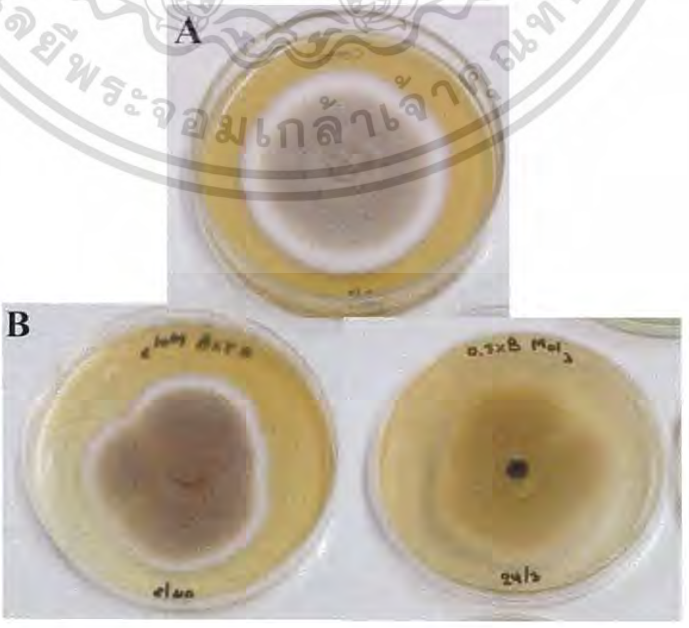
(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 7%

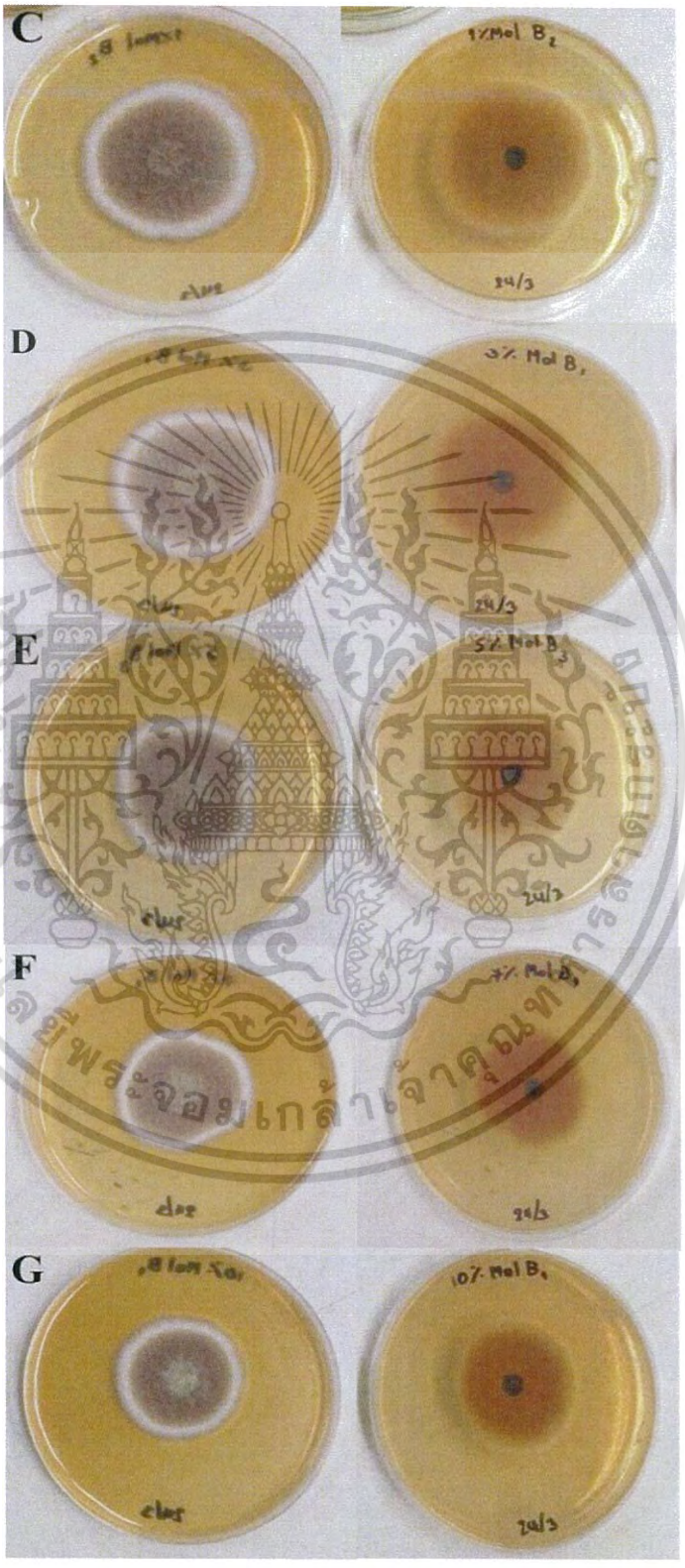
(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 15%

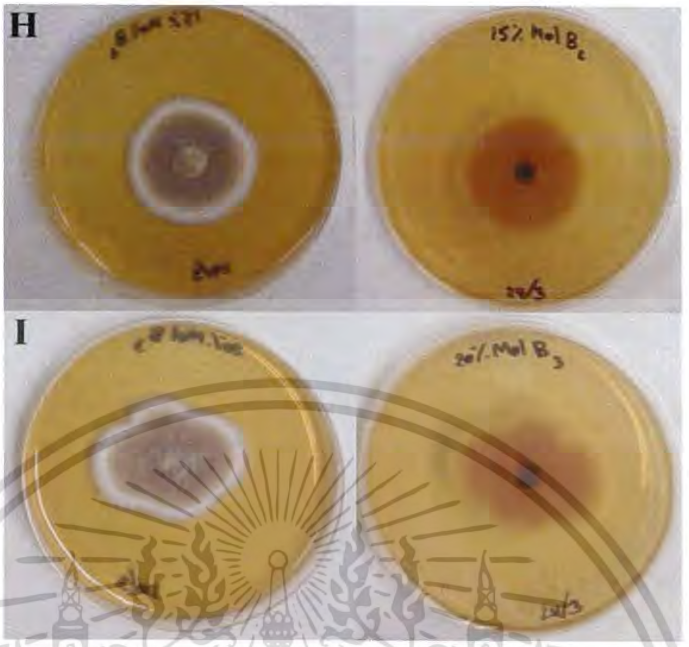
(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 20%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 7%

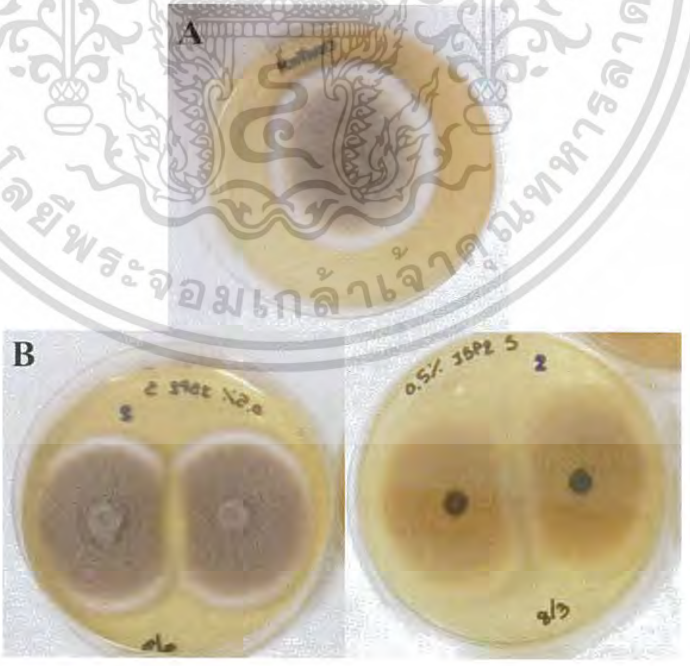
(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

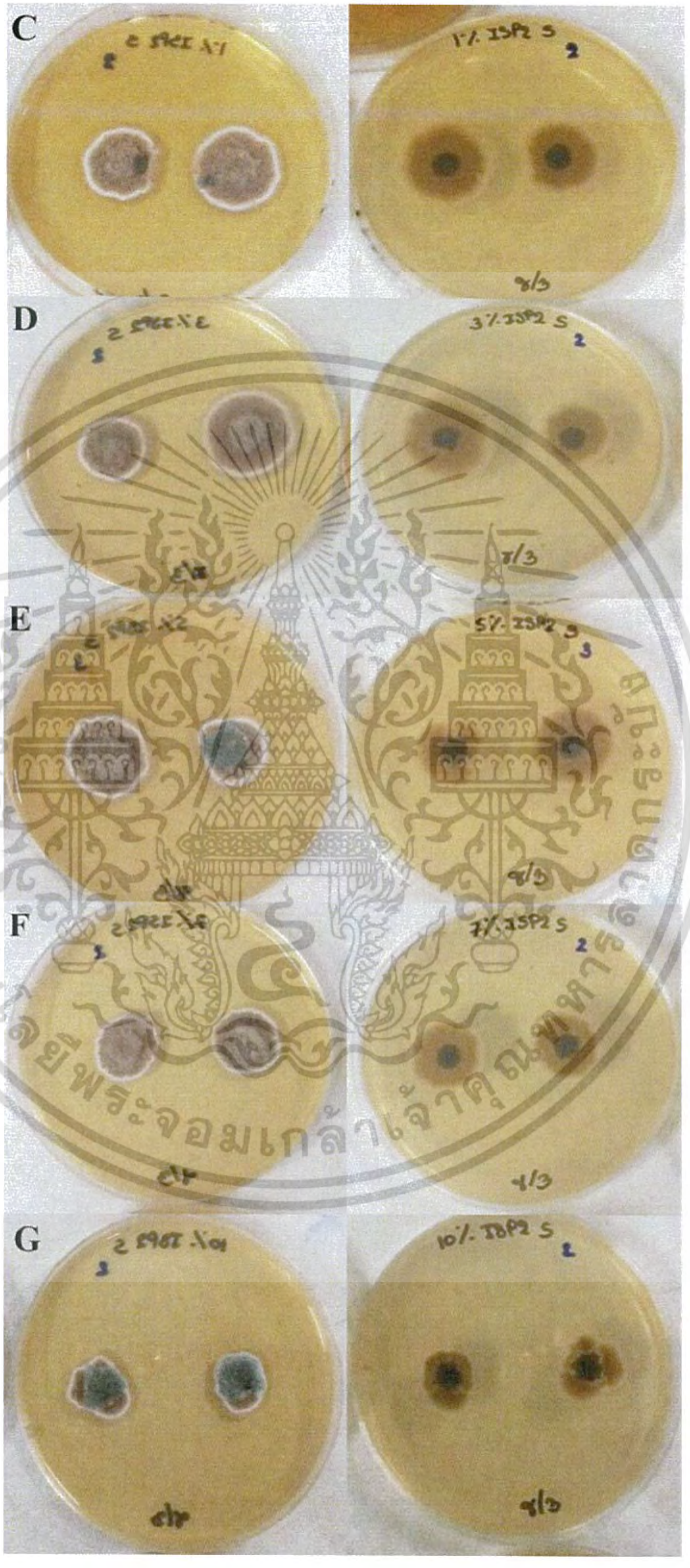
(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมักโมลาสของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 20%

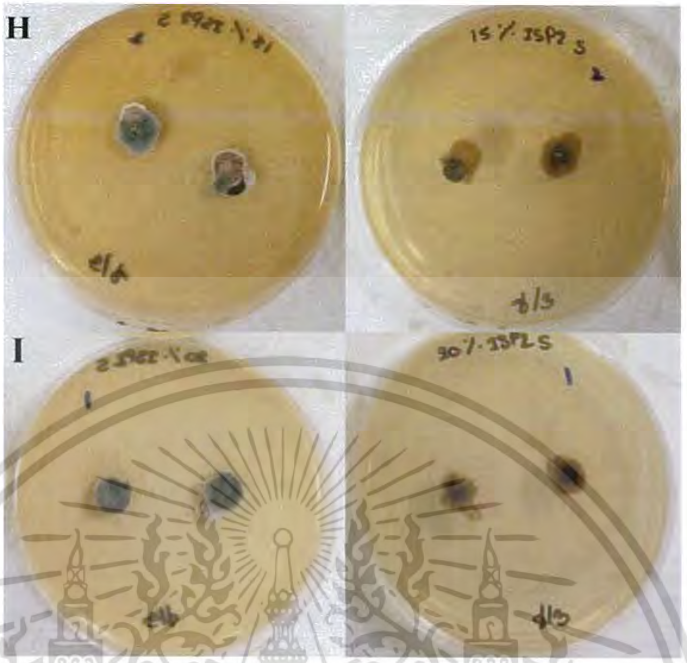
2. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหาร Yeast extract-Malt extract agar (ISP2) พบว่า เชื้อ RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ 33.35% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 82.75-95.38% (รูปที่ 4.11), เชื้อ RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ ในช่วง 51.75-69.20% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 3.0-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 81.23-90.73% (รูปที่ 4.12) และเชื้อ RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5-5.0% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 45.59-55.65% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 7.0-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 78.00-94.58% (รูปที่ 4.13)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 5%

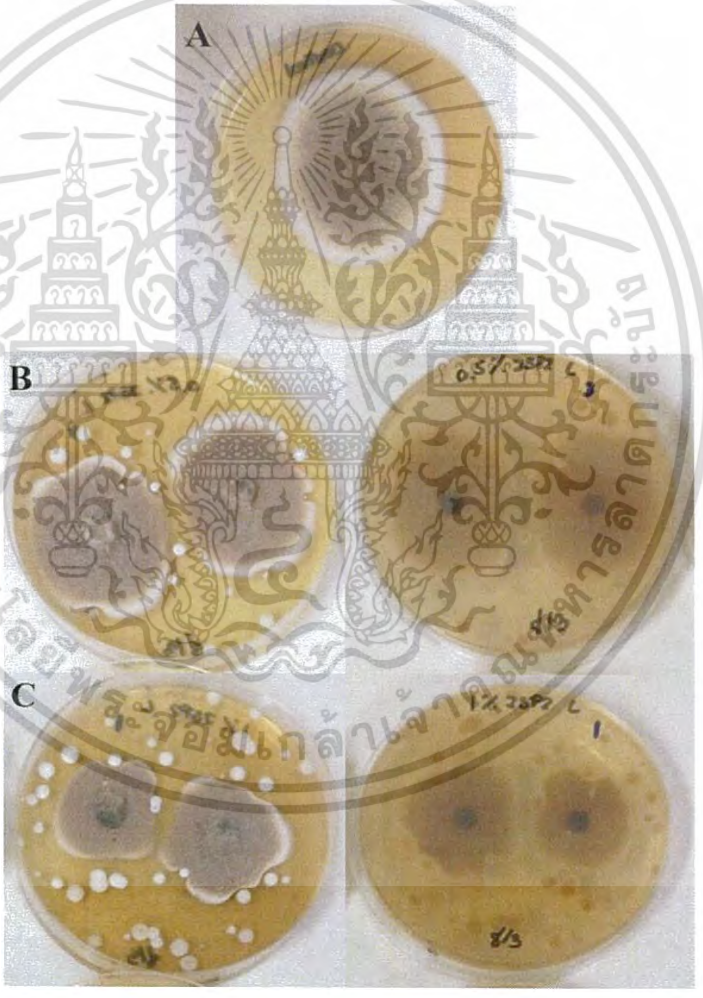
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 7%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

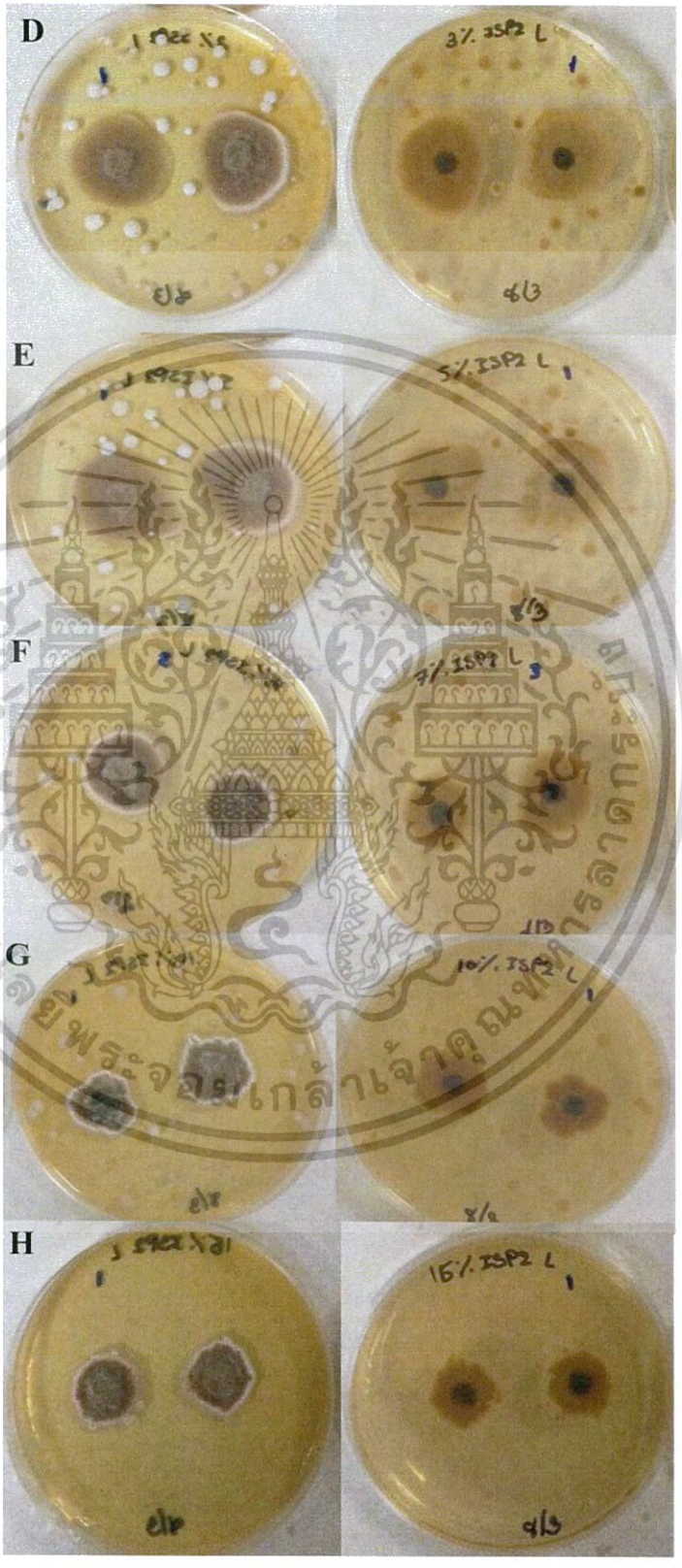
(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 15%

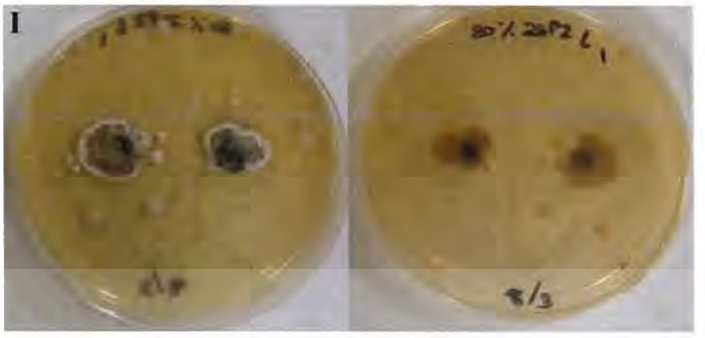
(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 20%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 7%

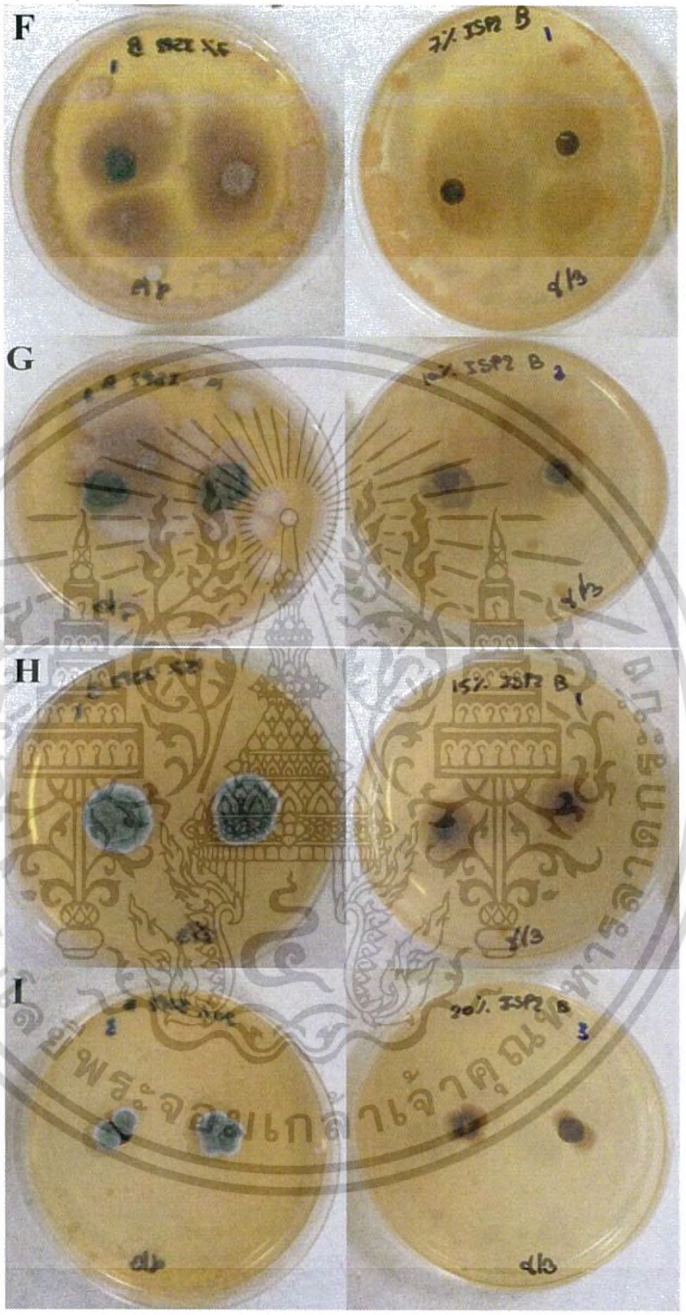
(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 7%

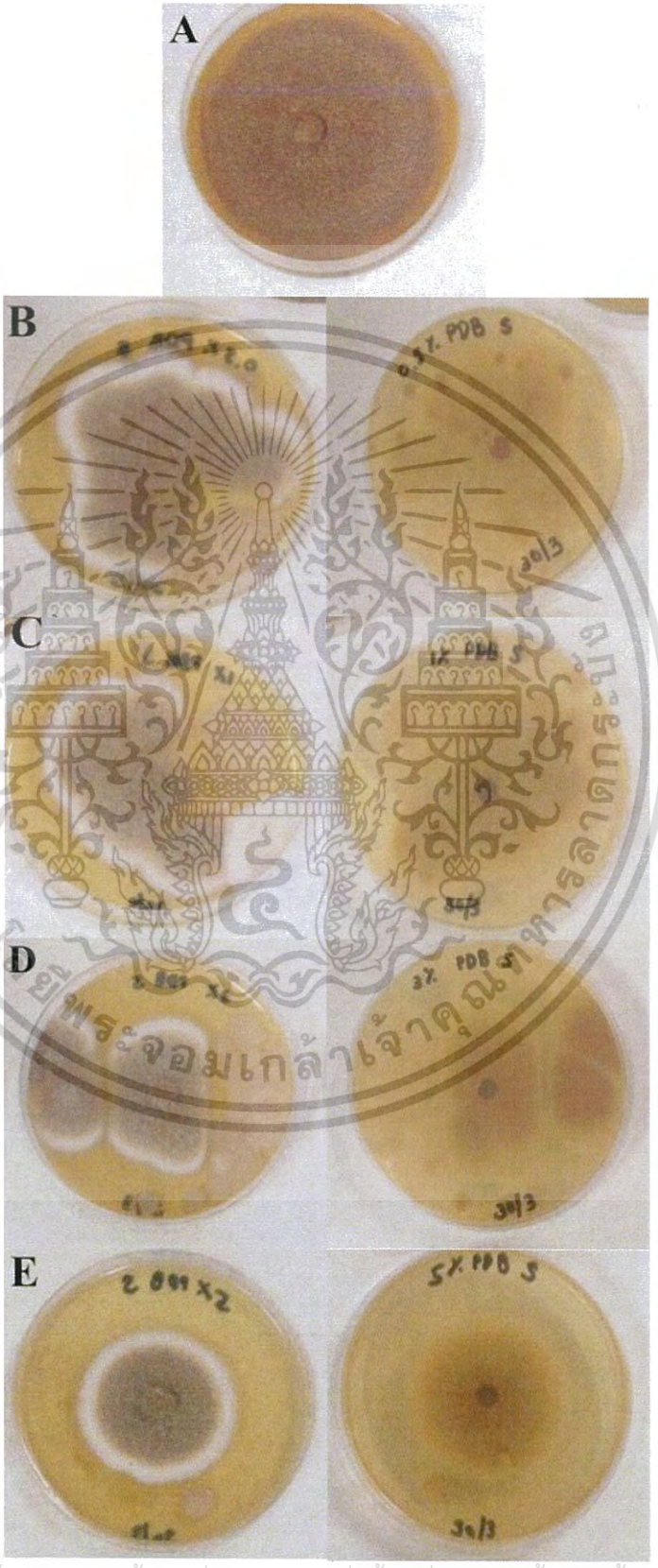
(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 15%

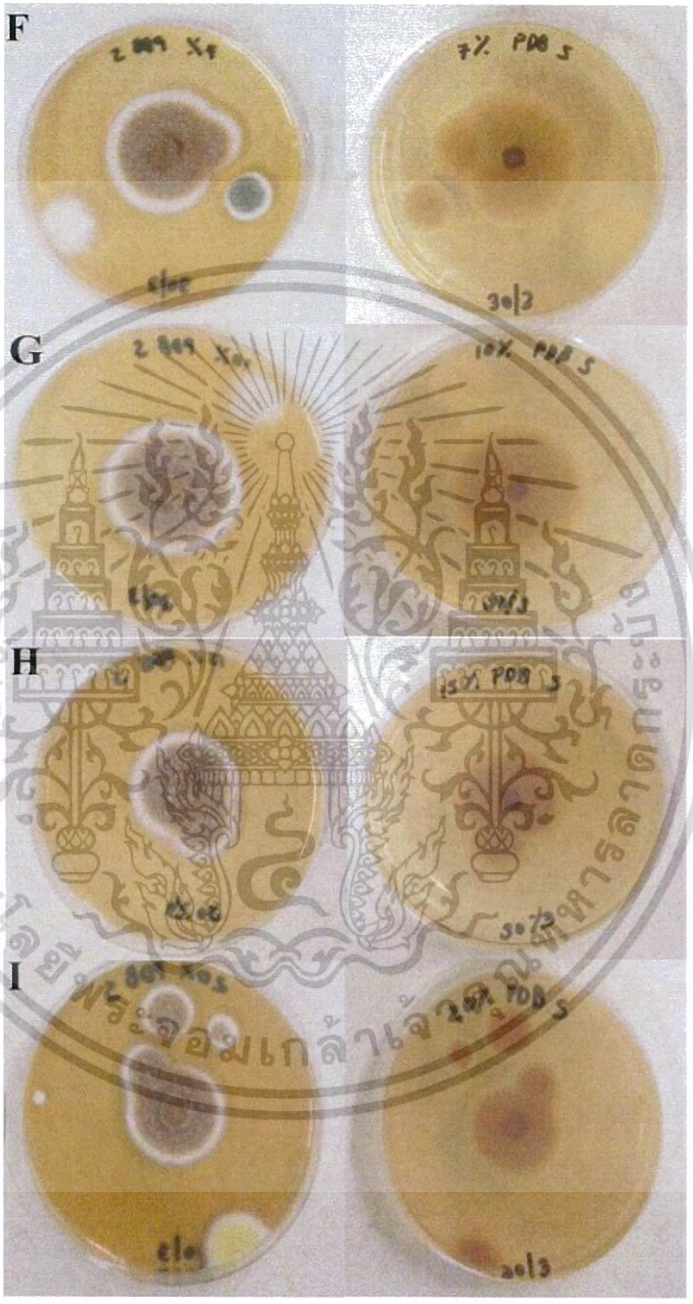
(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก ISP2 ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 20%

3. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. oryzae* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) พบว่า เชื้อ RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 18.56-78.96% (รูปที่ 4.14), เชื้อ AT1L-8 ที่ความเข้มข้น 0.5-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 45.27-73.18% (รูปที่ 4.15) และเชื้อ B ที่ความเข้มข้น 0.5-20% มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 50.05-73.79% (รูปที่ 4.15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 5%

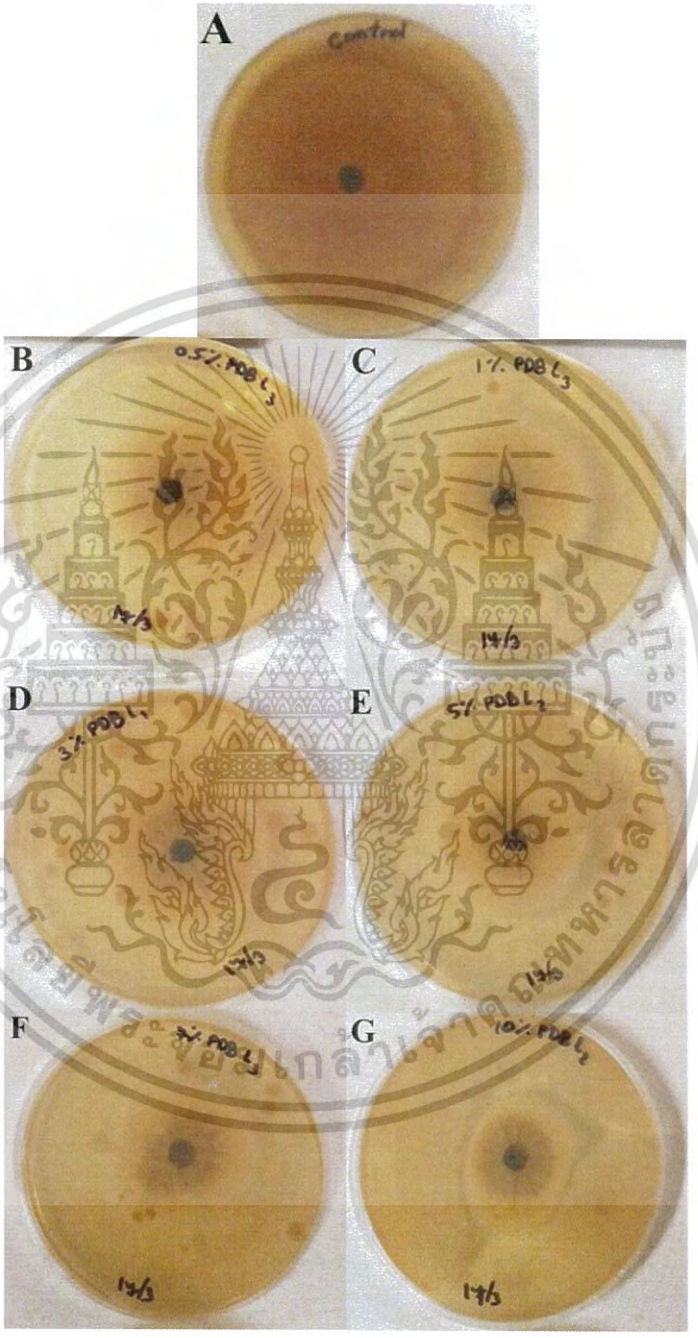
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 10%

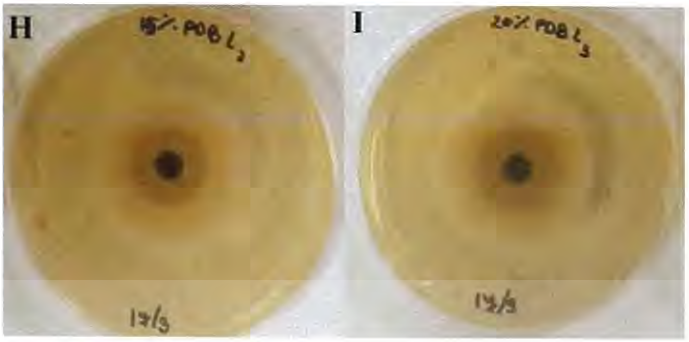
(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 5%

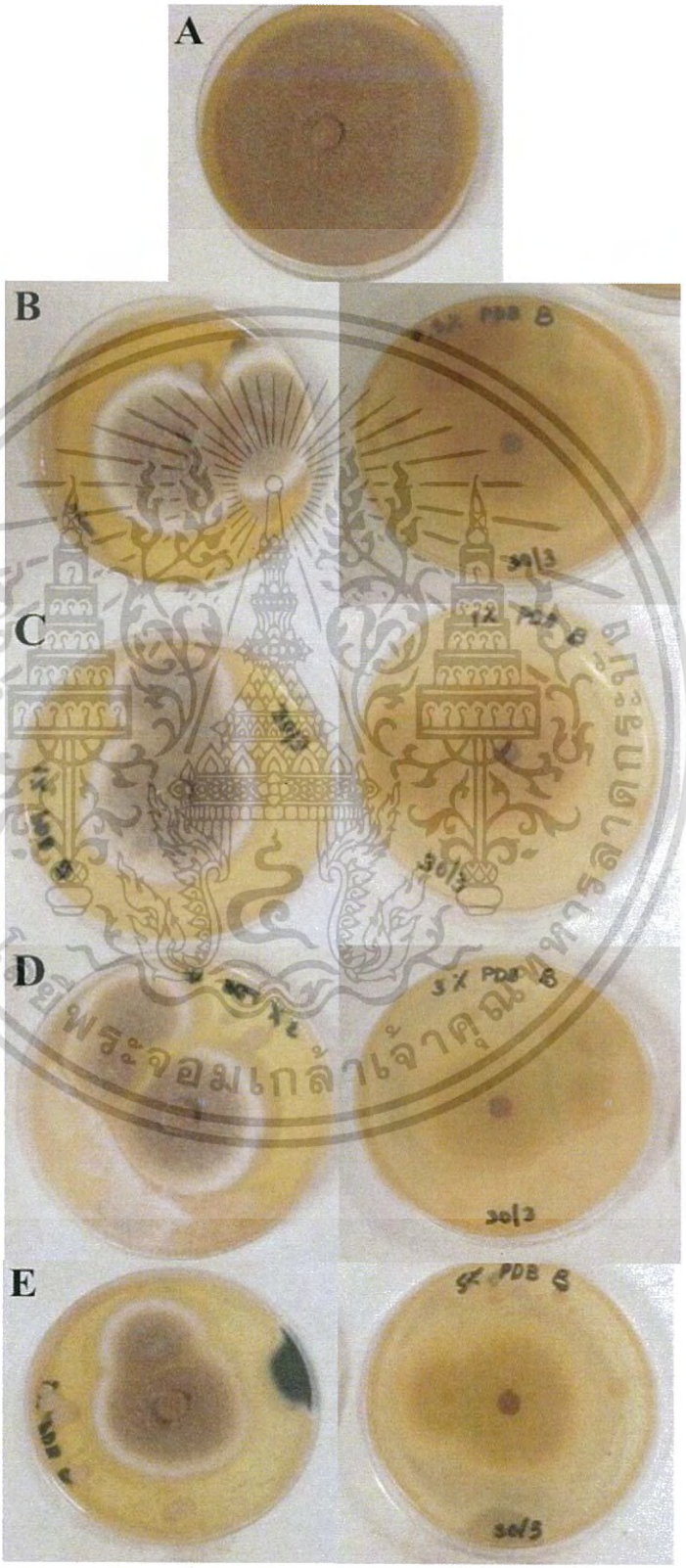
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 10%

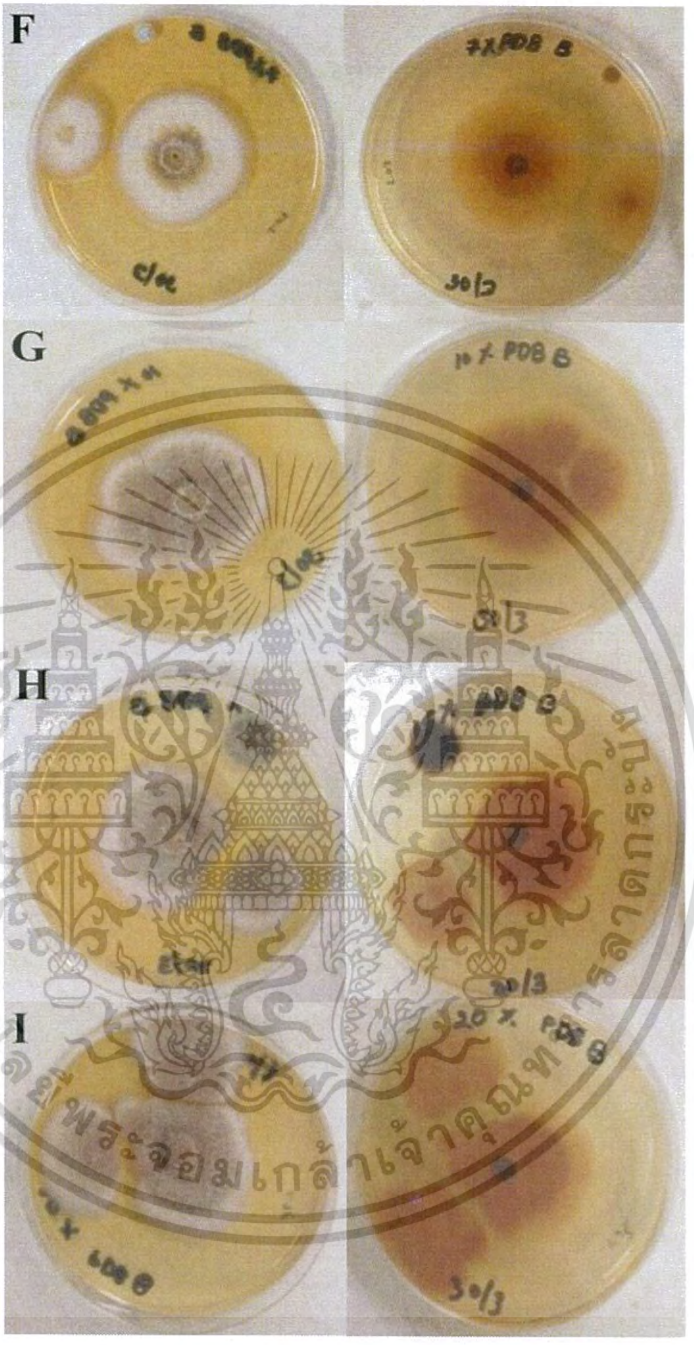
(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของน้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่น้ำหมัก PDB ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต

ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ (%ปริมาตร/ปริมาตร)	%ค่าเฉลี่ยการยับยั้งเส้นใย								
	RRS-8			RRL-8			RRB-2		
	อาหาร			อาหาร			อาหาร		
	Molasses	ISP2	PDB	Molasses	ISP2	PDB	Molasses	ISP2	PDB
0.5	39.0d	33.3d	18.6d	38.9d	51.8d	45.3d	23.8d	45.6d	50.1d
1.0	55.7d	82.8d	30.4d	53.5d	69.2d	47.4d	48.8d	47.7d	63.3d
3.0	73.4d	84.8d	43.5d	82.2d	80.3d	49.1d	58.4d	51.3d	63.9d
5.0	81.2d	90.4c	47.8d	84.2d	81.8d	53.1d	66.1d	55.7d	64.6d
7.0	84.4d	87.2d	62.5d	84.5d	88.2d	58.0d	73.9d	78.0d	66.1d
10.0	85.4d	90.4c	67.4d	86.6d	88.8d	71.3d	75.2d	84.5d	67.7d
15.0	86.9d	93.5b	71.3d	87.5d	89.8d	71.6d	78.8d	90.5c	70.9d
20.0	95.6a	95.4a	79.0d	97.3a	90.6c	73.2d	84.0d	94.5a	73.8d

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลทดลองด้วยวิธีการทดลองสามปัจจัย (Three Factorial Experiment) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completily Randomize Design) และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี DMRT ที่ $P < 0.05$ ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยผลของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pyricularia oryzae* ถูกประเมินค่าบนอาหาร PDA หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2°c) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อ RRS-8 และ เชื้อ RRL-8 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร Molasses เมื่อนำมาทดสอบมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรค สูงสุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ ร้อยละ 95.6 ถึง 98 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ RRB-2 มีเปอร์เซนต์ยับยั้งสูงสุดที่ ร้อยละ 94.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตบนอาหารแข็งโดยใช้ส่วนของสารสกัด (solid extract)

การวิเคราะห์การศึกษาภายในจานเพาะเชื้อ โดยใช้สารสกัดของแอคติโนมัยสีทที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Glycerol Peptone Molasses (GPM broth) ในแต่ละความเข้มข้นพบว่า สารสกัดของเชื้อ RRS-8 มีผลยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อก่อโรค โดยทดสอบบนอาหาร PDA ที่มีชิ้นส่วน mycelium plug ของเชื้อ *P. oryzae* ()ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 91% ถึง 99% (รูปที่ 4.17), เชื้อ RRL-8 มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 68.78% ถึง 92.21% (รูปที่ 4.18) และเชื้อ RRB-2 มีความสามารถในการยับยั้งอยู่ในช่วง 81.86% ถึง 92.71% (รูปที่ 4.18) ดังตารางที่ 4.6

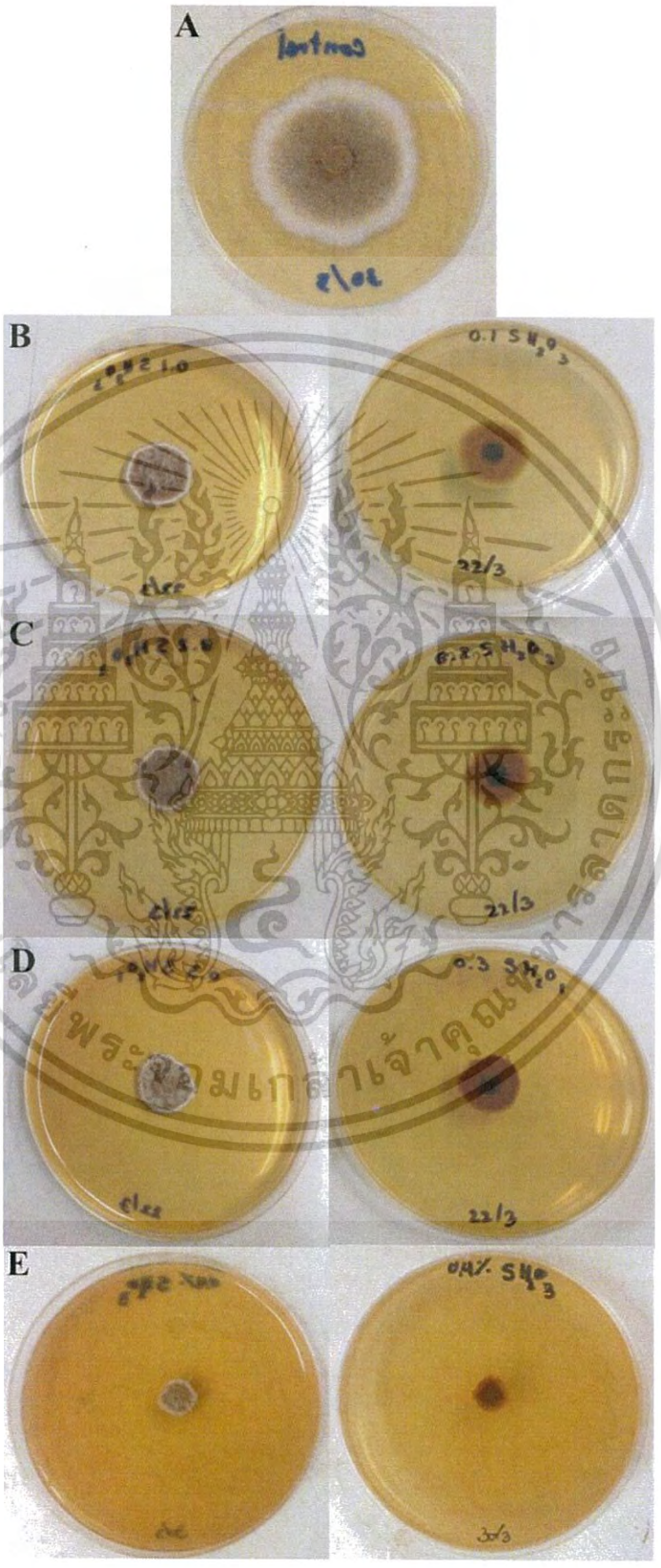
ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* ของความเข้มข้นของสารสกัดของเชื้อแอคติโนสีททั้ง 3 ไอโซเลต

ความเข้มข้นของสารสกัด (% กรัม/ปริมาตร)	%ค่าเฉลี่ยการยับยั้งเส้นใย		
	RRS-8	RRL-8	RRB-2
0.1	90.5cd	68.7c	79.0c
0.2	92.9bc	73.7c	81.6c
0.3	94.4b	81.1c	83.4c
0.4	**97.9a**	88.7c	85.5c
0.5	**99.3a**	92.9bcd	92.5bc

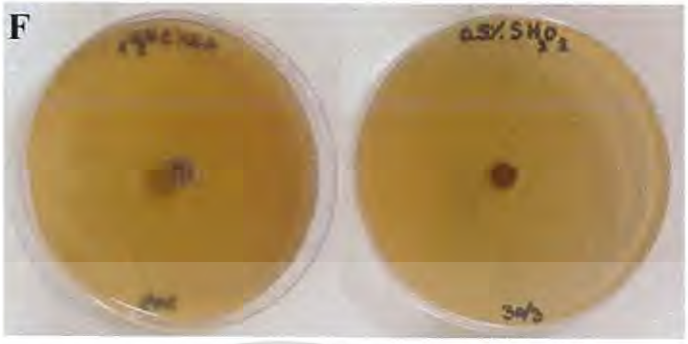
*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลทดลองด้วยวิธีการทดลองสามปัจจัย (Three Factorial Experiment) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completily Randomize Design) และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี DMRT ที่ $P < 0.05$ ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยผลของสารสกัดของแอคติโนมัยสิททั้ง 3 ที่เลี้ยงในอาหาร Molasses มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pyricularia oryzae* ถูกประเมินค่าบนอาหาร PDA หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2°c) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ไอโซเลต RRS-8 มีเปอร์เซนต์ยับยั้งสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ คือ ร้อยละ 97.9 และ ร้อยละ 99.3 ตามลำดับ ไอโซเลต RRB-2 และ ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5 มีเปอร์เซนต์ยับยั้ง ในช่วง ร้อยละ 92.5 ถึง 92. 9 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 5%

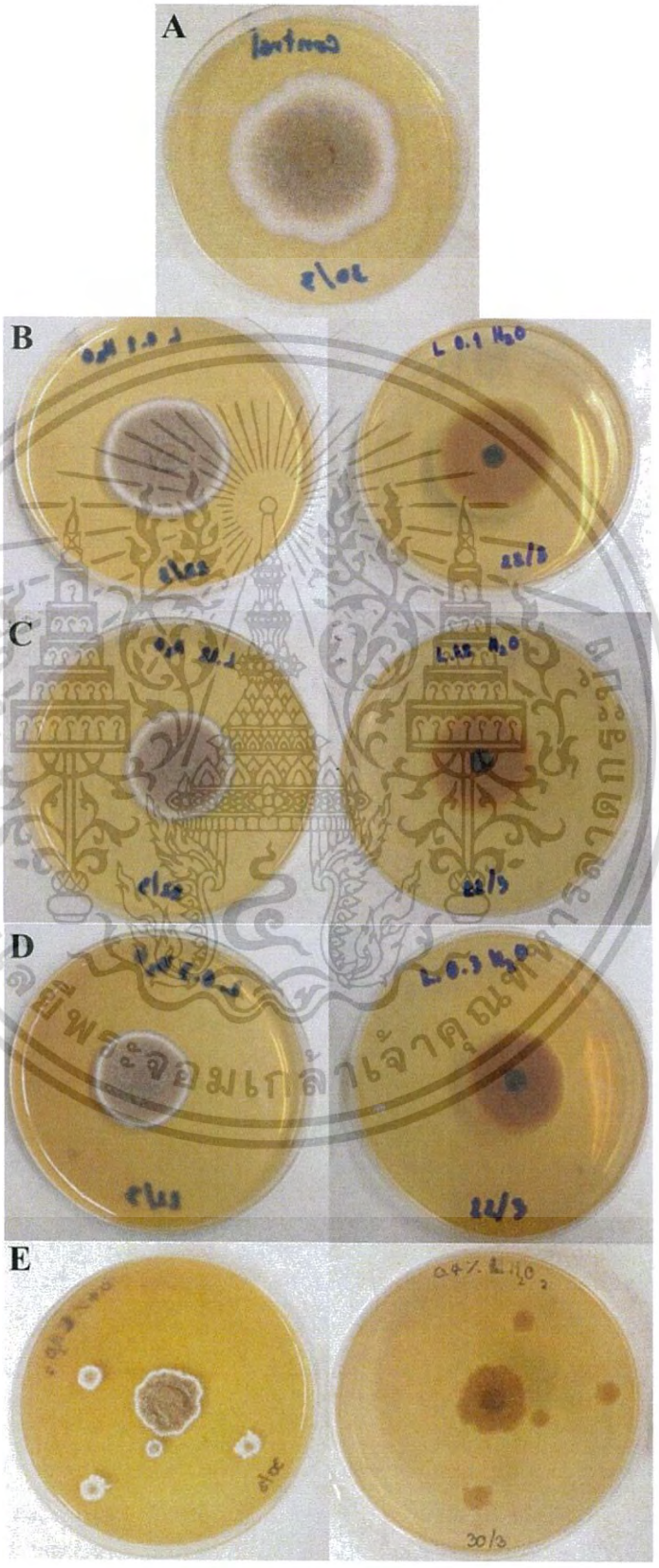
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 10%

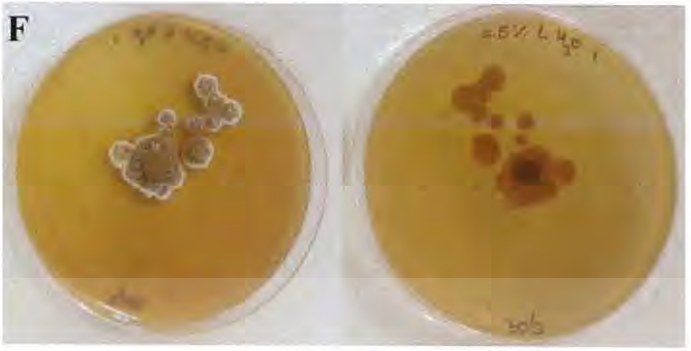
(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 5%

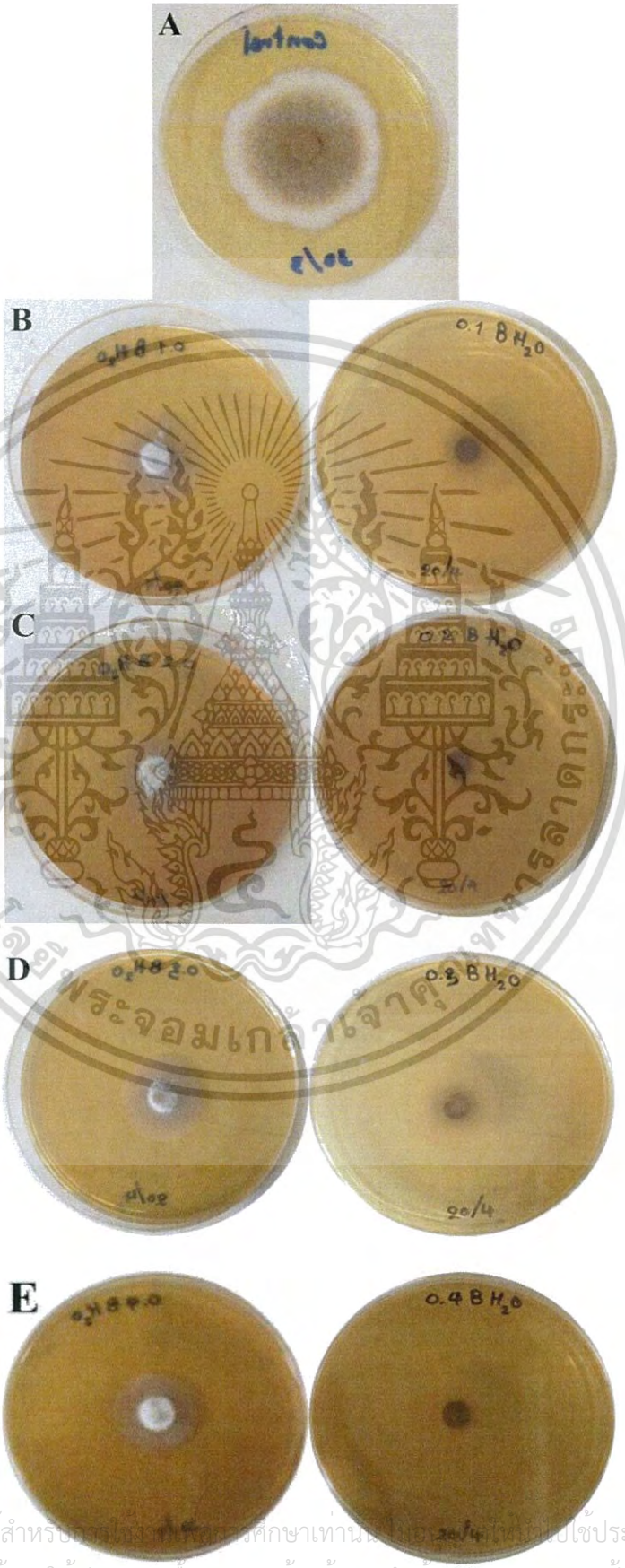
(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRL-8 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.19 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใช้ส่วนของสารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 มาทำการเพาะเลี้ยง

(A) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยไม่ใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท (ตัวควบคุม)

(B) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 0.5%

(C) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 1%

(D) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 3%

(E) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 5%

(F) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 7%

(G) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 10%

(H) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 15%

(I) ลักษณะการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Pyricularia oryzae* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยใส่สารสกัดของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRB-2 ที่ความเข้มข้น 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การประเมินผลการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรคในระดับโรงเรือน

ประสิทธิภาพของสารสกัดของไอโซเลต RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการป้องกัน จะฉีดพ่นสารสกัดของไอโซเลต RRS-8 ผ่านไปแล้ว 12 ชั่วโมง จึงทำการปลูกเชื้อ *P. oryzae* ตรวจสอบผลพบว่าชั่วโมงที่ 3, 12, 24 และ 48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 8.39, 10.15, 12.09 และ 13.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้ Tricyclazole (750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าชั่วโมงที่ 3, 12, 24 และ 48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 5.77, 9.10, 11.88 และ13.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และผลของชุดควบคุมของการทดสอบการป้องกัน พบว่าชั่วโมงที่ 3, 12 , 24 และ 48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 38.26, 50.61, 65.55 และ 70.06 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.20) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

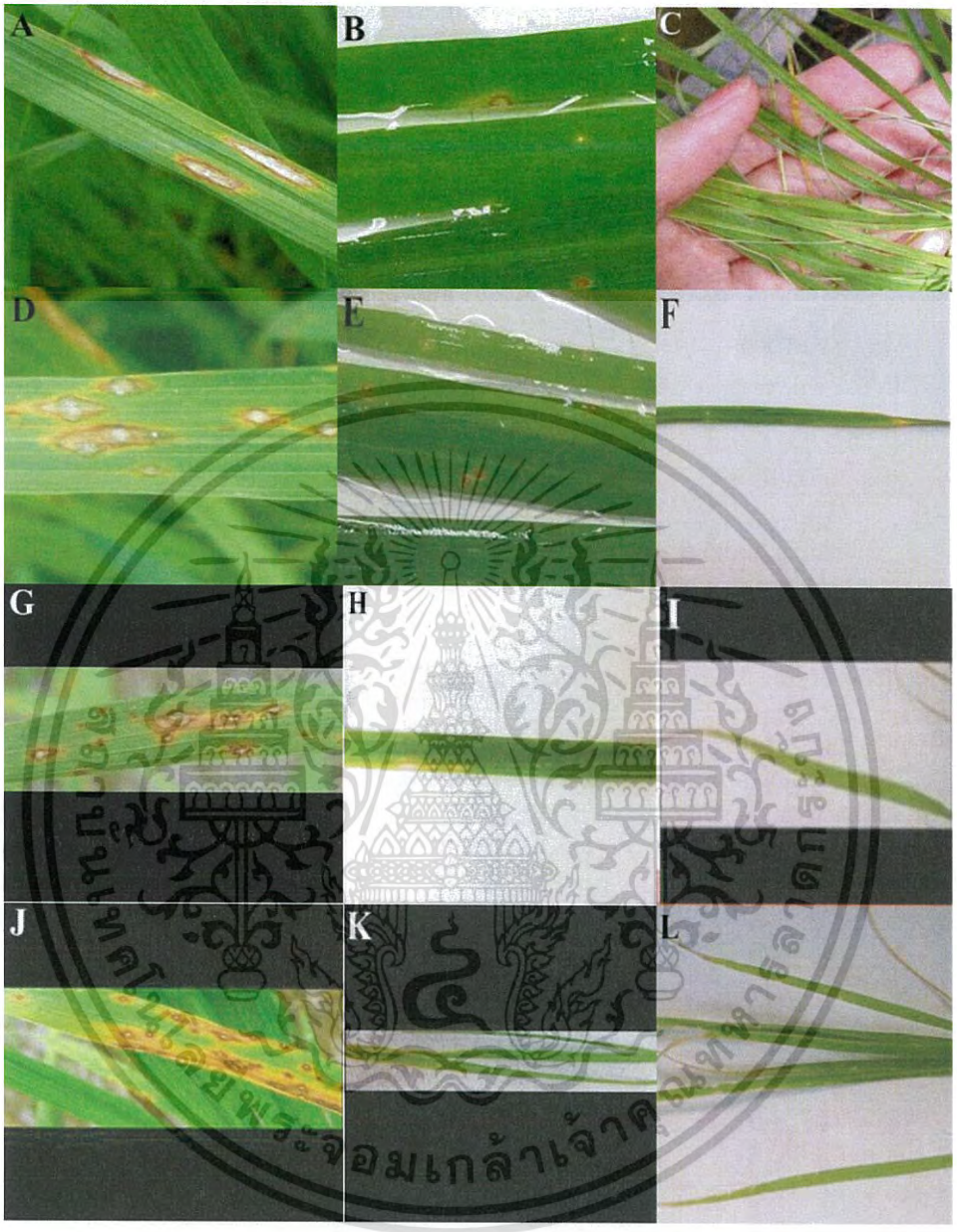
ตารางที่ 4.7 ผลการป้องกันการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อรา (Tricyclazole) ในระดับโรงเรือนที่ชั่วโมงต่างๆ

ชั่วโมงที่	%ค่าเฉลี่ยอัตราการเกิดโรค		
	Tricyclazole	สารสกัด	ตัวควบคุม
3	5.8a	8.4a	38.3
12	9.1b	10.2b	50.6
24	11.9c	12.1c	65.6
48	13.9c	14.0c	70.1

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลทดลองการป้องกันโรคใบไหม้ในข้าว ด้วยวิธีการทดลองสองปัจจัย (Two Factorial Experiment) โดยเปรียบเทียบสารเคมีกับสารสกัดในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completily Randomize Design) และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี DMRT ที่ $P < 0.05$ ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 30 ซ้ำ โดยทำการฉีดพ้นสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทก่อนฉีดพ้นเชื้อก่อโรค แล้วตรวจผลอัตราการเกิดโรคที่ 3 12 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้น ในแต่ละชั่วโมงที่ตรวจสอบ คิดเป็น ร้อยละ 1 ถึง 2 เปอร์เซนต์โดยสารสกัดและสารเคมีมีอัตราการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คิดเป็นผลต่างการยับยั้งเทียบกับชุดควบคุมพบว่า มีผลต่างการยับยั้งการเกิดโรคคิดเป็นร้อยละ 90 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 ประสิทธิภาพของสารสกัดของเชื้อ RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการป้องกัน จะฉีดพ่นสารสกัดของเชื้อ RRS-8 ผ่านไปแล้ว 12 ชั่วโมง จึงทำการปลูกเชื้อ *P. oryzae* โดย (A) (B) และ (C) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 3 โดย (A) คือตัวควบคุม (B) คือสารสกัด (C) คือ tricyclazole

(D) (E) และ (F) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 12 โดย (D) คือตัวควบคุม (E) คือสารสกัด (F) คือ tricyclazole

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(G) (H) และ (I) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 24 โดย (G) คือตัวควบคุม (H) คือสารสกัด (I) คือ tricyclazole

(J) (K) และ (I) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 48 โดย (J) คือตัวควบคุม (K) คือสารสกัด (I) คือ tricyclazole

ส่วนผลการทดสอบการยับยั้ง จะทำการฉีดพ่นสารสกัด RRS-8 ก่อนการปลูกเชื้อ *P. oryzae* 12 ชั่วโมง พบว่าชั่วโมงที่ 3, 12, 24 และ48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 29.51, 36.08, 37.40 และ 38.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้ Tricyclazole (750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าชั่วโมงที่ 3, 12, 24 และ48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 23.48, 38.18, 40.86 และ 41.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และผลของชุดควบคุมของการทดสอบการยับยั้ง พบว่าชั่วโมงที่ 3, 12, 24 และ48 คิดค่าอัตราการเกิดโรคเป็น 50.61, 73.67, 81.48 และ 87.65 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.21) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ผลการยับยั้งการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อรา (Tricyclazole) ในระดับโรงเรือน

ชั่วโมงที่	%ค่าเฉลี่ยอัตราการเกิดโรค		
	Tricyclazole	สารสกัด	ตัวควบคุม
3	23.5a	29.5b	50.6
12	38.2c	36.1c	73.7
24	40.7c	37.5c	81.5
48	41.2c	38.0c	87.7

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลทดลองการยับยั้งโรคใบไหม้ในข้าวในระดับโรงเรือน ด้วยวิธีการทดลองสองปัจจัย (Two Factorial Experiment) โดยเปรียบเทียบสารเคมีกับสารสกัดในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์(Completily Randomize Design) และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี DMRT ที่ $P < 0.05$ ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 30 ซ้ำ โดยทำการฉีดพ้นสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทภายหลังฉีดพ้นเชื้อก่อโรค แล้วตรวจผลอัตราการเกิดโรคที่ 3, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้น ในชั่วโมงที่ 3 สารเคมีมีประสิทธิสูงกว่าสารสกัด คือมีอัตราการเกิดโรคน้อยกว่าสารสกัด หลังจากนั้นตรวจสอบในชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 พบว่าอัตราการเกิดโรคที่ใช้สารสกัดและสารเคมีในการยับยั้งโรคใบไหม้ในข้าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยคิดเป็นอัตรายับยั้งการเกิดโรคร้อยละ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.21 ประสิทธิภาพของสารสกัดของเชื้อ RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการยับยั้ง จะฉีดพ่นสารสกัดของเชื้อ RRS-8 ผ่านไปแล้ว 12 ชั่วโมง จึงทำการปลูกเชื้อ *P. oryzae oryzae* โดย

(A) (B) และ (C) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 3 โดย (A) คือตัวควบคุม (B) คือสารสกัด (C) คือ tricyclazole

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(D) (E) และ (F) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 12 โดย (D) คือตัวควบคุม (E) คือสารสกัด (F) คือ tricyclazole

(G) (H) และ (I) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 24 โดย (G) คือตัวควบคุม (H) คือสารสกัด (I) คือ tricyclazole

(J) (K) และ (I) เป็นการเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 48 โดย (J) คือตัวควบคุม (K) คือสารสกัด (I) คือ tricyclazole

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ผลในระดับโมเลกุลของ *Streptomyces* ทั้ง 3 ไอโซเลต โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16s rRNA gene โดยจะทำการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ตลอดจนการวิเคราะห์สัณฐานและสรีรวิทยาหรือลักษณะทางฟีโนไทป์ โดยลักษณะทางฟีโนไทป์จะสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 โดยตรวจผลการทดลองในวันที่ 7 และ 14 ซึ่งไอโซเลต RRS-8 และ RRL-8 ในวันที่ 7 และ 14 จะมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน และไอโซเลต RRB-2 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ที่ระยะเวลาวันที่ 7 และ 14 จะไม่แตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละไอโซเลตจะมีระยะการสร้างสปอร์ที่แตกต่างกัน บางไอโซเลต ไม่ได้สร้างสปอร์บนอาหาร ISP2 จากผลการทดลอง จึงสามารถระบุชนิดของแอคติโนมัยสีทในระดับเบื้องต้นได้ว่าแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 และ RRL-8 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces malaysiensis* มากที่สุด (รูปที่ 4.2) และแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRB-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces sioyaensis* มากที่สุด (รูปที่ 4.6) การศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dual culture test บนอาหาร PDA ซึ่งเกิดเป็นลักษณะของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยจะทำการตรวจผลการทดลองในวันที่ 7 เนื่องจากเมื่อทำการตรวจผลในวันที่ 14 การเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคยังเท่าเดิม จากผลการทดลองพบว่า แอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต มีผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรค *(Pyricularia oryzae)* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้การใช้น้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากน้ำหมักเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต มาทดสอบด้วยเทคนิค Poisoned food พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต RRS-8 และน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต RRL-8 ในอาหาร GPM broth มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคมากที่สุดโดยไม่แตกต่างอย่างมนัยสำคัญ และ น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต RRS-8 และน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต RRB-2 ในอาหาร ISP2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคมากที่สุดโดยไม่แตกต่างอย่างมนัยสำคัญ และน้ำเลี้ยงเชื้อของทุกไอโซเลต ในอาหาร PDB มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญน้อยกว่าร้อยละ 80 ทั้งหมด ส่วนผลการทดลองโดยการใช้สารสกัดพบว่าสารสกัดจากน้ำหมักเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5% มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราก่อโรคมากที่สุด

การประเมินผลการใช้ สารสกัดแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าวบนต้นกล้าในโรงเรือน พบว่าประสิทธิภาพของ สารสกัดเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 ในการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยทดสอบการป้องกันพบว่า ชั่วโมงที่ 3 ประเมินค่าอัตราการเกิดโรคคิดเป็น 8.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบการยับยั้ง จะทำการฉีดพ่น สารสกัดเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 ก่อนการปลูกเชื้อพบว่า ชั่วโมงที่ 3 ประเมินค่าอัตราการเกิดโรคคิดเป็น 29.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในขณะเดียวกันจะทำการทดสอบจะเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้ Tricycazole (750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถประเมินค่าอัตราการเกิดโรคได้ 5.8 เปอร์เซ็นต์ และ23.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งได้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยข้างต้นจึงสนับสนุนว่าแอคติโนมัยสีทเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีคุณค่าต่อการศึกษาทางด้านเภสัชศาสตร์และด้านเกษตรกรรม เนื่องจากแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้อย่างดีและหลากหลายชนิด โดยสามารถเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้เกษตรกรได้ สามารถพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ผู้บริโภค ตลอดจนเกษตรกรและยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาอนุกรมวิธาน โดยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะทางจีโนไทป์จึงสามารถระบุชนิดของแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคข้าวเบื้องต้น พบว่า แอคติโนมัยสีทไอโซเลต RRS-8 และ ไอโซเลต RRL-8 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces malaysiensis* มากที่สุด และไอโซเลต RRB-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces sioyaensis* มากที่สุด

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวของสารสกัดหยาบแอคติโนมัยสีท พบว่า สารสกัดแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RRS-8 ที่ความเข้มข้น 0.4% สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวได้

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวของสารสกัดหยาบแอคติโนมัยสีทในระดับโรงเรือน พบว่า แอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวได้ และยังสามารถใช้สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทแทนการใช้สารเคมีในการป้องกันหรือยับยั้งโรคไหม้ในข้าวได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับงานวิจัยของ Qili Li และคณะ (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว และได้ค้นพบว่ากลุ่มแอคติโนมัยสีทมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคในข้าว Burr และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษา การใช้วิธีควบคุมโรคด้วยชีววิธี (Biocontrol) แทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และได้ค้นพบว่า สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น (Secondary Metabolite) สามารถยับยั้งรวมไปถึงการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคในระยะยาวได้ และลดต้นทุนการผลิต เป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรให้ความสำคัญต่อการพัฒนาและปรับปรุงการจัดการด้านเกษตรกรรมเพื่อยกระดับประสิทธิภาพการผลิตของเกษตรกร โดยที่ใช้สารสกัดจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมี เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตและช่วยลดต้นทุน ดังนั้นควรสนับสนุนให้มีการค้นคว้าทดลอง และส่งเสริมการป้องกันโรคด้วยเทคโนโลยีชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2) มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความรู้แก่เกษตรกรในเรื่องโรคไหม้ในข้าว เพื่อให้เกษตรกรเข้าใจถึงลักษณะโรคตลอดจนผลเสียหายและวิธีป้องกันรักษา

3) มีความจำเป็นที่จะต้องวิจัยเพื่อหาวิธีป้องกันการเกิดโรคไหม้ในข้าว เพื่อลดมูลค่าความเสียหายของประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน. [ออนไลน์]. 2555. แหล่งที่มา: http://webcache.googleusercontent.com [เข้าถึงเมื่อ 6 ม.ค. 2559]

กรรณิการ์ ดวงมาลย์และคณะ. ความหลากชนิดและฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดชลบุรี และจันทบุรี. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: https://research.rdi.ku.ac.th/forest/แอคติโนมัยสีท. [5 พฤษภาคม 2559]

เกษม สร้อยทอง. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. [ออนไลน์]. 2532. แหล่งที่มา: www.lartc.rmutl.ac.th/atri2/gs/วิทยานิพนธ์/new [5 พฤษภาคม 2559]

ข้าวขาวดอกมะลิ 105. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://phimnipaja.blogspot.com/p/105-105-105-105-105-105-105-105-105-105.html [9 พฤษภาคม 2559]

ข้าว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/ข้าว [9 พฤษภาคม 2559]

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. [ออนไลน์]. 2534. แหล่งที่มา: agkb.lib.ku.ac.th/doa/search_detail/result/217617 [9 พฤษภาคม 2559]

ชูเกียรติ โอภาสวงศ์. การส่งออกข้าวไทย [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http.//www.ricethailand.go.th/rkb/data_008/rice_xx2-08_produce0007.html [9 พฤษภาคม 2559]

พรพรรณ อู่สุวรรณ. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp.และ *Streptomyces* spp.ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/1710/1/Pornpan_full.pdf [9 พฤษภาคม 2559]

ทรงเชาว์ อินสมพันธ์. พืชไร่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เล่ม 1 เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. [ออนไลน์]. 2531. แหล่งที่มา: mis.agri.cmu.ac.th/person/view_person_detail.asp?id=0187 [9 พฤษภาคม 2559]

โรคไหม้ในข้าว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=3&chap=1&page=t3-1- infodetail10.html [6 มกราคม 2559]

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2558. แอคติโนมัยสีท.พิมพ์ครั้งที่ 1. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัย บูรพา จังหวัดชลบุรี.

วัชรินทร์ บุญวัฒน์. 2527. ข้าว, น. 26-34. *ใน* พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ เล่ม 1. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุฑามาส เจียรพงษ์พร. 2552. อนุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทหายากในอุทยานแห่งชาติแม่วงศ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สมหวัง วังใน. 2558. จุลินทรีย์ในดิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช

สารเคมีไตรไซคลาโซล (tricyclazole). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=yakkeaw&month=25-01-2011&group=8&gblog=21 [9 พฤษภาคม 2559]

ไสว บัวแก้ว. การใช้สารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces philanthi* RM-1-138 ที่ผ่านความร้อนเพื่อยับยั้งโรคกาบใบแห้งในข้าว คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2557.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักวิจัยข้าว.แหล่งกำเนิดข้าว. [ออนไลน์] แหล่งที่มา:
http://pirun.ku.ac.th/~b531010rice.html [5 พฤษภาคม 2559]

สำนักวิจัยข้าวและพัฒนาข้าว. การแพร่ระบาดของโรคไหม้ในข้าว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://
www.brrd.in.th [5 พฤษภาคม 2559]

McCarthy, J.A. and Williams, T.S. (1990). Methods for studying the ecology of actinomycetes. In R Grigorova and JR Norris (Eds.) Method in Microbiology, pp. 535. London: Academic Press Limited.

Burges, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopeticides. Kluwer Academic Publishers. Great Britain.

Swan, D.G, Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C. and Salas,. J.A. 1994. Characterisation
of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics 242 : 358-362.

[Online]. Available: http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice-histories.html (02/10/15)

[Online].Available : http://www.nstda.or.th/nstda-knowledge/3106-biocontrol (02/10/15)

Brunel, B., A. Givaudan, A. Lanois, R.J. Akhurst and N. Boemare. 1997. Fast and accurate identification of Xenorhabdus and Photorhabdus species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. Appl. and Environ. Microbiol. 63 : 574-580.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetics computer group, Inc. 1999. Introduction to SeqLab Lecture Notes and Laboratory. Training Course at Office of Biotechnology Research & Development, Bangkok, Thailand, September 28-30, 1999. 183 pp.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymetic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Weisburg, G.W., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomol DNA amplification for phylogenetic study. Jour. Bacteriol. 173 : 697-703.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Agar	17.0	กรัม
Glucose	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ล้างมันฝรั่งให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปต้มจนสุกกรองเอาแต่น้ำแล้วต้มวุ้นให้ละลาย เติมน้ำตาล glucose ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

Potato dextrose broth (PDB)

potato	200	กรัม
Glucose	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เติมน้ำตาล glucose ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

Glycerol Peptone Molasses (GPM)

Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
Molasses	1.0	มิลลิลิตร
Beef extract	0.5	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
$CaCO_3$	0.4	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

Yeast extract-Malt extract agar (ISP2)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar	18.0	กรัม

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glucose-yeast extract broth

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salt-starch agar (ISP4)

Solution starch	10.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
$CaCO_3$	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glycerol-asparagine agar (ISP5)

L-asparagine (anhydrous)	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K_2HPO_4 (anhydrous)	1.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone-Yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar	36	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม
L-asparagine	1.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salts solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	ลิตร

Carbon utilization agar (ISP9)

Carbon sources

Carbohydrate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

Pridham and Gottlieb trace salts

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.64	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.11	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.79	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Basal mineral salts agar

$(NH_4)\ 2SO_4$	2.64	กรัม
KH_2PO_4.anhydrous	2.38	กรัม
$K2HPO_4.3H_2O$	5.65	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8-7.0

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ Carbon sources มาผสมกับ Basal mineral salts agar

Glucose asparagines agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร

pH 6.8-7.0

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (Difco)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH6.8

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Boullion gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
Distilled water	100.0	มิลลิลิตร

pH 7.0-7.2

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone KNO_3 broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO_3	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Distilled water	100.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Basal inorganic nitrogen medium

Carbohydrate	10.0	กรัม
$(NH4)2HPO_4$	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร
pH 7.0		
0.04% Bromocresol purple	15.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมี

Flooding solution

Skim milk	0.1	กรัม
5 mM CHES (N-cyclohexyl-2-amino-		
Ethanesulfonic acid) (pH 9.0)	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Sulphanilic acid solution

Sulphanilic acid	0.8	กรัม
5N Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย Sulphanilic acid ใน 5N Acetic acid โดยใช้ความร้อน สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)

Reagent 4, Base wash

Sodium hydroxide	1.2	กรัม
Mili-Q water	100	มิลลิลิตร

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	986	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	372.24	มิลลิลิตร

น้ำกลั่นผสม EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

1 M Tris-Cl (pH 8.0)

Tris-base	121.1	มิลลิลิตร

น้ำกลั่นผสม Tris-base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6-8

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M monobasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
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	
Yellowish Pink			
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
Reddish Orange, Reddish Brown			
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	
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	
Orange Brown			
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	#EF6F1A	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
Orange Yellow, Yellowish Brown			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
Bluish Green			
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	
Greenish Blue			
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	
Blue			
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
	Purplish Blue	
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
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51
	Violet	
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
	Purple		
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	
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	
	Reddish Purple		
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
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	
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
รูปการประเมินผลการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรคในระดับโรงเรือน

1. ผลการป้องกันการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อรา (Tricyclazole) ในระดับโรงเรือน

ตัวควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี (tricyclazole)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัด

2. ผลการยับยั้งการควบคุมโรคไหม้ในข้าว โดยใช้สารสกัดของเชื้อต้านทานโรค (RRS-8) เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อรา (Tricyclazole) ในระดับโรงเรือน

ตัวควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี (tricyclazole)

สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้