



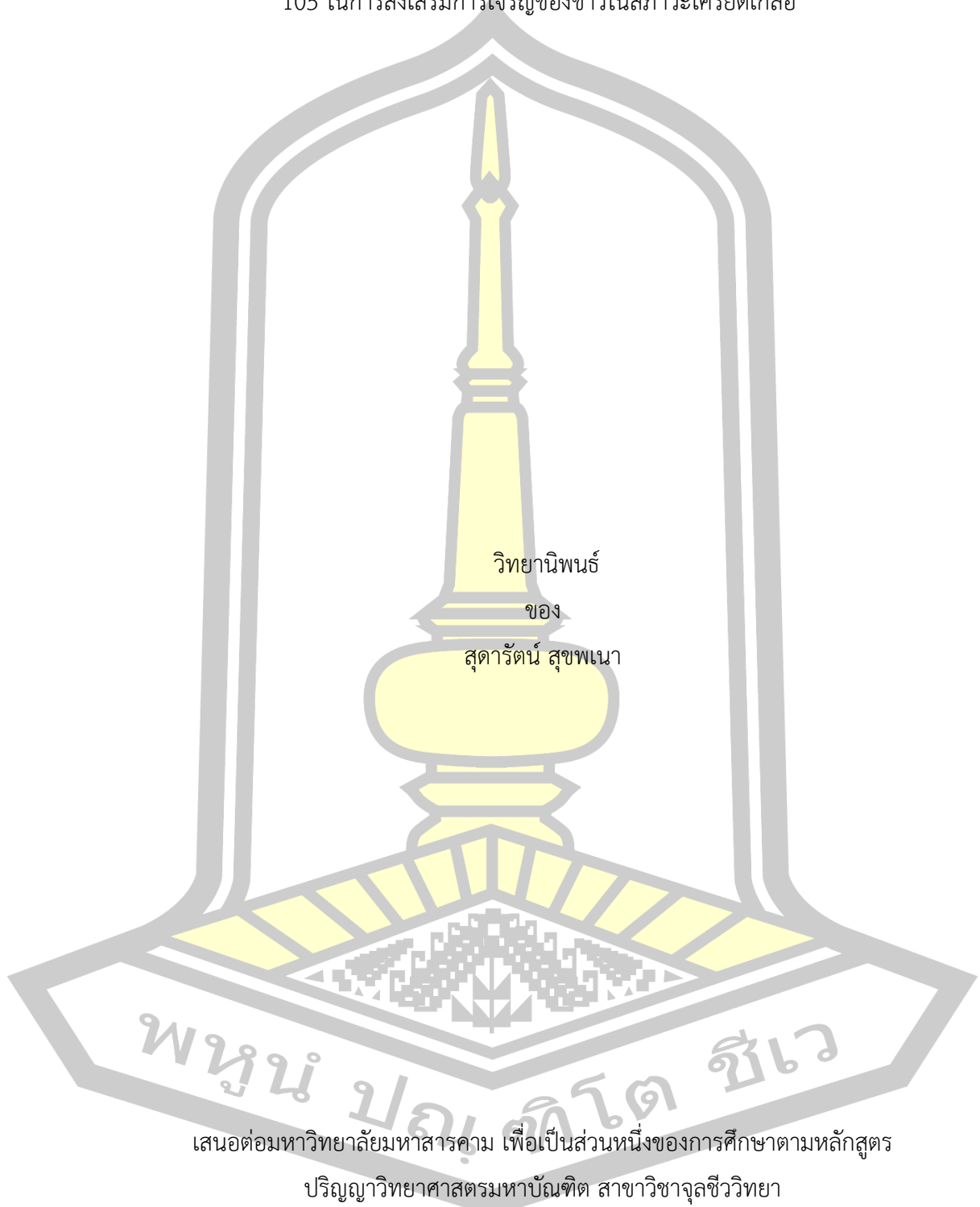
การประยุกต์ใช้เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือ

วิทยานิพนธ์
ของ
สุดารัตน์ สุขพเนา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ธันวาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

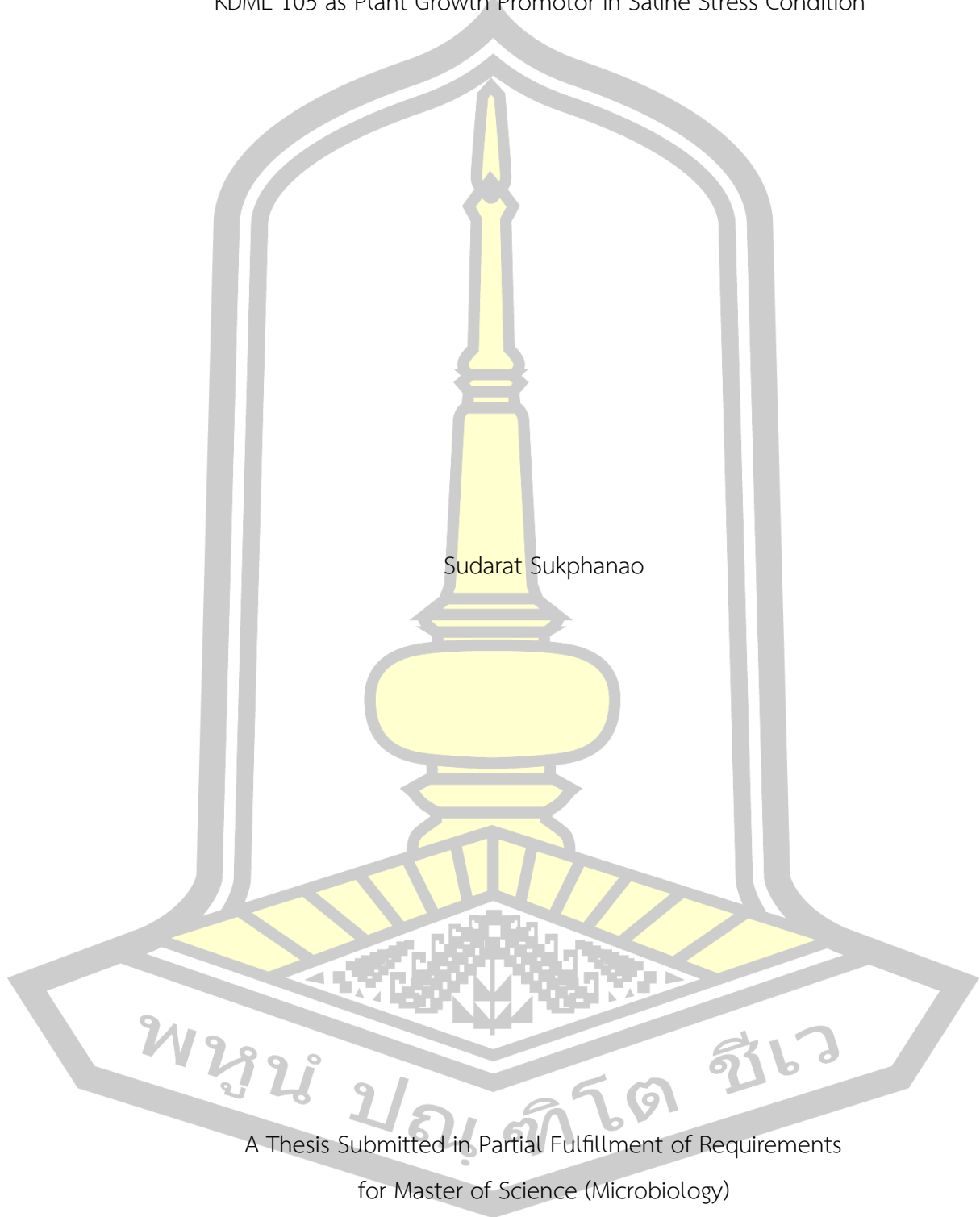
การประยุกต์ใช้เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ
105 ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือ



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ธันวาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Application of Endophytic Actinobacteria isolated from Jasmine rice (*Oryza sativa* L.)
KDML 105 as Plant Growth Promotor in Saline Stress Condition



Sudarat Sukphanao

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Microbiology)

December 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวสุภารัตน์ สุขพเนา
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. นันทวัน ฤทธิ์เดช)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. อรุณา แก้วกล้า)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. สุมาลี ชูกำแพง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล)

กรรมการ

(ผศ. ดร. สุรศักดิ์ ชื่นคำ)

กรรมการ

(รศ. ดร. วราภรณ์ สุทธิสา)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

| | | | |
|------------------|---|------------|-------------|
| ชื่อเรื่อง | การประยุกต์ใช้เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือ | | |
| ผู้วิจัย | ศุภรัตน์ สุขพนา | | |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร. อรรอุมา แก้วกล้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี ชูกำแพง ดร. ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล | | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต | สาขาวิชา | จุลชีววิทยา |
| มหาวิทยาลัย | มหาวิทยาลัยมหาสารคาม | ปีที่พิมพ์ | 2567 |

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อของข้าวขาวดอกมะลิ ที่ปลูกในอำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม และศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคข้าว และการศึกษาการส่งเสริมการเจริญให้กับข้าวในสภาวะเครียดเกลือ ทำการศึกษาแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลท การจำแนกโดยใช้ข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* (66, 90.4%), *Microbispora* (4, 5.5%), *Micromonospora* (1, 1.4%), *Actinoplanes* (1, 1.4%) และสกุลที่หายาก คือ *Quadrisphaera* (1, 1.4%) เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในข้าว ได้แก่ *Xanthomonas oryzae* PXO71 และ *Pyricularia oryzae* 21009 พบว่ามีจำนวน 18 และ 3 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรครดงกล่าวได้ในระดับดี คัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท มาศึกษาการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง พบว่ามีจำนวนไอโซเลทที่มีความสามารถละลายฟอสเฟต การผลิตเซลลูเลส และการผลิต 1-aminocyclopropane (ACC) deaminase จำนวน 15 (75%), 11 (55%) และ 6 (30%) ไอโซเลท ตามลำดับ และทุกไอโซเลทสามารถผลิต indole-3-acetic acid (IAA) อยู่ในช่วง 9 ถึง 271 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือ และ polyethylene glycol (PEG) ที่แตกต่างกัน พบว่าจำนวน 12 ไอโซเลท (60%) เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 20 ไอโซเลท (100%) สามารถเจริญที่ 20 เปอร์เซ็นต์ PEG ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Streptomyces* RD12 และ RD28 นำไปศึกษาความสามารถในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว พบว่าทั้งสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การทดสอบเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท RD12 และ RD28 พบว่า ที่ความ

เข้มข้นของเกลือ 100 mM ไอโซเลท RD12 มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยจะให้ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในสภาวะเครียดเกลือกรรมวิธีที่มีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจะมีการผลิตคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ ที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปริมาณโพรงมีค่ามากกว่ากรรมวิธีที่ควบคุม ($p < 0.05$) และค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ลดลงมากกว่ากรรมวิธีควบคุม ($p < 0.05$) และจากงานวิจัยนี้พบว่าเนื้อเยื่อข้าวเป็นแหล่งของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียชนิดใหม่จำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งทำการจำแนกโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy คือ สกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T โดยตั้งชื่อว่า *Streptomyces mahasarakhamensis* sp. nov. สกุล *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 โดยตั้งชื่อว่า *Actinoplanes oryza* sp. nov. และสกุล *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 โดยตั้งชื่อว่า *Quadrisphaera endophytica* sp. nov. และจากการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์และการทำนายยีนพบกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมียีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ส่งเสริมการเจริญให้กับพืช และเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม โดยสรุป เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อเพิ่มผลผลิตให้กับข้าวเจ้าหอมมะลิในสภาวะเครียดเกลือได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าว, สภาวะเครียดเกลือ, เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย, แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, การทำนายยีน

พจนัน ปณฺ ทิโต ชีเว

| | | | |
|-------------------|--|--------------|--------------|
| TITLE | Application of Endophytic Actinobacteria isolated from Jasmine rice (<i>Oryza sativa</i> L.) KDML 105 as Plant Growth Promotor in Saline Stress Condition | | |
| AUTHOR | Sudarat Sukphanao | | |
| ADVISORS | Associate Professor Onuma Kaewkla , Ph.D. Assistant Professor Sumalee Chookhampaeng , Ph.D. Chanwit Suriyachadkun , Ph.D. | | |
| DEGREE | Master of Science | MAJOR | Microbiology |
| UNIVERSITY | Maharakham University | YEAR | 2024 |

ABSTRACT

Rice is an important economic crop in Thailand. This research aimed to identify endophytic actinobacteria isolated from Jasmine rice tissues grown in Kantharawichai District, Maha Sarakham Province, and to study their inhibition against rice pathogens, as well as their plant growth promotion in rice under salt stress condition. A total of seventy-three actinobacteria were studied. The classification using morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence revealed that most isolates belonged to the genus *Streptomyces* (66, 90.4%), with the rest belonging to *Microbispora* (4, 5.5%), *Micromonospora* (1, 1.4%), *Actinoplanes* (1, 1.4%), and the rare genus *Quadrisphaera* (1, 1.4%). They were tested for their inhibition against rice pathogenic bacteria and fungi, *Xanthomonas oryzae* PXO71 and *Pyricularia oryzae* 21009, 18 and 3 isolates showing good inhibition against these pathogens by a dual culture technique, respectively. Twenty isolates were selected for plant growth promoting properties (PGPP) *in vitro*. It was found that 15 (75%), 11 (55%) and 6 (30%) isolates had the ability to solubilize phosphate, produce cellulase and produce 1-aminocyclopropane (ACC) deaminase, respectively. All isolates could produce indole-3-acetic acid (IAA) ranging from 9 to 271 µg/ml. Growth studies at different salt and polyethylene glycol (PEG) concentrations on agar plates revealed that 12 isolates (60%) grew at 10% NaCl (w/v) and 20 isolates (100%) grew at 20%

PEG (w/v). Two effective isolates, *Streptomyces* RD12 and RD28, were selected for studying their ability to control rice leaf blight disease *in vivo*. Both isolates were found to be effective in controlling this disease, with a percentage of disease incidence significantly lower than the control treatment ($p < 0.05$). The test of isolates RD12 and RD28 at a salt concentration of 100 mM showed that isolate RD12 was the most effective, giving significantly higher stem length, stem fresh and dry weight, and root dry weight than the control treatment ($p < 0.05$). Under salt stress, the treatment with endophytic actinobacteria produced higher chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids than the control treatment, but not significantly different ($p > 0.05$). However, the proline content was significantly higher than the control treatment ($p < 0.05$), and the electrolyte leakage value was significantly lower than the control treatment ($p < 0.05$). This research found that rice tissue is a source of novel actinobacteria which were identified using a polyphasic taxonomy. There were three novel species; *Streptomyces* strain MK5^T, named *Streptomyces mahasarakhamensis* sp. nov., *Actinoplanes* strain RD1, named *Actinoplanes oryza* sp. nov. and *Quadrisphaera* strain KR29, named *Quadrisphaera endophytica* sp. nov. Furthermore, the study of biosynthetic genes clusters and gene prediction showed that groups of genes relating to the production of antibiotics, bioactive compounds, and genes encoding proteins that promote plant growth and enzymes used in industry were found. In conclusion, endophytic actinobacteria from this study had the potential to be applied as rice inoculum to increase rice yield in salt stress condition in the future.

Keyword : Rice, Saline Stress Condition, Endophytic Actinobacteria, plant growth promoting bacteria, Genome mining

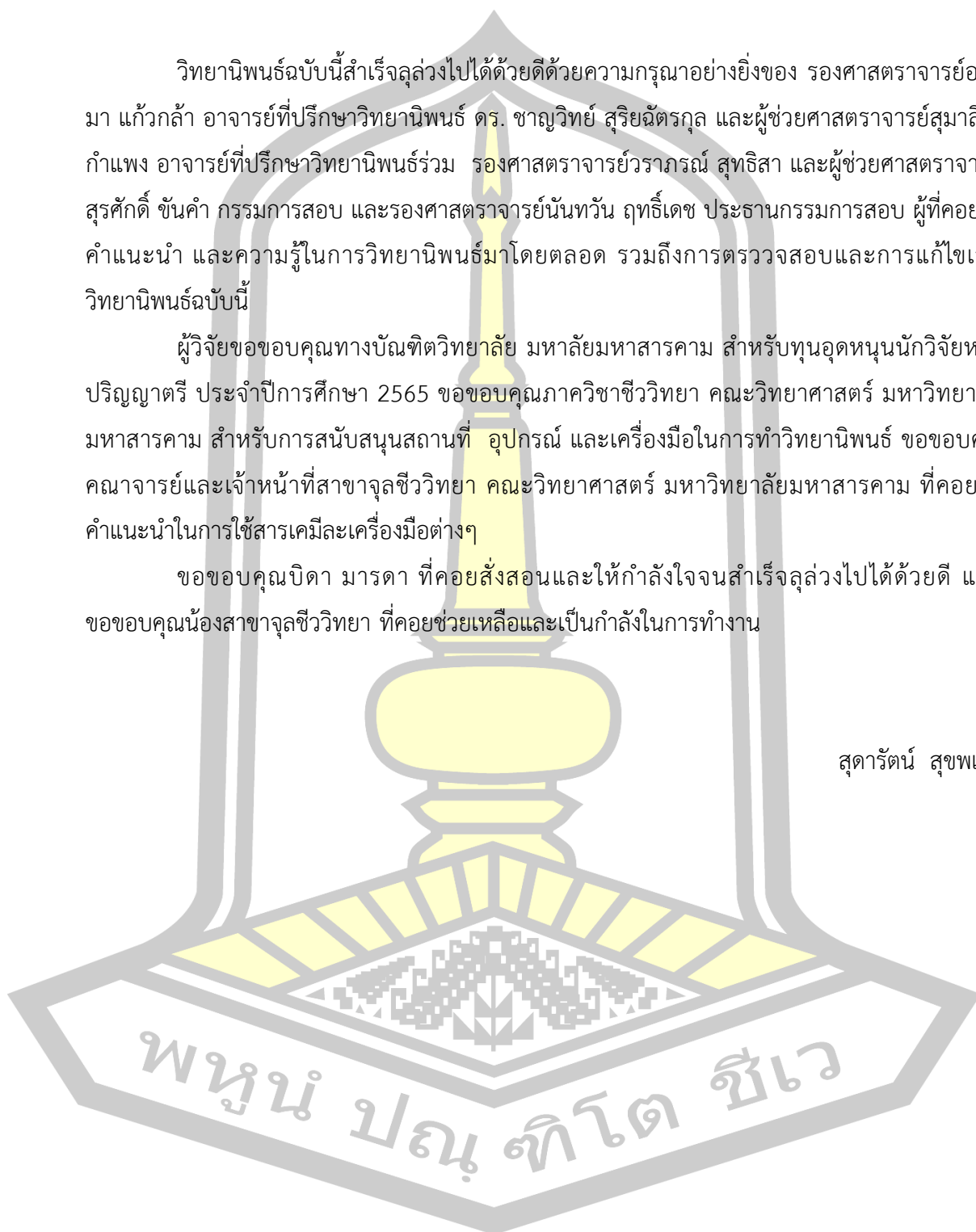
กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์อรอุมา แก้วกล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุมาลี ชูกำแพง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์วราภรณ์ สุทธิสา และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรศักดิ์ ชันคำ กรรมการสอบ และรองศาสตราจารย์นันทวัน ฤทธิ์เดช ประธานกรรมการสอบ ผู้ที่คอยให้คำแนะนำ และความรู้ในการวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด รวมถึงการตรวจสอบและการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณทางบัณฑิตวิทยาลัย มหาลัยมหาสารคาม สำหรับทุนอุดหนุนนักวิจัยหลังปริญญาตรี ประจำปีการศึกษา 2565 ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่คอยให้คำแนะนำในการใช้สารเคมีและเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่คอยสั่งสอนและให้กำลังใจจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณน้องสาขาจุลชีววิทยา ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังในการทำงาน

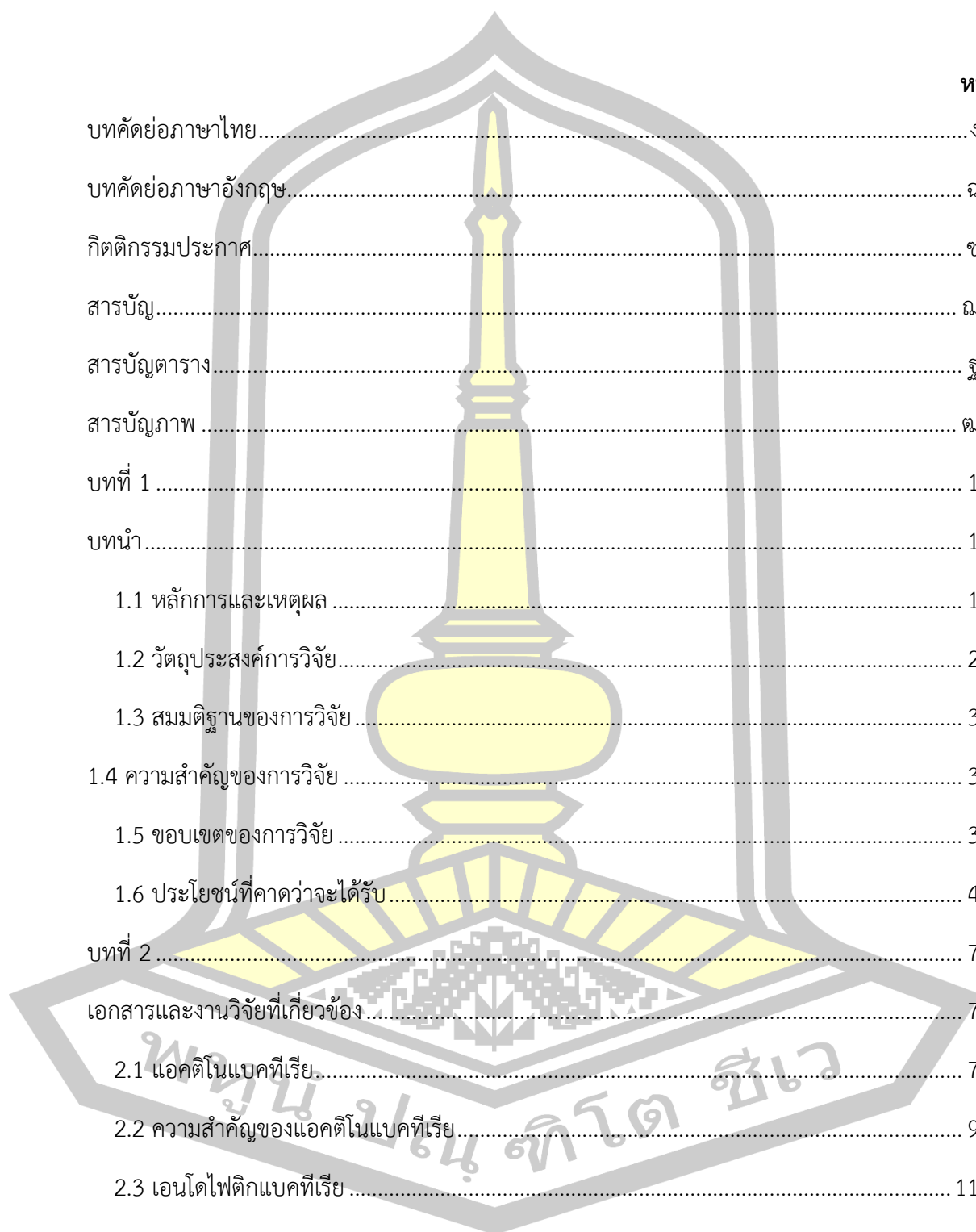
สุดารัตน์ สุขพนา



สารบัญ

หน้า

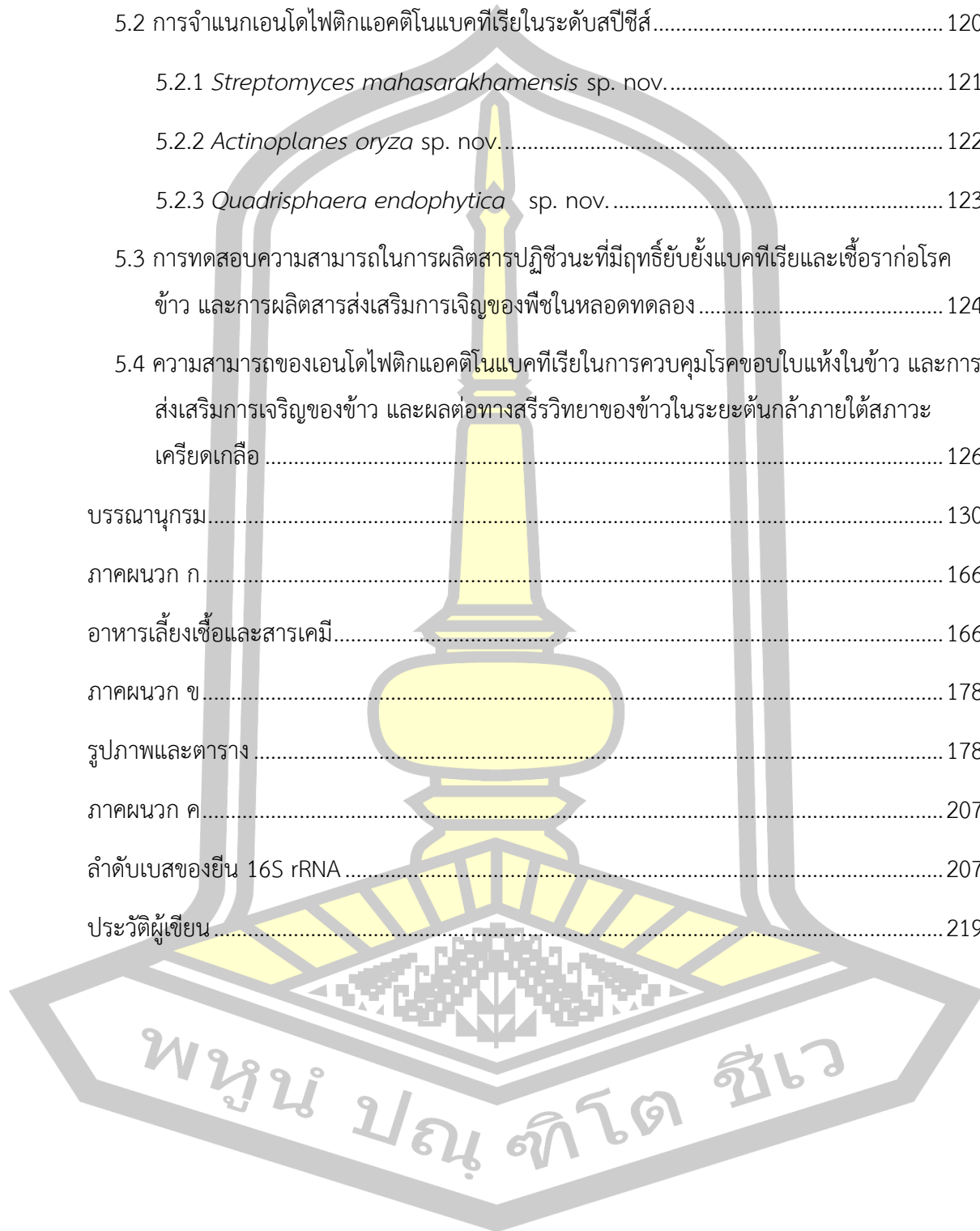
| | |
|---------------------------------------|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ฉ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ช |
| สารบัญ..... | ณ |
| สารบัญตาราง..... | ฐ |
| สารบัญภาพ..... | ฒ |
| บทที่ 1..... | 1 |
| บทนำ..... | 1 |
| 1.1 หลักการและเหตุผล..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย..... | 2 |
| 1.3 สมมติฐานของการวิจัย..... | 3 |
| 1.4 ความสำคัญของการวิจัย..... | 3 |
| 1.5 ขอบเขตของการวิจัย..... | 3 |
| 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| บทที่ 2..... | 7 |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 7 |
| 2.1 แอคติโนแบคทีเรีย..... | 7 |
| 2.2 ความสำคัญของแอคติโนแบคทีเรีย..... | 9 |
| 2.3 เอนโดไฟติกแบคทีเรีย..... | 11 |
| 2.4 ข้าวหอมมะลิ..... | 11 |
| 2.5 โรคที่สำคัญในข้าว..... | 12 |



| | |
|--|----|
| 2.6 สภาวะเครียดเกลือ..... | 13 |
| 2.7 กลไกของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของธัญพืชภายใต้สภาวะเครียดเกลือ | 16 |
| 2.8 การจำแนกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย | 20 |
| 2.9 การจำแนกแอคติโนแบคทีเรียโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy..... | 21 |
| 2.10 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมด (whole genome sequence)..... | 24 |
| 2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 28 |
| บทที่ 3 | 31 |
| วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... | 31 |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อจุลินทรีย์..... | 31 |
| 3.1.1 วัสดุอุปกรณ์..... | 31 |
| 3.1.2 เครื่องมือ | 32 |
| 3.1.3 สารเคมี..... | 33 |
| 3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก) | 35 |
| 3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์..... | 36 |
| 3.2 วิธีการทดลอง..... | 36 |
| 3.2.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุล..... | 36 |
| 3.2.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ | 39 |
| 3.2.3 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคข้าว | 46 |
| 3.2.4 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | 48 |
| 3.2.5 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะต้นกล้า..... | 49 |
| 3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ..... | 53 |
| บทที่ 4 | 54 |

| | |
|--|-----|
| ผลการทดลอง | 54 |
| 4.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล | 54 |
| 4.1.1 ผลการจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น | 54 |
| 4.1.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลยีน 16S rRNA | 61 |
| 4.1.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA..... | 63 |
| 4.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์..... | 69 |
| 4.2.1 <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7..... | 69 |
| 72 | |
| 4.2.2 <i>Actinoplanes</i> สายพันธุ์ RD1 | 83 |
| 4.2.3 <i>Quadrisphaera</i> สายพันธุ์ KR29 | 96 |
| 4.3 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคข้าว และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | 107 |
| 4.3.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว | 107 |
| 4.3.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคข้าว..... | 107 |
| 4.3.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | 108 |
| 4.4 ความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะต้นกล้า | 111 |
| 4.4.1 ผลการศึกษาการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวในระยะต้นกล้า..... | 111 |
| 4.4.2 การศึกษาเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในระยะต้นกล้า | 113 |
| 4.4.3 การศึกษาเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะเครียดเกลือ | 114 |
| บทที่ 5 | 120 |
| สรุป และอภิปรายผลการทดลอง..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| 5.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล | 120 |
| 5.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์..... | 120 |
| 5.2.1 <i>Streptomyces mahasarakhamensis</i> sp. nov..... | 121 |
| 5.2.2 <i>Actinoplanes oryza</i> sp. nov..... | 122 |
| 5.2.3 <i>Quadrisphaera endophytica</i> sp. nov..... | 123 |
| 5.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค ข้าว และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | 124 |
| 5.4 ความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าว และการ ส่งเสริมการเจริญของข้าว และผลต่อทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะ เครียดเกลือ | 126 |
| บรรณานุกรม..... | 130 |
| ภาคผนวก ก..... | 166 |
| อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... | 166 |
| ภาคผนวก ข..... | 178 |
| รูปภาพและตาราง | 178 |
| ภาคผนวก ค..... | 207 |
| ลำดับเบสของยีน 16S rRNA..... | 207 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 219 |



สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย | 5 |
| ตารางที่ 2 การตอบสนองของพืชที่ระดับความเค็มของดินต่าง ๆ (มนตรี ผลสินธ์ และคณะ, 2565) 15 | 15 |
| ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนแบคทีเรีย | 25 |
| ตารางที่ 4 ชนิดของ polar lipid..... | 26 |
| ตารางที่ 5 ลำดับเบสของ oligonucleotide primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR | 37 |
| ตารางที่ 6 ลักษณะสัณฐานของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลานาน 14 วัน | 58 |
| ตารางที่ 7 ผลการจำแนกตามลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย..... | 60 |
| ตารางที่ 8 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงจำนวน 3 สายพันธุ์ | 64 |
| ตารางที่ 9 ลักษณะการเจริญของ <i>Streptomyces mahasarakhamensis</i> MK5 ^T และ <i>Streptomyces mahasarakhamensis</i> MK7 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน..... | 75 |
| ตารางที่ 10 ลักษณะทางสรีรวิทยาของ <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7..... | 76 |
| ตารางที่ 11 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของสายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7 และสายพันธุ์มาตรฐาน | 78 |
| ตารางที่ 12 ปริมาณของกรดไขมัน (%) ของ <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7 | 79 |
| ตารางที่ 13 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของ <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7 โดยการวิเคราะห์ด้วย “antiSMASH” | 81 |
| ตารางที่ 14 ลักษณะโคไลนของ <i>Actinoplanes</i> สายพันธุ์ RD1 ที่เจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน 8 ชนิด | 90 |
| ตารางที่ 15 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ <i>Actinoplanes</i> สายพันธุ์ RD1 | 91 |
| ตารางที่ 16 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของสายพันธุ์ RD1 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกัน จำนวน 5 สายพันธุ์..... | 93 |

| | |
|--|-----|
| ตารางที่ 17 ชนิดของกรดไขมันภายในเซลล์ <i>Actinoplanes</i> RD1..... | 94 |
| ตารางที่ 18 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสายพันธุ์ RD1 โดยการวิเคราะห์ด้วย “antiSMASH” | 96 |
| ตารางที่ 19 ลักษณะการเจริญของเชื้อ <i>Quadrisphaera</i> สายพันธุ์ KR29 บนอาหาร 8 ชนิด | 101 |
| ตารางที่ 20 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ <i>Quadrisphaera</i> สายพันธุ์ KR29..... | 102 |
| ตารางที่ 21 ผลแสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาของ <i>Quadrisphaera</i> สายพันธุ์ KR29 ที่ แตกต่างกันสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์..... | 103 |
| ตารางที่ 22 ชนิดกรดไขมันภายในเซลล์ <i>Quadrisphaera</i> สายพันธุ์ KR29..... | 105 |
| ตารางที่ 23 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคข้าวบนจานอาหาร | 108 |
| ตารางที่ 24 ผลการทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท ใน การผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | 110 |
| ตารางที่ 25 การวัดการเจริญของข้าวในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มีเชื้อแอคติโนแบคทีเรียใน สภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM | 117 |
| ตารางที่ 26 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ โพรตีน และการรั่วไหลของอิเล็กโทร ไลต์ของกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มี..... | 119 |



สารบัญภาพ

หน้า

| | |
|---|----|
| ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP2, ISP3 และ ISP4 ของ <i>Gordonia</i> sp. สายพันธุ์ 25, <i>Micromonospora</i> sp. สายพันธุ์ 102N และ <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ 182..... | 8 |
| ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้แสดง Families ต่างๆ ที่อยู่ใน Class Actinobacteria | 20 |
| ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท MK3, MK32, RD12 และ RD14 จัดอยู่ในกลุ่ม <i>Streptomyces</i> ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลา 14 วัน..... | 55 |
| ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย <i>Micromonospora</i> sp. RD19 <i>Micromonospora</i> sp. KR2 และ <i>Microbispora</i> sp. KR ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลา 14 วัน | 56 |
| ภาพที่ 5 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า..... | 57 |
| ภาพที่ 6 แผนภูมิวงกลมแสดงความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างข้าวมะลิจำนวน 5 สกุล..... | 62 |
| ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ <i>Streptomyces</i> จำนวน 14 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกันโดยมี <i>Embleya scabrisporus</i> DSM 41855 ^T เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ..... | 67 |
| ภาพที่ 8 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ non- <i>Streptomyces</i> จำนวน 6 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกัน เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ..... | 68 |
| ภาพที่ 9 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7 และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกัน <i>Embleya scabrisporus</i> DSM 41855 ^T เป็น out group เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ (* คือ ตำแหน่งที่เหมือนกันของ ML และ NJ trees) | 72 |
| ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ MK5 ^T และ MK7 และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกัน ในสกุล <i>Streptomyces</i> และ <i>Embleya scabrispora</i> DSM41855 ^T เป็น out group ค่า GBDP pseudo-bootstrap support > 60 เปอร์เซ็นต์ จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ..... | 73 |

ภาพที่ 11 ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T (ก) และ MK7 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เจริญบนอาหาร HPDA นาน 7 วัน..... 74

ภาพที่ 12 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML (1396 bp) แสดงตำแหน่งของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ..... 84

ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย maximum likelihood (ML) โดยใช้ codon tree option ที่อยู่ในฐานข้อมูล PATRIC แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ RD1 *Actinoplanes* และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group..... 87

ภาพที่ 14 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS strain RD1 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ RD1^T และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group..... 88

ภาพที่ 15 ลักษณะสปอร์แบบถูกเป็นท่อยาวของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เลี้ยงบนอาหาร HPDA เวลา 21 วัน (ลูกศรสีแดง แสดงสปอร์ที่อยู่ในถุง). 89

ภาพที่ 16 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML (1474 bp) แสดงตำแหน่งของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Quadrisphaera* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Kineosporaceae* โดยมี *Propionibacterium australiense* LCDC-98A072^T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ..... 98

ภาพที่ 17 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS แสดงตำแหน่งของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Quadrisphaera* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Kineosporaceae* 99

ภาพที่ 18 ลักษณะสปอร์ของ *Quadrisphaera* KR29 ที่เจริญบนอาหาร Half potato dextrose agar เวลา 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... 100

ภาพที่ 19 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบข้าวที่มีสาเหตุจาก *X. oryzae* PXO71 ในกรรมวิธีควบคุม และมีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์ 112

| | |
|---|-----|
| ภาพที่ 20 การเจริญของข้าวและรอยโรคของใบข้าวจากโรคขอบใบแห้งที่ทดสอบโดยวิธี clipping method | 112 |
| ภาพที่ 21 ลักษณะการเจริญของข้าวในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM | 114 |
| ภาพที่ 22 กราฟแสดงการวัดการเจริญของข้าวในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มีแอสคิตินแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM | 116 |
| ภาพที่ 23 กราฟแสดงปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ โพรตีน และการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ของในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มีแอสคิตินแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM..... | 118 |



บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

เอนโดไฟติกแบคทีเรีย (endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แต่ไม่ก่อให้เกิดโทษแก่เซลล์เจ้าบ้าน (host) เอนโดไฟติกแบคทีเรียสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ที่มีกิจกรรมทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เสริมภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อก่อโรค และผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคและแมลงศัตรูพืช จุลินทรีย์เหล่านี้อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กับเซลล์พืชที่ต่างกัน ส่งผลให้มีการผลิตสารเมแทบอลิต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งช่วยในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่าง ๆ เช่น ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberilin) และไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นต้น (Duan et al., 2013) ในส่วนของแอกติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีปริมาณของเบสควินิน (guanine) และไซโตซิน (cytosine) ในดีเอ็นเอสูง มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา คือ มีการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ ส่งผลให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายซึ่งมีความสำคัญต่อทางการแพทย์ เช่น ยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารยับยั้งเซลล์มะเร็งและเนื้องอก สารกตุภูมิคุ้มกัน และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น โดยมีการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 22,000 ชนิด ซึ่ง 50 เปอร์เซ็นต์ผลิตได้จากแอกติโนแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะประมาณ 160 ชนิดถูกใช้ในทางเภสัชกรรมและทางการแพทย์ นอกจากนี้แอกติโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดที่เกิดจากความแห้งแล้ง ความเค็ม และโลหะหนัก เป็นต้น (Singh & Dubey, 2018) มีรายงานการใช้แอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและธัญพืชในสภาวะเครียดเกลือ โดยมีกลไกการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการผลิตฮอร์โมนออกซิน เป็นต้น รวมทั้งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคที่สำคัญในข้าวได้ด้วยเช่นกัน (Sathya et al., 2017)

พันธุ์ พันธุ์ กิโต ชีเว

ข้าวเจ้าพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. KDML 105) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นสินค้าส่งออกทางการเกษตรที่สำคัญ ซึ่งมีการปลูกมากกว่าพืชชนิดอื่น ๆ คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 11.3 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ทั่วประเทศ ซึ่งภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ทำนามากที่สุด อย่างไรก็ตามปัญหาเรื่องการจัดการศัตรูพืชและผลผลิตที่ต่ำ ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิเป็นข้าวนาปี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงอย่างมาก คือ โรคไหม้ (blast) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และปัญหาของดินเค็มในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นปัญหาสำคัญในการทำการเกษตร โดยเฉพาะในเขตจังหวัดมหาสารคาม และกาฬสินธุ์ที่มีการกระจายตัวของดินเค็มเป็นบริเวณกว้าง ทำให้บางพื้นที่ ๆ มีดินเค็มมากไม่สามารถทำการเพาะปลูกได้จากปัญหาดินเค็มส่งผลให้ผลผลิตของข้าวที่ได้ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามเกษตรกรส่วนใหญ่ในพื้นที่ยังคงปลูกข้าวนาปี โดยเฉพาะข้าวเจ้าหอมมะลิเป็นประจำทุกปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระดับสกุลโดยใช้ข้อมูลของยีน 16S rRNA ทำการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว คือ การผลิตฮอร์โมนออกซิน การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน และการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการสร้างสารปฏิชีวนะของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่ยังเชื้อแบคทีเรียทดสอบ คือ *Xanthomonas oryzae* PXO71 และเชื้อรา *Pyricularia oryzae* 21009 ในงานทดสอบ การทดสอบความสามารถของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในพืชทดสอบ และทำการจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ซึ่งประโยชน์ของงานวิจัยนี้สามารถนำแอกติโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อเคลือบเมล็ดข้าวก่อนปลูก ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มผลผลิตข้าวในดินในสภาวะเครียดเกลือ อันจะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตข้าวได้อย่างยั่งยืนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 จำแนกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในระดับสกุลโดยใช้ข้อมูลของยีน 16S rRNA
- 1.2.2 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคข้าวในงานทดสอบด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture methods)
- 1.2.3 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในหลอดทดลอง

1.2.4 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคข้าว และการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในระดับกระถาง

1.2.5 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 ความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่อยู่ในข้าวมีความแตกต่างกัน

1.3.2 เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในพืชทดสอบในสภาวะเครียดเกลือ

1.3.3 เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคข้าวแตกต่างกัน

1.3.4 เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อข้าว เป็นแหล่งของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย สปีชีส์ใหม่

1.4 ความสำคัญของการวิจัย

1.4.1 สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียในต้นข้าวในระดับสกุล

1.4.2 เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรค และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวที่ทดสอบในสภาวะเครียดเกลือสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมได้ในอนาคต

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียทั้งหมดในระดับสกุล โดยใช้ข้อมูลทางสัญญาณวิทยาและลำดับเบสของยีน 16S rRNA

1.5.2 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว คือ เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 21009 โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) โดยดัดแปลงงานวิจัยของ Coombs and Franco (2003) และแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง *Xanthomonas oryzae* PXO 71 ในงานทดสอบด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture methods) โดยดัดแปลงงานวิจัยของ Kampaphongsa and Kaewkla (2016)

1.5.3 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในหลอดทดลอง คือ การผลิตฮอร์โมนออกซิน การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน และการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การทนเกลือ และ polyethylene glycol (PEG)

1.5.4 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในข้าว และส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในต้นข้าวทดสอบ

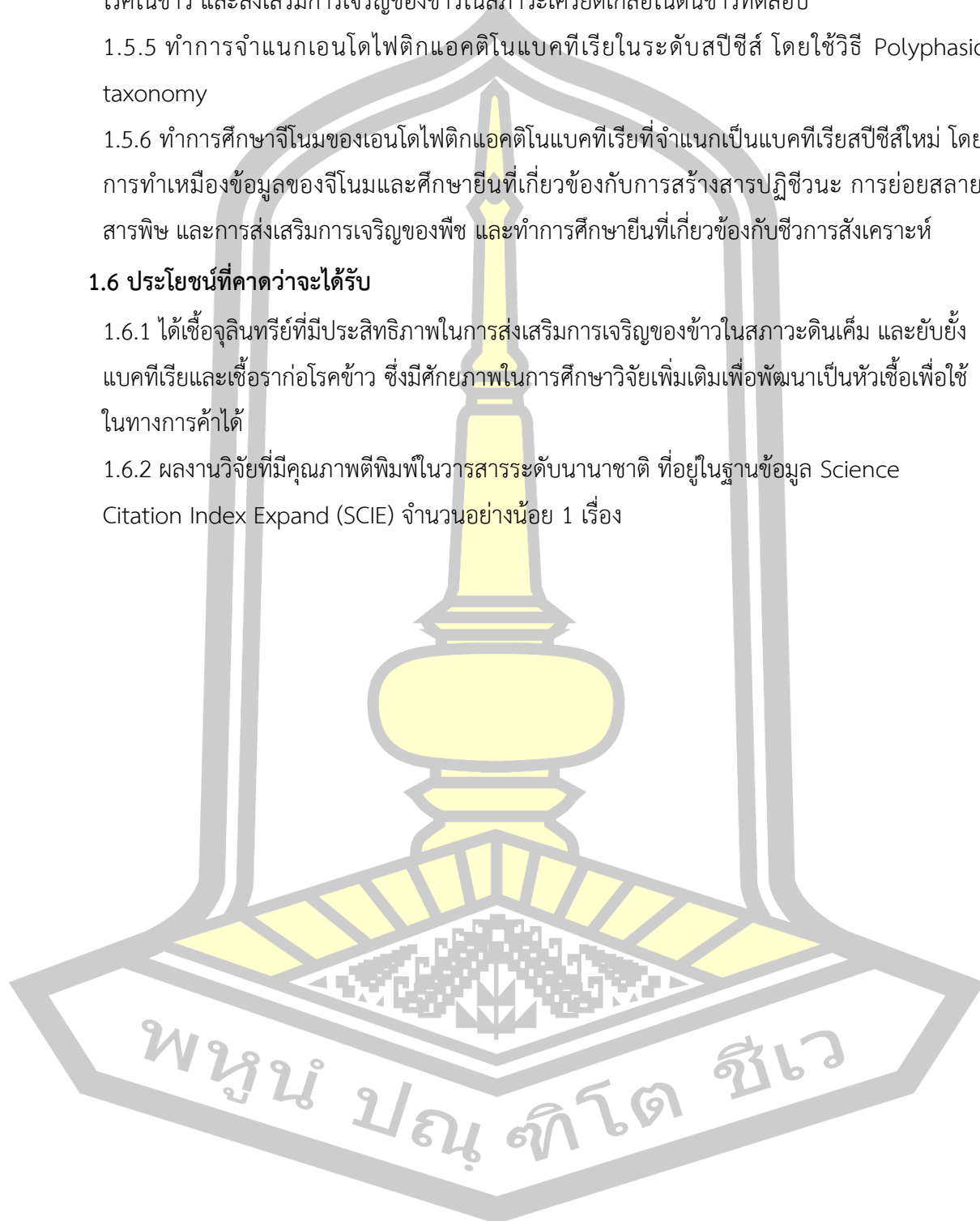
1.5.5 ทำการจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดยใช้วิธี Polyphasic taxonomy

1.5.6 ทำการศึกษาจีโนมของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่จำแนกเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ โดยการทำเหมืองข้อมูลของจีโนมและศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะ การย่อยสลายสารพิษ และการส่งเสริมการเจริญของพืช และทำการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับชีวการสังเคราะห์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะดินเค็ม และยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคข้าว ซึ่งมีศักยภาพในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในทางการค้าได้

1.6.2 ผลงานวิจัยที่มีคุณภาพตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ที่อยู่ในฐานข้อมูล Science Citation Index Expand (SCIE) จำนวนอย่างน้อย 1 เรื่อง



1.7 ระยะเวลาการทำวิจัย

ตารางที่ 1 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

| | พ.ศ.2565 | พ.ศ.2566 |
|---|--|----------|
| ขั้นตอนการดำเนินงาน | ก.ค. ส.ค. ก.ย. ต.ค. พ.ย. ธ.ค. ม.ค. ก.พ. มี.ค.-พ.ย. | |
| 1. การจำแนกเชื้อแอกติแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA | | |
| 2. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราทดสอบในงานอาหาร | | |
| 3. การศึกษาการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง | | |
| 4. การจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ | | |

ตารางที่ 1 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย (ต่อ)

| | พ.ศ.2566 | พ.ศ.2567 |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| ขั้นตอนการดำเนินงาน | ธ.ค. ม.ค. ก.พ. มี.ค. | เม.ย. พ.ค. มิ.ย. ก.ค. |
| 5. การทดสอบการควบคุมโรคขอใบ แจ้งในข่าวในระดับกลาง | → | |
| 6. การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ ข่าวในสภาวะเครียดเกิดขึ้นในระดับ กลาง | | → |
| 7. เขียนรายงาน และเตรียม manuscript | | → |

บทที่ 2

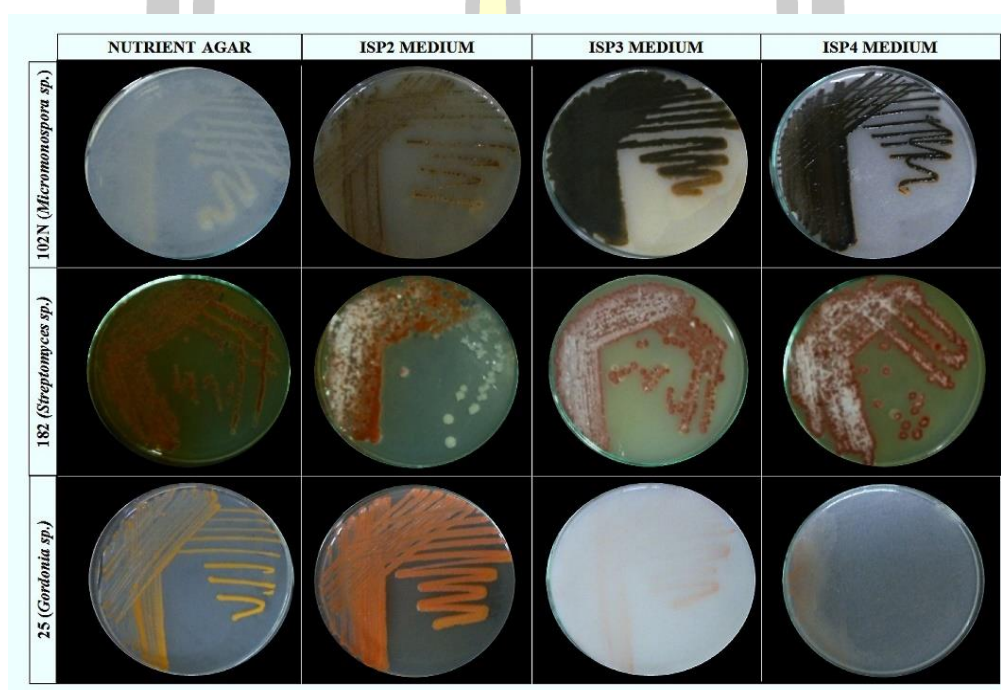
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรีย หรือแอคติโนมัยซีท (Actinobacteria or actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในไฟลัมแอคติโนมัยเซโตตา (Phylum Actinomycetota) Class Actinomycetia มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา คือ มีการเจริญเป็นเส้นใย และสร้างสปอร์ แต่ขนาดเซลล์เล็กเท่ากับแบคทีเรียมีขนาดประมาณ 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร มีปริมาณเบสกวีนีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) (G+C content) ในดีเอ็นเอสูง แอคติโนแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น ขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ ดังภาพที่ 1 (สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง, 2560) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนแบคทีเรีย คือ 25-37 องศาเซลเซียส แต่บางกลุ่มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophile) ที่ 52-65 องศาเซลเซียส พีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการเจริญ คือ ช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงเบสอ่อน (Zhi et al., 2009) แอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยที่ยึดเกาะกับซับสเตรทหรือเรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยที่ยื่นไปในอากาศหรือเรียกว่า เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งสกุล *Streptomyces* spp. สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะต่างจากเส้นใยอากาศ คือ เส้นใยอากาศมีลักษณะของเส้นใยที่บางกว่าเส้นใยอาหาร และส่วนใหญ่มีสีเข้ม ส่วนของเส้นใยอากาศมีการพัฒนาเป็นสปอร์ สปอร์ที่สร้างขึ้นใช้ในการสืบพันธุ์ ทนความร้อนและความแห้ง จึงช่วยให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี

แหล่งที่พบแอคติโนแบคทีเรียในธรรมชาติ ได้แก่ ดิน ปุ๋ยหมัก น้ำจืด และน้ำเค็ม โคลนตม และเนื้อเยื่อพืช บริเวณดินรอบรากพืช เป็นต้น โดยจะเรียกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่พบในเนื้อเยื่อของพืชว่า เอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรีย (Endophytic Actinobacteria) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์ และส่วนประกอบของเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เช่น เซลลูโลส (cellulose) ไซแลน (xylan) เพคติน (pectin) และไคติน (chitin) จึงมีส่วนสำคัญในการหมุนเวียนสารอินทรีย์ และวัฏจักรของสารที่สำคัญในสิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่กลุ่มแอคติโนแบคทีเรียมีถิ่นอาศัยในดิน และมักพบในปุ๋ยหมัก และบริเวณรากพืช และส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นสกุลที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมาก ในดินมักจะพบเชื้อ *Streptomyces* เป็นจำนวนมากประมาณ 70-95 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด เนื่องจากแอคติโนแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ มีปริมาณน้อยและเจริญได้ช้ากว่าสกุล *Streptomyces* ยกตัวอย่างสกุลอื่น ๆ เช่น *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Dectylosporangium*, *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Nocardia* และ *Streptosporangium* เป็นต้น (สุจรรยา ฉายแสง, 2556; Hayakawa et al., 1988)

จากที่กล่าวมาแอคติโนแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการศึกษา เนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งผลิตในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะช่วงท้ายของการเจริญ จัดเป็นสารที่ไม่จำเป็นต้องต่อการเจริญหรือการแพร่พันธุ์ของแอคติโนแบคทีเรีย สารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิมักมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) มีความหลากหลายของสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิที่เซลล์สร้างขึ้น และเป็นสารเมตาโบไลต์ที่มีโครงสร้างที่มีการพัฒนาที่ซับซ้อนหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และสารต้านเนื้องอก เป็นต้น (อภาพร โพธิยอด, 2557)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP2, ISP3 และ ISP4 ของ *Gordonia* sp. สายพันธุ์ 25, *Micromonospora* sp. สายพันธุ์ 102N และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 182 (Betancur et al., 2017)

พหุ ประถมศึกษา

2.2 ความสำคัญของแอคติโนแบคทีเรีย

2.2.1 การใช้เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชและศัตรูพืช

โดยทั่วไปการจัดการศัตรูพืชในการเกษตรมีการใช้ยาฆ่าแมลงหรือสารเคมีในการกำจัดสิ่งมีชีวิตที่ไม่ต้องการ และลดระดับและความเสียหายในพืช ในทางกลับกันสารเคมีที่ใช้จะส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม และสุขภาพของมนุษย์ การใช้แอคติโนแบคทีเรียจึงเป็นอีกทางเลือกที่ช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้ผลผลิตพืชอย่างปลอดภัยและยั่งยืนมากขึ้น จากรายงานระบุว่าแอคติโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการควบคุมทางชีวภาพในการจัดการศัตรูพืชทางการเกษตร เช่น แมลง ไส้เดือนฝอย เชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพืชหรือการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ (Microbial biological control agents ; MBCA) มีการศึกษาแอคติโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการเป็น MBCA โดยมีกลไกทางอ้อม คือ การกระตุ้นความต้านทานต่อการเกิดโรค (systemic acquired resistance; SAR) การชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค (induced systemic resistance ; ISR) การแข่งขันในการแย่งชิงสารอาหารและการเข้าครอบครองพื้นที่ในพืชถือเป็นกลไกทางอ้อมของ MBCA และการผลิตสารปฏิชีวนะเป็นกลไกทางตรงที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค โดยการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อศัตรูพืช โดยมีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Silva et al., 2022; Ulloa-Ogaz et al., 2015)

การประยุกต์ใช้แอคติโนแบคทีเรียในการกำจัดแมลงศัตรูพืช มีรายงานว่า *Streptomyces tendae* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มแมโครไลด์ (macrolide) ยับยั้งการลอกคราบของแมลง และสร้างสารนิโคมัยซิน (nikkomycin) ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินของแมลง (Muller et al., 1981) ในด้านของการกำจัดเชื้อราก่อโรค มีรายงานการนำ *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากพืชสามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของพริก (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และ ชนิดาภา นวะพิฒ, 2555)

Streptomyces sp. เป็นเชื้อที่มีประโยชน์ทางด้านเกษตร มีรายงานการใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Zarandi et al. (2009) รายงานว่า เมื่อนำสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าว คือ *Pyricularia grisea* มาผสมกับสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces sindeneusis* ฉีดพ่นใบต้นกล้าข้าว ทำให้ต้นกล้าเกิดอาการใบไหม้ลดลง

Sato (1983) ทำการศึกษาสาร Kasugamycin (KSM) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่ผลิตจาก *Streptomyces kasugaensis* ใช้ในการควบคุมราที่ก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวที่เกิด

จากเชื้อ *Pyricularia oryzae* และมีการใช้ผสมกับคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์เพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรียหลายชนิด

Jizba et al. (1991) ศึกษาสารกลุ่ม Macrotetrolides ที่แยกได้จาก *Streptomyces globisporus* เช่น nonactin, monactin, dinactin และ trinactin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งตัวอ่อนของด้วงมันฝรั่งโคโลราโด (*Leptinotarsa decemlineata*) ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่ร้ายแรงของมันฝรั่ง มะเขือเทศ และมะเขือยาว

Boukaew et al. (2011) รายงานว่า *Streptomyces philanthi* สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของโรครากและโคนเน่าได้ มีการใช้ *S. philanthi* และ *Streptomyces mycarofaciens* ในการลดโรคเหี่ยวเฉียวของพริกใต้ เนื่องจากการสร้างสารทุติยภูมิและเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส (cellulase) และไคตินเนส(chitinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อรา และยังพบว่าสามารถผลิตฮอร์โมน Indole-3-acetic acid (IAA) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.2 ด้านการแพทย์

แอคติโนแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัว รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ สารยับยั้งมะเร็ง สารต้านเบาหวาน และสารกดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่แยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย เช่น สาร *Streptophenazine* I ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC21835 เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus cereus* สาร samroyotmycins A และ B ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC33756 เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 สายพันธุ์ที่ดื้อยา และสาร urdamycinone E, urdamycinone G และ dehydro-xyaquayamycin ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC45596 เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียและวัณโรค คือ *Plasmodium falciparum* K1 และ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นต้น (ภรณ์ ศรีปริชาศักดิ์ และ อนันต์ อธิพรชัย, 2561)

2.2.3 ด้านของอุตสาหกรรม

แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีความสำคัญ ทางอุตสาหกรรม เช่น สกูลที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรม คือ *Thermomonospora* ผลิตสารในกลุ่ม exoglucanases และ endoglucanases สารเหล่านี้จะเกิดการผลิตอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังพบว่าสกูล *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส และเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน เช่น *Streptomyces flavogriseus* และ *Streptomyces ividans* นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนที่อุณหภูมิสูง

ซึ่งผลิตจากสกุล *Thermomonospora* มีการนำไปใช้ในการย่อยไขมันจากซังข้าวโพด และมีรายงานการนำ *Thermomonospora* sp. HJ4 ไปใช้ในย่อยกากมันสำปะหลังที่เป็นผลพลอยได้จาก การผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำและเพิ่มการละลาย น้ำของเส้นใย และสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อกระดาษ (Lopak et al., 2020)

2.3 เอนโดไฟติกแบคทีเรีย

เอนโดไฟติกแบคทีเรียหรือแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ อาศัยในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำอันตรายหรือส่งผลเสียต่อพืชนั้น สามารถพบได้ทุกส่วนของพืชทุกวงศ์ ซึ่ง เอนโดไฟท์ เป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา การอยู่ร่วมกันของเอนโดไฟท์ และต้นพืชจะช่วยให้ทั้งพืช และเอนโดไฟท์ได้ประโยชน์ร่วมกัน โดยพืชให้สารอาหารกับเอนโดไฟท์ใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเอน โดไฟท์ช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุและอาหาร ช่วยในการเจริญเติบโต และทำให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีขึ้น (Martinez-Klimov et al., 2017) โดย เอนโดไฟท์บางชนิดสามารถสร้างสารสำคัญซึ่งเรียกว่าสารทุติยภูมิ เป็นสารที่สามารถนำมาใช้ในทาง เกษษกรรม การแพทย์รวมทั้งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ตัวอย่างสารที่เอนโดไฟท์สร้างขึ้นได้และมี ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ แพคลิแทกเซล (paclitaxel) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่เป็นที่รู้จัก สารต้าน อนุมูลอิสระ สารกดภูมิคุ้มกัน สารที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด สารต้านไวรัส รา และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Sun et al., 2014; Jia et al., 2016; Martinez-Klimova et al., 2017) จึงทำให้เอนโด ไฟท์เป็นแหล่งสำคัญทางธรรมชาติที่นักวิจัยให้ความสนใจในค้นหาสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ รวมทั้งสารที่มี ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Porras- Alfaro & Bayman, 2011; Mousa & Raizada, 2013)

2.4 ข้าวหอมมะลิ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก เป็นอาหารหลักของชาวเอเชีย แอฟริกา และอเมริกา ใต้ ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญอันดับ 3 รองมาจากข้าวสาลีและข้าวโพด เป็นพืชที่สามารถเจริญได้ ในสภาพดินไร่และดินนาข้าว ซึ่งข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศไทย (บุญดิษฐ์ วรินทร์รักษ์ และ ยงยุทธ โอสภสกา 2558) ข้าวหอมมะลิหรือข้าวขาวดอกมะลิ (Jasmine rice) เป็นพันธุ์ข้าวที่มี ที่มาจากสีของข้าวที่ขาวเหมือนดอกมะลิ มีกลิ่นหอมเหมือนใบเตย ข้าวหอมมะลิมี 2 พันธุ์ ได้แก่ ข้าว ขาวดอกมะลิ 105 และ กข.15 ซึ่งข้าว กข. 15 คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่นำไปอบรังสีแกมมาทำให้ ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของข้าวหอมมะลิ เช่น เมื่อนำมาหุงต้ม มีกลิ่นหอม เมล็ดอ่อนนุ่ม ทนต่อสภาพแล้ง ทนต่อดินเปรี้ยว และดินเค็ม อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของข้าวหอมมะลิ คือ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคใบสีส้ม โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรค ไหม้ และโรคใบหิก ไม่ต้านทานแมลงบั่ว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ศูนย์การศึกษาการพัฒนากุ พานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2555) และปัญหาเรื่องความไม่เหมาะสมของดินเป็นปัญหาที่สำคัญ

ปัญหาหนึ่งต่อการปลูกข้าวในไทย ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าว ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศไทยพบปัญหาเรื่องปริมาณน้ำฝน และปัญหาเรื่องดินเค็มที่เป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลให้ผลผลิตของข้าวลดลง (Clermont–Dauphin et al., 2010)

2.5 โรคที่สำคัญในข้าว

ความเสียหายจากโรคข้าวถือเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวเพื่อการบริโภคและการส่งออก ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ โรคข้าวที่มีการระบาดรุนแรงและสร้างความเสียหายให้กับแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) และโรคไหม้ในข้าว (rice blast disease)

2.5.1 โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease; BLB)

โรคขอบใบแห้งเป็นโรคที่สำคัญของข้าว สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* มีการระบาดรุนแรงและสร้างความเสียหายให้กับแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะนาในเขตชลประทาน ซึ่งถ้าแสดงอาการรุนแรงจะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง เมล็ดลีบ คุณภาพเมล็ดไม่ได้มาตรฐานมักพบระบาดรุนแรงในระยะออกรวง ข้าวที่เป็นโรคนี้น้ำหนักผลผลิตจะลดลง 20-30 เปอร์เซ็นต์ และอาจสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรค โรคนี้เป็นได้ตั้งแต่ระยะกล้า แตกกอจนถึงออกรวงอาการเริ่มแรก จะมีลักษณะข้ำที่ขอบใบของใบล่าง จุดข้านี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็วและสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา อาการในระยะปักดำ จะแสดงหลังปักดำแล้วหนึ่งเดือนถึงเดือนครึ่ง ใบที่เป็นโรคขอบใบมีรอยขีดข้ำ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ที่แผลมีหยดน้ำสีเหลืองหรือสีครีม คล้ายยางสนกลม ๆ ขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดไปตามลม น้ำหรือฝน ซึ่งจะทำให้โรคสามารถระบาดต่อไปได้ รอยโรคจะขยายไปตามความยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปข้างในตามความกว้างของใบ ขอบแผลมีลักษณะเป็นขอบลายหยัก เมื่อนานไปจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เป็นโรค ขอบใบจะแห้ง และม้วนตามความยาว ในบางกรณีที่มีเชื้อปริมาณสูงจะเข้าทำลายทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวทั้งต้นจะเหี่ยวเฉา และตายอย่างรวดเร็วเรียกอาการของโรคนี้ว่า ครีเสก (ดารา เจตนะจิต, 2550)

2.5.2 โรคไหม้ในข้าว (rice blast disease)

เชื้อรา *Pyricularia* เป็นสาเหตุโรคไหม้ในข้าวที่สร้างความเสียหายมาก ส่งผลให้เกิดการลดลงของผลผลิตได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ และสามารถก่อโรคในหญ้ามากกว่า 50 สายพันธุ์ รวมถึงข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ตและลูกเดือย สำหรับประเทศไทยนั้นมีการระบาดของโรคมามากโดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศร้อนและมีความชื้นเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้ การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลาย

ได้ทุกส่วนของต้นข้าว ทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเฉพาะในระยะออกรวง ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง เชื้อราสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด คือ *Pyricularia oryzae* Cav. และ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. เชื้อราทั้งสองชนิดนี้ มีลักษณะอาการและขนาดโคนิเดียมที่แตกต่างกัน โดยเชื้อ *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าวและหญ้าบางชนิด ส่วนเชื้อ *P. grisea* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในหญ้าหลายชนิดและพืชอื่น ๆ ขนาดโคนิเดียมของเชื้อรา ประมาณ $20.89 - 28.14 \times 7.39 - 10.50$ ไมโครเมตร ที่แยกได้จากข้าว เชื้อนี้มีการสร้างโคนิเดียมมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน อาจเป็น pyriform หรือ obclavate ปลายยอดของโคนิเดียมมีลักษณะแหลม (tapering) มี 3 เซลล์ บางครั้งตรงผนังกัน (septate) อาจจะเว้า (constricted) เล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะใส ไม่มีสี (hyaline) พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อนี้ที่ความชื้นสูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ผลผลิตข้าวสูญเสียได้ 80 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งเชื้อราชนิดนี้มีความแปรปรวนของเชื้อมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ จึงเกิดการกลายพันธุ์ต่อสู้ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำให้ต้องใช้สารกำจัดเชื้อราในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (พัชรี สิ้นธนูวา และ ชุตติมา แก้วกระจาย, 2562)

2.6 สภาวะเครียดเกลือ

ตามรายงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization ; FAO) ในปี 2021 พื้นที่ดินที่ได้รับผลกระทบจากเกลือทั่วโลก รวมถึงดินเค็ม (saline soil) และดินโซดิก (sodic soils) อยู่ที่ 833 ล้านเฮกตาร์ พื้นที่เหล่านี้ขยายไปทั่วแอฟริกา เอเชีย ออสเตรเลีย และอเมริกา การกระจายตัวของดินเค็มและดินโซดิกตามแผนที่ดินโลกครอบคลุมพื้นที่ 397 ล้านเฮกตาร์ และ 434 ล้านเฮกตาร์ ตามลำดับ พื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากเกลือส่วนใหญ่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและกึ่งแห้งแล้ง ปัญหาดินเค็มเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อระบบการผลิตทางการเกษตรและความมั่นคงทางอาหารของหลายประเทศ (Jantaravikorn & Ongsomwang, 2022)

ในประเทศไทยมีการกระจายความเค็มพบได้ทั่วไปในพื้นที่ชายทะเล และยังพบในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเรียกกันว่าดินเค็มบก โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีหินเกลือ (salt rock) ในหน่วยหินมหาสารคาม (Mahasarakham Formation) ซึ่งถือเป็นหินต้นกำเนิดดินเค็ม ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือประกอบด้วย 20 จังหวัด โดยพบพื้นที่ดินเค็มครอบคลุม 17 จังหวัด มีเพียงจังหวัดหนองบัวลำภู อ่างนาจเจริญ และมุกดาหารเท่านั้นที่ไม่พบดินเค็ม (นิสา เหล็กสูงเนิน, 2015) ซึ่งดินเค็มเป็นดินที่มีปัญหาที่มีความสำคัญมากต่อการทำการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นดินที่มีเกลือที่ละลายได้ในสารละลายดินปริมาณมาก จนกระทบต่อการ

เจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ซึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดินเค็มครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 11.5 ล้านไร่ (บุญดิษฐ์ วรินทร์รักษ์ และ ยงยุทธ โอสภสกา, 2558)

ระดับความเค็มของดิน สามารถจำแนกได้โดยใช้ค่าความเค็มในหน่วยเดซิซีเมนต์ต่อเมตร (dS/m) โดยที่ระดับความเค็มที่แตกต่างกันนั้น จะส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืชต่างกัน อีกทั้งยังมีความเหมาะสมต่อการเพาะปลูกพืชได้ต่างชนิดกันอีกด้วย (ตารางที่ 2) ความเค็มส่งผลทำให้เกิดความเครียดในพืช ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของพืชด้วยกระบวนการออสโมซิส (osmosis) เนื่องจากในดินที่มีความเค็มสูงนั้น น้ำในรากพืชจะไหลย้อนกลับไปสู่ดิน จึงทำให้พืชขาดน้ำ และไม่สามารถดูดธาตุอาหารต่าง ๆ ในดินไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้รากไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ เกิดการไหม้ของใบและขอบใบ ยับยั้งการออกดอก ความแข็งแรงของพืชลดลงจนทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง (มนตรี ผลสินธ์ และคณะ, 2565)

สภาวะเครียดเกลือ (salt stress) หรือปัญหาดินเค็มเป็นปัญหาที่สำคัญ ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง โดยส่งผลกระทบต่อการทำงานของพืชหลายประการ เนื่องจากความเครียดเกลือ ส่งผลให้เกิดเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งก่อให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) ตามมาหลายชนิด ROS เป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไว สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ก่อให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ROS ที่สำคัญในพืช ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-), ออกซิเจนเดี่ยว (1O_2) และไฮดรอกซิลเรดิคัล ($OH\cdot$) ซึ่งผลิตขึ้นใน คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย ต่อออกซิโซม และจากแหล่งอพอพลาสต์ (apoplast) หลายแห่ง อัตราการสังเคราะห์แสงที่ลดลงเกิดจากความเค็มสูงเร่งการก่อตัวของ ROS ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อพืช เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ และทำให้พืชสร้างเอทิลีนมากขึ้น ภายใต้สภาวะเครียดเกลือสูง ยังก่อให้เกิดความเครียดออสโมติก และความเครียดไอออนิกทำให้เกิดการสะสมโซเดียมไอออนมากเกินไป และเกิดการสะสมโพแทสเซียมไอออนตามมา ความเครียดออสโมติกนำไปสู่การคายน้ำและการสะสมของเกลือในดินโดยรอบรากพืช ทำให้การยึดตัวของเซลล์และการพัฒนาตาข้างลดลง ความเครียดจากเกลือทำให้เกิดการสะสมของไอออนที่เป็นพิษ เช่น โซเดียมไนไบ ถ้าไอออนเหล่านี้มีการสะสมในปริมาณสูงจะส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงจะลดลง (Orozco-Mosqueda et al., 2020)

ตารางที่ 2 การตอบสนองของพืชที่ระดับความเค็มของดินต่าง ๆ (มนตรี ผลสินธ์ และคณะ, 2565)

| ระดับความเค็ม (Salinity EC, dS/m) | การตอบสนองของพืช | พืชที่เจริญเติบโตได้ |
|--------------------------------------|---|--|
| 0 – 2 (ไม่เค็ม) | โดยทั่วไปไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช | พืชทุกชนิดเจริญเติบโตได้ |
| 2 – 4 (เค็มน้อย) | ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชที่ไวต่อความเค็ม | ถั่วฝักยาว ขึ้นฉ่าย มะเขือ แตงกวา แตงไทย กัลฉ่าย มะนาว ส้ม มะม่วง ถั่วเขียว ถั่วลิสง งา |
| 4 – 8 (เค็มปานกลาง) | ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด | ข้าว หอมแดง พริก ผักกาดหอม ข้าวโพดหวาน หอมใหญ่ น้ำเต้า บวบ บรอกโคลี แตงโม ชมพู่ แคน ทับทิม |
| 8 – 16 (เค็มมาก) | พืชทนเค็มเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ | มะเขือเทศ ผักโขม ผักกาดหัว แคนตาลูป ขี้เหล็ก กระถินณรงค์ ฝรั่ง ยูคาลิปตัส หญ้ากีนี |
| >16 (เค็มจัด) | พืชทนเค็มบางชนิดที่เจริญเติบโตได้ | หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า กะเพรา มะขาม มะพร้าว มะขามเทศ ละมุด |

ความเครียดจากเกลือ มีผลลดการงอกของเมล็ด และการเจริญของต้นกล้าข้าวหลายพันธุ์ ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของเกลือหรือระดับความเค็มที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวหรือความรุนแรงก็จะแตกต่างกันไปในข้าวแต่ละพันธุ์ ดังรายงานในข้าวสายพันธุ์ IR50, MDU5, PMK3, Jeerage samba, ADT43, ADT47, CO49 และ TKM11 พบว่าการเพาะเมล็ดในสภาพความเครียดจากเกลือ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิโมล มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความสูงของลำต้น และความยาวรากลดลงตามระดับความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในข้าวทุกสายพันธุ์ (Anbumalarmathi & Mehta, 2013)

อย่างไรก็ตามเมื่อเกิด ROS ขึ้นภายในเซลล์ พืชจะปรับตัวให้หยุดโต ในสภาวะเครียดได้โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) หรือ compatible solute เพื่อลดผลกระทบที่เกิดขึ้นจากความเครียด นอกจากกลไกการป้องกันโดยพืชแล้ว จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทั้งทางพันธุกรรมและการผลิตสารสำคัญในดินนั้น เป็นปัจจัยที่สำคัญในการย่อยสลายและหมุนเวียนแร่ธาตุ และยังมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญและการต้านทานของพืชอีกด้วย จุลินทรีย์ในดินมีหลายชนิด

ได้แก่ แบคทีเรีย รา แอคติโนแบคทีเรีย โปรโตซัว และสาหร่าย แต่ชนิดที่พบบ่อยคือ แบคทีเรีย เนื่องจากเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีความสามารถในการใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้อย่างหลากหลาย การใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะดินเค็มได้ เพราะเอนไซม์ ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) จะลดปริมาณของ ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช (ธนากร แสงสง่า, 2557)

2.7 กลไกของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของรฐพืชภายใต้สภาวะเครียดเกลือ

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth promoting bacteria; PGPB) มีประสิทธิภาพในการลดผลกระทบที่เป็นพิษของความเข้มข้นของเกลือสูง มีกลไกในการกระตุ้นทางสรีรวิทยา และชีวเคมี รวมถึงการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน เช่น การสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS) การกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การสะสมสารออสโมไลต์ (osmolytes) เพื่อรักษาจลนพลศาสตร์ของโซเดียมไอออน การเพิ่มระดับของฮอร์โมนพืชและการดูดซึมธาตุอาหารในพืช เป็นต้น ซึ่ง PGPB จะมีการส่งสัญญาณไปยังพืช โดยเปรียบเสมือนวัคซีนของพืช ส่งผลให้พืชเกิดการทนทานต่อสภาวะความเครียด บทบาทของจุลินทรีย์ คือ การฟื้นฟูโครงสร้าง และการปรับปรุงองค์ประกอบที่สำคัญในเซลล์พืช จึงเกิดการพัฒนาระบบชีวเคมีชนิดใหม่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ (Arora et al., 2020)

2.7.1 การผลิตสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

การผลิตสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular polymeric substance; EPS) เป็นสารที่แบคทีเรียผลิตเพื่อป้องกันความเป็นพิษ และลดการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ และช่วยในการเข้าครอบครองบริเวณรากพืชของแบคทีเรีย ส่งผลให้พืชทนทานต่อความเครียดออสโมติกและความเค็ม และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในความเค็มสูง การผลิต EPS โดย PGPB มีผลต่อการดูดซึมของโพแทสเซียมไอออน (K^+) โซเดียมไอออน (Na^+) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ในพืชลดลง ยกตัวอย่างเช่น *Curtobacterium albidum* SRV4^T ช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวให้ทนต่อสภาวะเครียดจากความเค็ม โดยมีการผลิต EPS การตรึงไนโตรเจน และการผลิต IAA (Vimal et al., 2019)

2.7.2 การผลิตฮอร์โมนพืช

การผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormones) ที่ผลิตโดยไรโซแบคทีเรียทนเค็มส่งเสริมการเจริญของพืช (Salt-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria; ST-PGPR) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียรอบรากพืช ที่มีบทบาทสำคัญในการปรับสรีรวิทยาของพืชภายใต้ความเครียดจากเกลือ เช่น การผลิตออกซิน (auxin) ไซโทไคนิน (Cytokinin) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) และกรดแอบไซซิก

(Abscisic acid) ซึ่งการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole acetic acid; IAA) มีความสำคัญสำหรับการแบ่งตัวและการยึดตัวของเซลล์ในพืช มีรายงานว่า *Streptomyces* สามารถทนต่อเกลือ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิต IAA ที่ส่งเสริมการเจริญของรากของข้าวสาลีภายใต้ความเครียดจากเกลือ อีกทั้ง ST-PGPR ยังผลต่อการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ ปกป้องพืชจากความเป็นพิษของไอออนในราก และกระตุ้นให้มีความยาวยอดข้าวที่เพิ่มขึ้น (Egamberdieva et al., 2017)

Nozari et al. (2020) ทำศึกษา *Streptomyces* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช และสามารถลดผลกระทบที่เกิดจากสภาวะเครียดเกลือในข้าวโพด (*Zea mays* L.) โดยการผลิตสารประกอบอินโดล (indolic compounds; IC), ซิเดอโรฟอร์ (siderophores), ACC deaminase และฟีนาซีน (phenazine) และมีความทนทานต่อความเค็มในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน 0 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ พบว่า *Streptomyces* 4 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช และความทนทานต่อความเค็มที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ และส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดในสภาวะเครียดเกลือ ซึ่งไอโซเลททั้งหมด สามารถผลิตสารประกอบอินโดล และซิเดอโรฟอร์ได้ โดยไอโซเลท CLV178 สามารถผลิตสารเหล่านี้ได้สูงสุด ซึ่งแบคทีเรียมีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces rimosus* ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ (ความเหมือนของยีน 16S) และมีการผลิต ACC deaminase จำนวน 6 ไอโซเลท และมีการผลิตฟีนาซีนจำนวน 2 ไอโซเลท คือ CLV186 และ CLV194

Djebaili et al. (2021) ทำการแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินเค็มทางตอนเหนือของเมืองแอลจีเรีย ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์ *Streptomyces* และ *Nocardiopsis* จำนวน 14 สายพันธุ์ ทำการทดสอบการผลิต IAA ภายใต้ความเข้มข้นของเกลือแตกต่างกัน จากผลการทดสอบพบว่า การผลิต IAA ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน *Streptomyces iakyrus* G10 สามารถผลิต IAA ที่เข้มข้นเกลือ 0.5 ถึง 1.75 โมลาร์ และ *Streptomyces xantholiticus* G22 สามารถผลิต IAA สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ และ *Streptomyces anulatus* J13 สามารถผลิต IAA สูงสุดที่เข้มข้นเกลือ 1.25 โมลาร์ และเมื่อมีการทดสอบในการเพาะปลูกร่วมกับเมล็ดข้าวสาลีในสภาวะดินเค็มพบว่า *S. iakyrus* G10 สามารถเพิ่มความยาวรากและลำต้นที่ความเข้มข้นเกลือ 1 โมลาร์ได้ดีที่สุด

2.7.3 การกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

การเกิด ROS ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโปรตีน กรดนิวคลีอิก การฟอกจางคลอโรฟิลล์ (chlorophyll bleaching) และส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหาย แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชจะมีการส่งสัญญาณในการกระตุ้นยีนในพืชที่สามารถกำจัด ROS ได้โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ชนิดต่าง ๆ โดยสารต้านอนุมูลอิสระสร้างขึ้นแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase

(MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR) และ catalase (CAT) และ 2) สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ได้อยู่ในรูปเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidant) เช่น glutathione (GSH), ascorbate, carotenoid, flavonoid และ tocopherol เป็นต้น (Egamberdieva et al., 2019)

Meena et al. (2020) ศึกษาแอคติโนแบคทีเรียที่เรียกกันว่า *Nocardioides* sp. NIMMe6 และ LC140963 ที่คัดแยกจากใบของถั่วเหลือง ทำการทดสอบโดยใช้ส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผลิตฮอร์โมนที่สำคัญของพืช (phytohormone rich bacterial culture filtrate extract; BCFE) พบว่ามีการผลิตฮอร์โมนพืชได้แก่ IAA กรดซาลิไซลิก และผลิตไซโตไคน์ และเมื่อทดสอบการเพาะปลูกข้าวสาลีปลูกภายใต้สภาวะเครียดเกลือ โดยการใช้ BCFE ในการแช่เมล็ด ส่งผลให้มีการงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้น 92 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของเกลือ 10 เดซิซีเมนต์ โดยมีการสะสมโปรตีนที่เนื้อเยื่อยอดและรากที่ 42.01 และ 28.75 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์สารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide, dismutase, catalase, peroxidase และ ascorbate peroxidase อีกทั้งยังมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและทนทานภายใต้สภาวะเครียดเกลือ จากรายงานชี้ให้เห็นว่าการใช้แอคติโนแบคทีเรียร่วมกับการปลูกพืชมีส่วนช่วยในการลดผลกระทบของพืชในสภาวะเครียดเกลือได้ ซึ่ง BCFE ที่ใช้ในการทดสอบมีปริมาณของฮอร์โมนพืชที่ผลิตได้จาก *Nocardioides* sp. NIMMe6 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการป้องกันสภาวะเครียดเกลือในข้าวสาลี

2.7.4 สะสมสารคอมแพททิเบิลโซลูท

ในสภาพแวดล้อมดินเค็มมีผลทำให้การดูดน้ำของพืชลดลง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของค่าศักย์ (water potential) ของน้ำในดิน ในสภาวะปกติรากพืชจะมีค่าศักย์ของน้ำต่ำกว่าในดิน พืชจึงจะสามารถดูดน้ำจากดินเข้าไปยังรากได้ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือสูงจะส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำในดินลดลง หากลดลงต่ำมารากพืชจะไม่สามารถดูดน้ำจากดินไปใช้ได้ ภายใต้สภาวะแวดล้อมนี้แบคทีเรียจะมีการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว โดยสะสมสารในกลุ่มคอมแพททิเบิลโซลูท (compatible solute) เช่น โพรลีน (proline) ไกลซีนบีเทน (glycine betaine) ทรีฮาโลส (trehalose) โพลีออลส์ (polyols) และสารละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ช่วยลดค่าความต่างศักย์น้ำในรากพืช เพื่อป้องกันพืชจากอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติก ลดการสูญเสียน้ำและเจือจางไอออนที่เป็นพิษ โดยจะทำหน้าที่เป็น organic osmolyte เพื่อคงสภาพเซลล์ให้ทำงานได้ตามปกติ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการปรับตัวของพืชเพื่อลดผลกระทบจากสภาวะเครียด เช่น ไกลซีนบีเทน ช่วยในการปรับค่าออสโมติกและป้องกันโครงสร้างภายในเซลล์เสียหายจากแรงดัน โดยมีกลไกการป้องกันในระดับกระบวนการถอดรหัส (transcription) และกระบวนการแปลรหัส (translation) โดยทำหน้าที่เป็น molecular chaperone (ธนากร แสงสง่า, 2557)

Akbari et al. (2020) ศึกษา *Streptomyces* ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี 2 สายพันธุ์ คือ Zarin และ Gonbad ภายใต้สภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือ พบว่า *Streptomyces* สายพันธุ์ C-2012 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี 2 พันธุ์ในสภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือแตกต่างกัน โดยจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีสายพันธุ์ Gonbad สูงสุด 63 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น *Streptomyces* สายพันธุ์ C-2012 จึงถูกเลือกในการศึกษาการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีในสภาวะเครียดเกลือ ซึ่งสภาวะเครียดเกลือเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้น้ำหนักสดและแห้งของต้นกล้าข้าวสาลี ปริมาณโพแทสเซียมไอออน คลอโรฟิลล์ และปริมาณของ glutathione reductase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะเครียดเกลือยังส่งผลให้ข้าวสาลี มีการเพิ่มปริมาณโปรตีน superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) และ peroxidase (POX) ในข้าวสาลีทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อทดสอบการใช้ *Streptomyces* sp. C-2012 เคลือบเมล็ดข้าวสาลีเพาะปลูกในสภาวะเครียดเกลือ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ปริมาณ APX และ SOD เพิ่มขึ้น และสามารถลดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

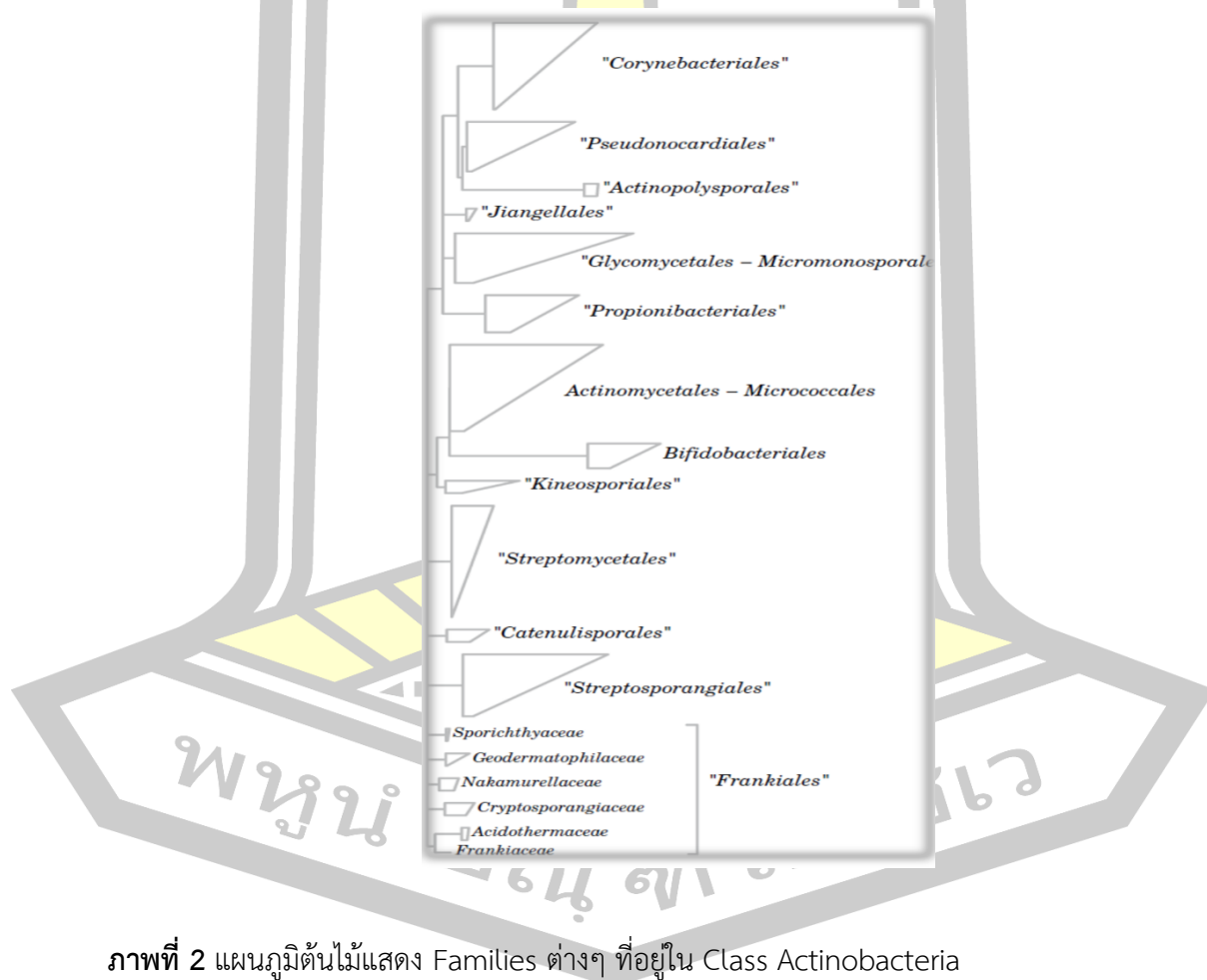
2.7.5 การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

เอนไซม์ ACC deaminase (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase) ทำหน้าที่ย่อยสลาย ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเอทิลีนในพืช เป็นสารที่พืชผลิตในสภาวะเครียด เอนไซม์ ACC deaminase จะย่อย ACC เป็นแอมโมเนีย (ammonia) และ α -ketobutyrate ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนจึงทำให้เกิดการลดระดับ ACC และมีส่วนช่วยในการป้องกันการการสังเคราะห์เอทิลีนภายใต้สภาวะความเครียดต่าง ๆ และเป็นหนึ่งในกลไกที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ที่จะทำให้พืชทนต่อความเครียดจากเกลือ ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานร่วมกันของ ACC deaminase และกลไกอื่น ๆ ของแบคทีเรียในการทนต่อความเครียดจากเกลือ เช่น กระบวนการสะสมทรีฮาโลส (Orozco-Mosqueda et al., 2020)

Khan et al. (2019) ทำการศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชโกฐจุฬาลัมพา (*Artemisia princeps* Pamp.) โดยการทดสอบการผลิต IAA, abscisic acid (ABA) และ ACC deaminase ของไอโซเลท SAK1 มีความสามารถผลิต ACC deaminase 330 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของ α -ketobutyrate ซึ่งช่วยลดผลกระทบของความเครียดจากเกลือและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวสาลีได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น ๆ และเมื่อศึกษาลำดับของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ SAK1 มีความเหมือนกับ *Curtobacterium oceanosedimentum* ATCC31317^T ที่ 99.93 เปอร์เซ็นต์

2.8 การจำแนกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก โดยตำแหน่งของยีน 16S rRNA จัดอยู่ใน Phylum Actinomycetota Class Actinomycetia ในปัจจุบันมีไม่น้อยกว่า 219 สกุล ใน 48 families ซึ่งแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ของ class Actinomycetia (เดิมคือ Actinobacteria) โดย Tamura-Nei model (Trn) ดังแสดงในภาพที่ 2 ตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ประกอบด้วย 15 orders คือ *Corynebacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Actinopolysporales*, *Jiangellales*, *Glycomycetales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Actinomycetales*, *Micrococcales*, *Bifidobacteriales*, *Kineosporiales*, *Streptomyetales*, *Catenulisporales*, *Streptosporangiales* และ *Frankiales* (Ludwig et al., 2012)



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้แสดง Families ต่างๆ ที่อยู่ใน Class Actinobacteria (Ludwig et al., 2012)

2.9 การจำแนกแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy

การจำแนกแบคทีเรียโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy คือ การใช้ข้อมูลทางจีโนไทป์ (genotype) และ ฟีนোটายป์ (phenotype) ซึ่งมีวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.9.1 วิธีทางจีโนไทป์ (genotypic method)

การจำแนกทางจีโนไทป์ (genotypic classification) เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียที่สนใจเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน (type strains) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล และการวิเคราะห์ DNA-DNA hybridization เพื่อจำแนกในระดับสปีชีส์ (Kirby, 2011)

1. DNA base ratio (moles percent G+C)

ข้อมูลของเปอร์เซ็นต์ของเบสกวานีน และไซโตซีน (G+C content) ของจีโนมของแอกติโนแบคทีเรียใช้ในการจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ G+C content ของแอกติโนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 51 และ 76 เปอร์เซ็นต์ (Williams et al., 1989) โดยทั่วไปสปีชีส์เดียวกันจะมีค่า G+C content ไม่ต่างกันเกิน 3 เปอร์เซ็นต์ และไม่ต่างกันเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลเดียวกัน (Stackebrandt & Liesack 1993; Vandamme et al., 1996)

2. การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) คือ ส่วนประกอบของไรโบโซม ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วย 3 ชนิดที่สำคัญคือ 5S rRNA (~ 120 nucleotides), 16S rRNA (~1600 nucleotides) และ 23S rRNA (~ 3000 nucleotides) (Olsen et al., 1986) ยีน 16S rRNA เป็นยีนอนุรักษ์ (highly conserved sequence) และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วงระยะเวลาที่แบคทีเรียมีวิวัฒนาการอันยาวนาน ข้อมูลของลำดับเบสใช้ในการจำแนกได้ในระดับสกุล โดยทั่วไป แบคทีเรียสองชนิดที่ต่างสกุลกันจะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของยีน 16S rRNA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ (Vandamme et al., 1996)

3. DNA-DNA hybridization

การศึกษา DNA-DNA hybridization ของโครโมโซมใช้ในการจำแนกระดับสปีชีส์โดยสปีชีส์เดียวกันจะมีค่า DNA –DNA relatedness มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

4. Signature nucleotide analyses

เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene ระหว่างตำแหน่งที่ 100-1400 (*Escherichia coli* sequence) โดยจะศึกษาเฉพาะบริเวณที่เป็น highly conservative site เพื่อตรวจสอบ group-specific signature nucleotides

2.9.2. วิธีทางฟีโนไทป์ (Phenotypic method)

วิธีทางฟีโนไทป์ คือ การศึกษาลักษณะที่แสดงออก หรือสามารถสังเกตได้ของแบคทีเรีย เช่น ข้อมูลทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และเซรุ่มวิทยา (serology) รวมทั้งการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรีย (chemotaxonomic data) (Vandamme et al., 1996) การศึกษาลักษณะที่แสดงออกของแบคทีเรีย ประกอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology study) โดยศึกษา ลักษณะของโคโลนี คือ เส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารบนอาหารต่างชนิดกัน ลักษณะของสปอร์และ ฝัสดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การติดสีแกรม หรือการติดสีแอซิดฟาสต์ (acid fast staining) ข้อมูลทางด้านสรีรวิทยา และชีวเคมี ประกอบด้วยการเจริญที่อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกัน การเจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเป็นแหล่งของ สารอาหารหลักที่แตกต่างกัน การใช้กรดอินทรีย์ การเจริญบนอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การผลิตเอนไซม์ และการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Williams et al., 1989; Vandamme, 1996)

2.9.3 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็นข้อมูลที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล โดยใช้ร่วมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมี ที่มีความสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ ชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) ที่ผนังเซลล์ ชนิดของ น้ำตาลภายในเซลล์ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และเมนาควิโนน (menaquinone) เป็นต้น (Goodfellow & Minnikin, 1985; Williams et al., 1989)

2.9.3.1 Diaminopimelic acid (DAP)

เป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งแบ่งกลุ่มแอกติโนแบคทีเรียตาม องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ไว้ทั้งหมด 8 กลุ่มดังตารางที่ 2 เซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิดมีผนัง เซลล์เป็นองค์ประกอบยกเว้น *Mycoplasma* และอาร์เคียบางสกุล แบคทีเรียมีเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือ murein เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยประกอบด้วย peptidoglycan monomer ที่สร้างขึ้นจากการเชื่อมต่อกันของ amino sugar 2 ชนิด คือ N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) ที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน 4 ชนิดคือ อะลานีน (alanine) ไกลซีน (glycine) ไลซีน (lysine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) ผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการเชื่อมข้ามสายระหว่าง DAP กับ อะลานีน หรือระหว่างไลซีนกับอะลานีน แอกติโนแบคทีเรียมี DAP เป็นชนิด *LL-DAP*, *meso-DAP* และ *OH-DAP* หรือไม่มี DAP จึงสามารถใช้ชนิดของ DAP ในการจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุลได้ โดยแอกติโนแบคทีเรียในแต่ละวงศ์ (family) จะมีชนิดของ DAP ที่แตกต่างกัน

2.9.3.2 ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) อะราบินอส (arabinose) กาแลกโทส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไรโบส (ribose) มาตูโรส (madurose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น นอกจากนี้กลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมิวรามิก (muramic acid) ที่เป็นองค์ประกอบในเปปทิโดไกลแคนแล้ว รูปแบบของน้ำตาลสามารถแบ่งแอคติโนแบคทีเรียที่มี DAP แบบเดียวกัน ได้แตกต่างกันออกไปดังตารางที่ 3 ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล ซึ่งชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์นี้สามารถใช้ในการจำแนกแอคติโนแบคทีเรียและแบคทีเรียอื่น ๆ ได้เช่นกัน นอกจากนี้ในการจำแนกแอคติโนแบคทีเรียยังสามารถใช้ข้อมูลชนิดของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เมนาควิโนน (menaquinone) และชนิดของกรดไขมัน (major fatty acid) เป็นต้น รวมทั้งข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลอื่นๆ

2.9.3.3 ส่วนประกอบของไขมัน (Lipid composition)

1. Polar lipids คือ กลุ่มหลักของ lipid bilayer และใช้ในการจำแนก polar lipid บางชนิด เช่น sphingophospholipid จะพบในบางสกุลเท่านั้น แบบ polar lipid ที่พบส่วนใหญ่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คือ phospholipid และ glycolipids โดย Phospholipid พบได้ในแบคทีเรียส่วนใหญ่ สำหรับแอคติโนแบคทีเรียบางกลุ่ม และ coryneform จะประกอบไปด้วย phosphatidylinositol mannosides (ตารางที่ 4)

2. Lipopolysaccharide พบได้ใน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ polysaccharides และใช้สำหรับการจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งจำแนกได้ 300 ชนิด ตามโครงสร้างของ fatty acids ซึ่งมีความแตกต่างของ chain length, double-bond position, substituent group

3. กรดไขมัน (Fatty acid) จะมีความแตกต่างของปริมาณตามปัจจัยการเพาะเลี้ยง เช่น ส่วนประกอบของอาหาร สภาพการเจริญ การสกัด และวิธีวิเคราะห์ทางโครมาโตกราฟี การวิเคราะห์กรดไขมัน จะเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ในรูปแบบ Fatty acid methyl ethers (FAMES)

4. Isoprenoid quinones

Isoprenoid quinones คือ ชนิดของ trepenoid ที่พบได้ใน cytoplasmic membrane ของแบคทีเรียส่วนใหญ่ ซึ่งมีความสำคัญกับ electron transport, oxidative phosphorylation และ active transport ซึ่ง Isoprenoid quinones ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ ubiquinones, menaquinones หรือ dimethylmenaquinones กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly anaerobic Gram negative bacteria) จะพบเพียง ubiquinones กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่ใช่อากาศ (Facultative anaerobic Gram negative bacteria) พบได้ทั้ง ubiquinones, menaquinones หรือ dimethyl menaquinones หรืออาจจะพบทั้ง 3 ชนิดรวมกัน แต่กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง

(strictly anaerobic Gram negative bacteria) จะพบเพียง menaquinones กลุ่มแบคทีเรียแกรม บวกที่เจริญได้ที่มีอากาศเท่านั้น และกลุ่มที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ส่วนใหญ่จะพบเพียง menaquinones (Williams et al., 1989) ซึ่งการจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุลจะ พิจารณาชนิดของ major menaquinone

2.10 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมด (whole genome sequence)

Whole genome sequence (WGS) เป็นการอ่านลำดับเบสทุกตัวที่เป็นสารพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิต เปรียบเทียบกับจีโนมอ้างอิงของสิ่งมีชีวิตที่คล้ายคลึงกันหรือมีอยู่ก่อนแล้ว วิธีการนี้ใช้ short reads จากเทคโนโลยี Next-Generation Sequencing (NGS) ทำให้การแมป (map) กับจีโนม อ้างอิงทำได้ด้วยความเชื่อมั่นสูง โดยใช้ข้อมูลที่อ่านได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของข้อมูลและ นำไปวิเคราะห์หา species ต่อไป อีกทั้งวิธีนี้เป็นวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต สารชนิดใหม่ โดยทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะที่ต้องการ และนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาสกัดดีเอ็น เอทั้งหมด (genome) และนำจีโนมที่ได้ไปหาลำดับเบสทั้งหมด และทำการเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ สายพันธุ์ใกล้เคียง โดยเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อโดยใช้ลักษณะทางจีโนมไปพร้อมกับฟีโนไทป์ อีกทั้งยังสามารถระบุตัวแปรเชิงสาเหตุที่เป็นไปได้สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน และ กลไกการควบคุมในเซลล์ (Wilantho et al., 2012)

การตรวจสอบจีโนมเพื่อหาเอ็นที่เกี่ยวข้องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยแอกติโน แบคทีเรีย และการพยากรณ์ข้อมูลจีโนม เพื่อระบุการผลิตสารสังเคราะห์ทางชีวภาพ มีการใช้ ซอฟต์แวร์สำหรับการพยากรณ์จีโนม (genome mining) เช่น การศึกษาจีโนมที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มเอ็นที่ ผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite; SM) และกลุ่มสารชีวสังเคราะห์ (biosynthetic gene clusters BGCs) โดยการใช้โปรแกรม “antiSMASH” เพื่อหาสารชีวสังเคราะห์ โดยใช้จีโนมของ แบคทีเรีย เพื่อตรวจสอบหาเอ็นในกลุ่ม terpene, type 1 polyketide synthase (T1PKS), type 3 polyketide synthase (T3PKS), Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), lassopeptide cluster, lanthipeptide cluster, Aryl polyene cluster (Arylpolyene), bacteriocin cluster และ tRNA-dependent cyclodipeptide synthases (CDPS) และ การใช้ ลำดับเบสของจีโนมทั้งหมดแปลงเป็นรหัสของกรดอะมิโน โดยการใช้การ annotation เพื่อตรวจสอบหา เอ็นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม สารส่งเสริมการเจริญของพืช และ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Blin et al., 2023)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนแบคทีเรีย

(Barka et al., 2016)

| ชนิดของผนังเซลล์ | องค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มผนังเซลล์ | สกุล |
|------------------|--|---|
| I | LL-DAP, glycine, no sugar | <i>Arachnia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pimelobacter</i> , <i>Streptomyces</i> |
| II | meso-DAP, glycine, arabinose, xylose | <i>Actinomyces</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Ampulariella</i> , <i>Catellatosporia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i> |
| III | meso-DAP, madurose (3-O-methyl-D-galactose) | <i>Actinocorallia</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Frankia</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Maduromycetes</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planotetraspora</i> , some <i>Frankia</i> spp., <i>Spirillosporina</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Thermomonospora</i> |
| IV | meso-DAP, arabinose, galactose | <i>Micropolyspora</i> , <i>Nocardioforms</i> |
| V | Deprived of DAP; possesses lysine and ornithine | <i>Actinomyces</i> |
| VI | DAP; variable presence of aspartic acid, galactose | <i>Arcanobacterium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> |
| VII | Deprived of DAP; diamino butyric acid, glycine, with lysine variable | <i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i> |
| VIII | Deprived of DAP; ornithine | <i>Aureobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Curtobacterium</i> |

ตารางที่ 4 ชนิดของ polar lipid

| ชนิด | สกุล |
|------------------|---|
| PI | <i>Actinomadura</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nocardioides</i> |
| PII- PE | <i>Actinoplanes</i> , <i>Chainia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Microellobosporia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Nocardia</i> |
| PIII PG, PC, PME | <i>Micropolyspora</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> |
| PIV PE , GLUNU | <i>Intrasporangium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Streptosporangium</i> |
| PV PG , GLUNU | |

PG = phosphatidylglycerol, PC= phosphatidylcholine

PE = phosphatidylethanolamine, PME = Phosphatidylmethylethanolamine,

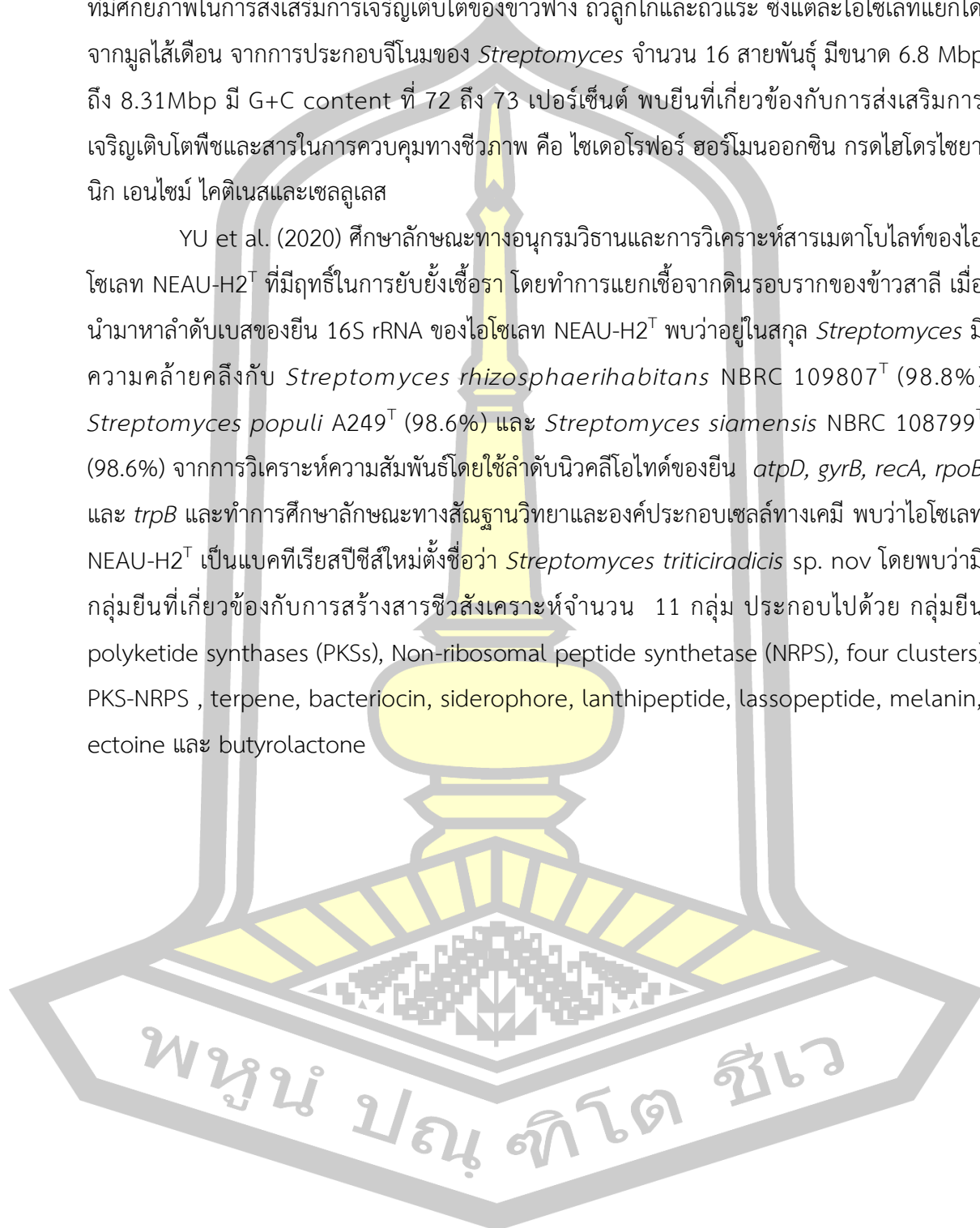
GLUNU = unknown lipid containing glucosamine (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

Dhakal et al. (2018) ศึกษาจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนทราไซคลิน (Anthracyclines) ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความหลากหลายของการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 คือสาร doxorubicin (DXR) และ daunorubicin (DNR) ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการรักษามะเร็ง ลำดับเบสของจีโนมของ *S. peucetius* ATCC 27952 มีขนาด 8.02 ล้านเบส (Mbp) จำนวนโปรตีน 7187 จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศของ ลำดับจีโนม พบ 68 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารชีวสังเคราะห์ที่หลากหลาย ได้แก่ PKS (polyketide synthase) type II (doxorubicin และ daunorubicin), NRPS (non-ribosomal peptide synthase) และ terpene (hopene) เป็นต้น

Jauri et al. (2019) ทำการศึกษา *Streptomyces* sp. UYFA156 ที่คัดแยกจากหญ้าทอล เฟสคิว (*Festuca arundinacea*) จากการทดลองพบว่ามีคุณสมบัติในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจากการวิเคราะห์จีโนมโดยใช้โปรแกรม FastANI v.1.1 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces albidoflavus* SM254 96.27 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานมีการศึกษาการต้านทานเชื้อก่อโรคพืชที่มีศักยภาพ และมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารชีวสังเคราะห์ โดยการใช้โปรแกรม antiSMASH v.5.0.0 พบว่ามีการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น nonribosomal peptide (NRPS), polyketide synthases (PKS), ectoine, terpenes และ desferroxamine เป็นต้น

Subramaniam et al. (2020) ทำการศึกษาลำดับจีโนมของ *Streptomyces* 16 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวฟ่าง ถั่วลูกไก่และถั่วแระ ซึ่งแต่ละไอโซเลทแยกได้จากมูลไส้เดือน จากการประกอบจีโนมของ *Streptomyces* จำนวน 16 สายพันธุ์ มีขนาด 6.8 Mbp ถึง 8.31Mbp มี G+C content ที่ 72 ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชและสารในการควบคุมทางชีวภาพ คือ ไฮเดอโรฟอรั ฮอร์โมนออกซิน กรดไฮโดรโซยานิก เอนไซม์ ไคตินเนสและเซลลูเลส

YU et al. (2020) ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและการวิเคราะห์สารเมตาโบไลต์ของไอโซเลท NEAU-H2^T ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา โดยทำการแยกเชื้อจากดินรอบรากของข้าวสาลี เมื่อนำมาหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท NEAU-H2^T พบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rhizosphaerihabitans* NBRC 109807^T (98.8%) *Streptomyces populi* A249^T (98.6%) และ *Streptomyces siamensis* NBRC 108799^T (98.6%) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* และ *trpB* และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบเซลล์ทางเคมี พบว่าไอโซเลท NEAU-H2^T เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ตั้งชื่อว่า *Streptomyces triticiradicis* sp. nov โดยพบว่ามีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารชีวสังเคราะห์จำนวน 11 กลุ่ม ประกอบไปด้วย กลุ่มยีน polyketide synthases (PKSs), Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), four clusters) PKS-NRPS , terpene, bacteriocin, siderophore, lanthipeptide, lasso peptide, melanin, ectoine และ butyrolactone



2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gangwar et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากข้าวสาลีและศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมทางชีวภาพ ทำการแยกเอนโดไฟติก แอกติโนแบคทีเรียทั้งหมด 35 ไอโซเลท จากราก ลำต้น และเนื้อเยื่อใบของต้นข้าวสาลี อยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. จำนวน 24 ไอโซเลท *Actinopolyspora* sp. จำนวน 3 ไอโซเลท *Nocardia* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท *Saccharopolyspora* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท *Pseudonocardia* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Micromonospora* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 17 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและผลิต IAA อยู่ในช่วง 5 ถึง 42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 18 ถึง 42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ความสามารถในการผลิตสารไซเดอโรฟอรัซชนิดคาเทคอล (catechol) จำนวน 19 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 1.3-20.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไซเดอโรฟอรัซชนิดไฮดรอกซามेट (hydroxamate) จำนวน 9 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 13.33 ถึง 50.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง *Streptomyces roseosporus* W9 มีความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรัซชนิดคาเทคอลสูงสุดที่ 20.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวสาลีได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบกับข้าวสาลีพบว่าเนื้อเยื่อของต้นข้าวสาลีมีสุขภาพดีและไม่เกิดโรค

Hastuti et al. (2012) ศึกษาเอนโดไฟติกสกุล *Streptomyces* ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในข้าว *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง โดยทำการทดสอบจำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้ง Xoo ทั้งในพืชและในหลอดทดลอง โดยมีการทดลองปลูกข้าวในโรงเรือน พบว่า เอนโดไฟติกสกุล *Streptomyces* spp. สามารถควบคุมโรคขอบใบแห้ง มีพื้นที่กราฟไตเส้นโค้งแสดงเปอร์เซ็นต์ต้นที่เกิดโรค ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามการส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยกรรมวิธีที่มี *Streptomyces* มีจำนวนต้นข้าวแตกกอสูงกว่าพืชควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรรมวิธีที่มี *Streptomyces* sp. AB131-1 มีความสูงของต้นข้าวมากที่สุด ในส่วนของการศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับการควบคุมทางชีวภาพของ *Streptomyces* spp. เพื่อคัดเลือกไอโซเลท พบว่าไอโซเลท LBR02 มีฤทธิ์ยับยั้ง Xoo สูงสุด รองลงมาคือ AB131-1 และ AB131-2 อีกทั้งยังพบว่า AB131-1 และ LBR02 สามารถผลิตโคตินีนสฟอสฟาเตส และไซเดอโรฟอรัซ และเมื่อทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopy) พบว่าทั้งสามไอโซเลทจำแนกได้ในสกุล *Streptomyces* spp.

Kampapongsa and Kaewkla (2016) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L. KDML 105) เพาะปลูกที่จังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว คัดแยกจากตัวอย่างข้าว คือ ราก ลำต้น และใบ มีจำนวน 160 ไอโซเลท จากการศึกษาอื่น 16S rRNA มีจำนวน 3 สกุลคือ *Streptomyces* จำนวน 63 ไอโซเลท (54.3%) *Microbispora* จำนวน 50 ไอโซเลท (43%) และ *Kineococcus* จำนวน 3 ไอโซเลท (2%) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว *Xanthomonas oryzae* KHVK 4.1_UBN_06, *Pyricularia grisea* 61119, *Helminthosporium oryzae* DOAC 1570 และ *Curvularia lunata* BCC 15558 พบว่ามีจำนวน 22 และ 4 ไอโซเลท (18.8% และ 3.4 %) ที่สามารถยับยั้ง *X. oryzae* KHVK 4.1_UBN_06 และ *P. grisea* 61119 ตามลำดับ ไอโซเลทที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* เมื่อทำการตรวจสอบยีน PKS-I, PKS-II และยีน NRPS พบว่าไม่มีไอโซเลทใดที่มียีนเหล่านี้

Mohdhatta et al. (2015) ทำการศึกษาแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากข้าว ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) ในหลอดทดลอง และศักยภาพในส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าว จำนวน 92 ไอโซเลท มีเพียง 21.74 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถยับยั้ง Xoc เมื่อทำการจำแนกโดยใช้ 16s rRNA พบว่าอยู่ในสกุล *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Pseudonocardiaceae* และ *Tsukamurella* เป็นต้น ซึ่งมี 60 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งอยู่ในสกุล *Streptomyces* อีกทั้งยังพบว่าไอโซเลทที่มีการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้สูงสุด มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) และฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี

Kaewkanta and Kunasakdakul (2017) ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L.) บนอาหาร inhibitory mold agar 2 (IMA-2) จำนวน 174 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture) พบว่าไอโซเลท ORR107 และ ORR719 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 78.35 และ 74.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นกล้า ด้วยวิธีการแช่เมล็ดข้าวในสารละลายสปอร์ของแต่ละไอโซเลท พบว่าไอโซเลท ORR719 และ ORR107 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวได้ดีที่สุด และเมื่อทำการคัดแยกเชื้อระยะเวลา 1, 3, 5, 7 และ 14 วันหลังการปลูก พบว่าทั้งสอง ไอโซเลทสามารถเข้าครอบครองในเนื้อเยื่อต้นกล้าข้าวได้ทั้งในส่วนของใบ ราก และเปลือกเมล็ดข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลท ORR107 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อตามระยะเวลาหลังการเพาะปลูกข้าว

Mingma et al. (2017) ศึกษาความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากข้าวที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว คัดแยกจากรากและโคนต้นข้าวโดยใช้อาหาร Starch casein agar จากการศึกษา Diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ จำนวน 96 ไอโซเลท มี LL-isomer ของ DAP และจำนวน 95 ไอโซเลท มี meso-isomer ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Streptomyces และ Non-Streptomyces จากการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ไอโซเลทที่มี meso-DAP ในผนังเซลล์อยู่ในสกุล *Actinomadura*, *Actinomycetospira*, *Kribbella*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus* และ *Sphaerisorangium* ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตไซโตโรเฟอร์ การผลิต IAA และการละลายของฟอสเฟต 79.6, 30.9 และ 42.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าจำนวนไอโซเลทที่มีความสามารถในยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวในงานทดสอบ ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* และ *Helminthosporium oryzae* ที่ 26, 25 และ 24 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากรากข้าว จึงสรุปได้ว่าการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากข้าวมีความหลากหลาย และมีคุณสมบัติในการผลิตสารควบคุมชีวภาพ



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อจุลินทรีย์

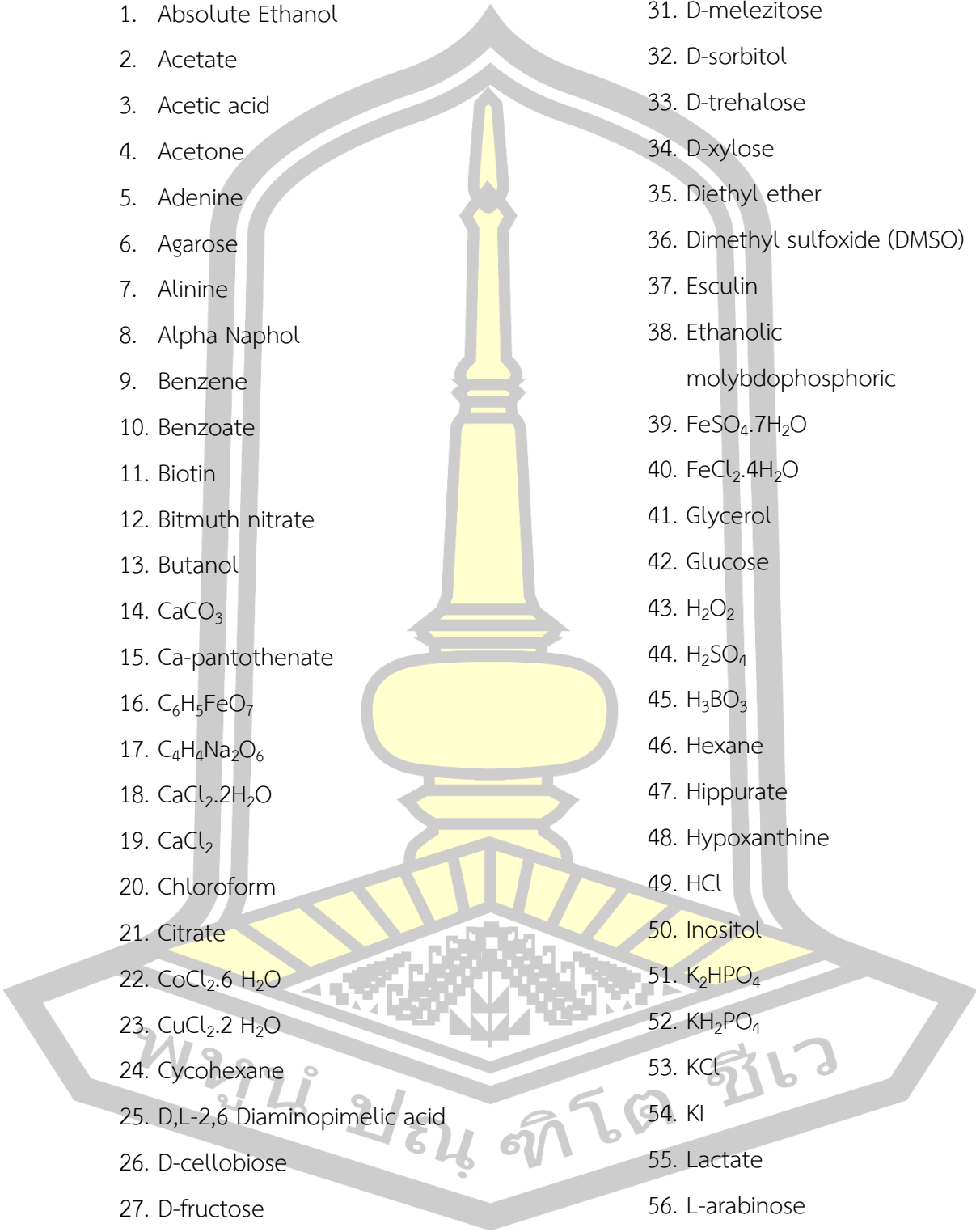
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

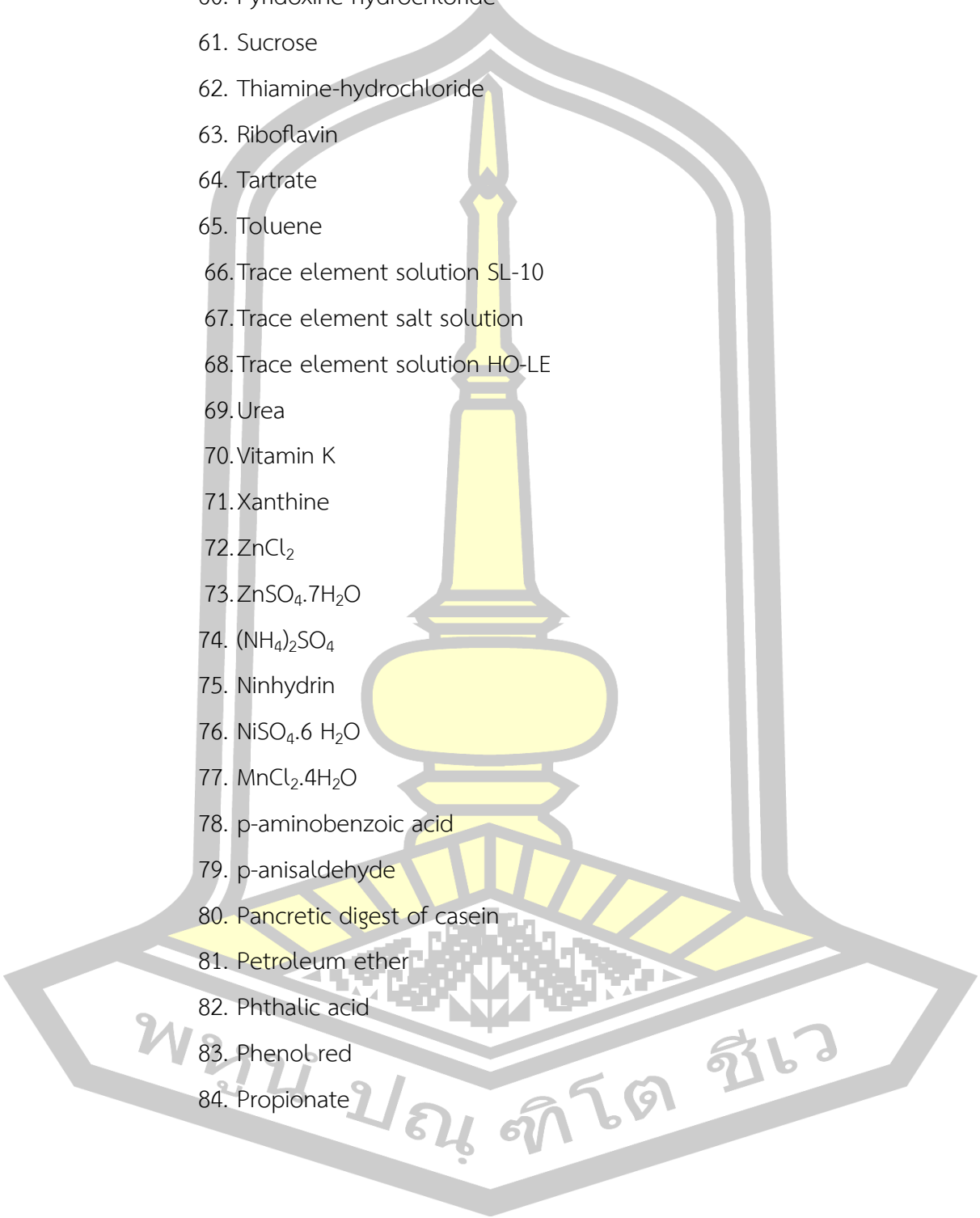
1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
3. ปิเปต (Pipette)
4. กระบอกตวง (Cylinder)
5. คีมคีบ (Forcep)
6. กรรไกรผ่าตัด
7. กล้องจุลทรรศน์
8. Eppendorf พร้อมกล่อง
9. Tip พร้อมกล่อง
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. แผ่นสไลด์ (Slide)
12. กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)
13. หลอดฝาเกลียว (Test tube)
14. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)
15. จุกยาง
16. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
17. ปีกเกอร์อลูมิเนียม (Aluminum beaker)
18. ปีกเกอร์ขนาด 50, 250 ml
19. Syring ที่ปลอดเชื้อ
20. Filter sterile
21. กระดาษกรอง Whatman No. 1
22. โกร่งบดสาร
23. แท่งแก้วคนสาร

3.1.2 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น INE 200 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
2. ตู้อบฆ่าเชื้อความร้อนสูง (Hot Air Oven) รุ่น ED 53 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) รุ่น Safe/Maxi Safe 2010 ของบริษัท Heto-Holten ประเทศเดนมาร์ก
4. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY ประเทศอเมริกา
5. กล้องจุลทรรศน์ (Light Compound Microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) รุ่น pH211 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี
7. เครื่องชั่ง (Analytical Balance) รุ่น AC 2115 ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
9. ไมโครปิเปต (Micropipette)
10. เครื่องผสมสาร (Vertex mixer)
11. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
12. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking Incubator)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (PCR Machine) ของบริษัท BIO-RAD
14. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) รุ่น SPECTROstar Nano ของบริษัท BMG LABTECH ประเทศเยอรมัน
15. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น SP-UV 200 Nano ของบริษัท Perkinelmer ประเทศอเมริกา
16. เครื่อง BLUPAD, LED transilluminator รุ่น 1BHC-BP001CU ของบริษัท Bio-Helix ประเทศไต้หวัน
17. เครื่องทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dehydration หรือ Lyophilization)
18. เครื่อง Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LCMS, LC-MS)
19. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี Gas Chromatography (GC)
20. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
21. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity Meter)
22. โถใช้วางแผ่น TLC (TLC tank) ยี่ห้อ Anatech ประเทศอเมริกา

3.1.3 สารเคมี

- 
1. Absolute Ethanol
 2. Acetate
 3. Acetic acid
 4. Acetone
 5. Adenine
 6. Agarose
 7. Alanine
 8. Alpha Naphol
 9. Benzene
 10. Benzoate
 11. Biotin
 12. Bitmuth nitrate
 13. Butanol
 14. CaCO_3
 15. Ca-pantothenate
 16. $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$
 17. $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$
 18. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 19. CaCl_2
 20. Chloroform
 21. Citrate
 22. $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 23. $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 24. Cyclohexane
 25. D,L-2,6 Diaminopimelic acid
 26. D-cellobiose
 27. D-fructose
 28. D-galactose
 29. D-mannitol
 30. D-mannose
 31. D-melezitose
 32. D-sorbitol
 33. D-trehalose
 34. D-xylose
 35. Diethyl ether
 36. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 37. Esculin
 38. Ethanolic molybdophosphoric
 39. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 40. $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 41. Glycerol
 42. Glucose
 43. H_2O_2
 44. H_2SO_4
 45. H_3BO_3
 46. Hexane
 47. Hippurate
 48. Hypoxanthine
 49. HCl
 50. Inositol
 51. K_2HPO_4
 52. KH_2PO_4
 53. KCl
 54. KI
 55. Lactate
 56. L-arabinose
 57. L-Asparagine
 58. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- 
59. Pyridine
 60. Pyridoxine-hydrochloride
 61. Sucrose
 62. Thiamine-hydrochloride
 63. Riboflavin
 64. Tartrate
 65. Toluene
 66. Trace element solution SL-10
 67. Trace element salt solution
 68. Trace element solution HO-LE
 69. Urea
 70. Vitamin K
 71. Xanthine
 72. $ZnCl_2$
 73. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
 74. $(NH_4)_2SO_4$
 75. Ninhydrin
 76. $NiSO_4 \cdot 6 H_2O$
 77. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
 78. p-aminobenzoic acid
 79. p-anisaldehyde
 80. Pancretic digest of casein
 81. Petroleum ether
 82. Phthalic acid
 83. Phenol red
 84. Propionate

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1. Starch agar
2. Carboxymethyl cellulose agar (CMC)
3. Tryptone Soy agar (TSA)
4. Half potato dextrose agar (HPDA)
5. ISP2 (Yeast extract-malt extract agar)
6. ISP3 (Oatmeal agar)
7. PDA (Potato dextrose agar)
8. Basal media
9. DF salt (Dworkin and Foster salts media)
10. Nutrient agar
11. Starch agar
12. Hippurate broth
13. Urea broth
14. Basal inorganic nitrogen
15. Skim milk agar
16. N-free medium
17. Pikovskaya media



3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเชื้อแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการของ รศ. ดร. อรุมา แก้วกล้า จำนวน 73 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อของข้าวขาวดอกมะลิที่พอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอก โดยแยกได้จากราก ลำต้น และใบ ของตัวอย่างข้าวที่เก็บจาก 3 บริเวณ คือ บ้านขามเรียง บ้านดินดำ และบ้านมะกอก ที่ปลูกบริเวณอำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม โดยชื่อของแต่ละไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากแต่ละแปลงนา คือ KR ตัวอย่างข้าวที่เก็บจากบ้านขามเรียง MK ตัวอย่างข้าวที่เก็บจากบ้านมะกอก และ RD ตัวอย่างข้าวที่เก็บจากบ้านดินดำ จำนวน 19, 24 และ 30 ไอโซเลท ตามลำดับ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล

3.2.1.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จัดกลุ่มแอกติโนแบคทีเรียทุกไอโซเลท โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารที่ต่างกัน 3 ชนิด คือ International streptomycetes project 2 (ISP 2), Oatmeal agar (ISP 3) และ Half strength potato dextrose agar (HPDA) โดยตรวจสอบลักษณะสีของโคโลนี และลักษณะของเส้นใย คือ เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร และลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

นำตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่จำแนกตามสัณฐานวิทยาจากการศึกษาในข้อ 3.2.1.1 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction และศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ตามลำดับ โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kaewkla and Franco (2013)

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HPDA ที่มีแผ่นเซลโลเฟน (cellophane) ที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 2-5 วัน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อประมาณ 1-2 ลูป ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Tris-EDTA (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยการเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ RNase A ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์โปรตีนเนส K (Proteinase K) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 32.5

ไมโครลิตร ผสมสารโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใส และสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ GF1 DNA extraction kit (Vivantis) ตามขั้นตอนที่ระบุของผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค gel electrophoresis และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2. การเพิ่มปริมาณ (Amplification) ของยีน 16S rRNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (Universal primer) 1 คู่ ได้แก่ 27f และ 1492r (Replicon 2 หรือ R2) ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของ oligonucleotide primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

| ไพรเมอร์ ¹ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ | อ้างอิง |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 27f | 5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' | Lane (1991) |
| 1492r | 5'CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT 3' | Weisberg et al. (1991) |

หมายเหตุ: ¹ ลำดับของเบส *E. coli* (Keawkla & Franco, 2012)

ปฏิกิริยาและรูปแบบของ PCR (PCR conditions and PCR profile)

เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27f (R1) คู่กับ 1492r (R2) ด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย

| | |
|--|-------------|
| 10x <i>Taq</i> DNA polymerase Buffer | 5 ไมโครลิตร |
| dNTP (10 mM) | 1 ไมโครลิตร |
| 27f และ 1492r (5 μ mol) | 2 ไมโครลิตร |
| <i>Taq</i> polymerase (5 units/ μ l) | 1 ไมโครลิตร |
| Genomic DNA (100 ng/ μ l) | 2 ไมโครลิตร |

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR โดยนำส่วนผสมที่ได้ไปเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้

| | | |
|-------------------------|-------------|--------------|
| Step 1: 94 องศาเซลเซียส | นาน 4 นาที | จำนวน 1 รอบ |
| Step 2: 94 องศาเซลเซียส | นาน 1 นาที | จำนวน 40 รอบ |
| 45 องศาเซลเซียส | นาน 1 นาที | |
| 72 องศาเซลเซียส | นาน 2 นาที | |
| Step 3: 72 องศาเซลเซียส | นาน 10 นาที | |
| Step 4: 27 องศาเซลเซียส | นาน 1 นาที | |

จากนั้นตรวจสอบ PCR product โดยเตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3

3. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 1 และ PCR product ที่เตรียมได้จากข้อ 2 นำมาวิเคราะห์หาขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ผงอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ ละลายผงอะกาโรสใน 0.5x TBE (ภาคผนวก ก) และให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย เติมสารละลาย SYBR safe แล้วเทลงในถาด (chamber) ที่มีหัว (combs) สำหรับทำให้เกิดหลุมเจล เจลมีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร รอให้เจลแข็งตัวและเทสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ให้ท่วมผิวหน้าของเจล นำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้โดยมี 100 bp ladder plus (บริษัท Vivantis) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ต่อวงจรกระแสไฟฟ้าตรงเข้ากับเครื่อง electrophoresis ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง นำเจลไปตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง BLUPAD, LED illuminator

4. การทำให้ PCR product บริสุทธิ์

ทำให้ตัวอย่างของ PCR product บริสุทธิ์โดยใช้ GF1 PCR clean up kit (บริษัท Vivantis) ตามขั้นตอนที่แนะนำของผลิตภัณฑ์ หลังจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ นำ PCR product ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยตรวจสอบดีเอ็นเอบน 1.2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ตามข้อ 3

5. การหาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA (Partial 16S rRNA gene sequencing)

ตัวอย่างบริสุทธิ์ของ PCR product ในส่วนของ R1 ที่เตรียมได้ตามข้อ 4 นำไปหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยส่งตัวอย่างไปที่ MacroGen DNA Sequencing service ประเทศเกาหลี ทำการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยทำการเปรียบเทียบค่า pairwise

similarity กับ valid name ของแต่ละสกุลโดยใช้ EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (Yoon et al., 2018) และรายงานผลกับ valid name ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดจำนวน 3 สปีชีส์

6. การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree)

ทำการ align ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรีย และสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมากที่สุดที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 5 โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) ทำการสร้าง phylogenetic trees โดยใช้วิธี ด้วย software package MEGA 11 และสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Maximum likelihood และ Neighbor Joining (Tamura et al., 2021)

3.2.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์

จากผลการศึกษาในข้อ 3.2.1 คัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ ทำการจำแนกโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy จำนวน 4 ไอโซเลทคือ สกุล *Streptomyces* ไอโซเลท MK5 และ MK7 สกุล *Actinoplanes* ไอโซเลท RD1 และสกุล *Quardrisphaera* ไอโซเลท KR29 มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.2.1 วิธีการศึกษาทางจีโนมไทป์

1. การสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

นำแอกติโนแบคทีเรียมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction ทาลำดับเบส และศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีในข้อ 3.2.1

2. การประกอบและวิเคราะห์จีโนมของแอกติโนแบคทีเรีย

2.1 การหาลำดับเบสทั้งหมด

หาลำดับเบสทั้งหมดของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท MK5, MK7, RD1 และ KR29 โดยทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.2.1.2 โดยใช้เทคนิค Next Generation Sequencing ส่งตัวอย่างจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเตรียม free PCR library ด้วยวิธี DNA short insert size library และทำการหาจีโนมทั้งหมดด้วยเครื่อง Illumina Hiseq 150 bp pair end coverage 100x ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์อมิกส์และชีวสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 De novo genome assembly และ annotation

นำข้อมูล Clean data ที่ได้จากข้อ 2.1 ในรูปของข้อมูล FASTQ.GZ format ทำการตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลโดยใช้ FASTQC และทำการปรับปรุงข้อมูลในกรณีที่ค่า sequence per read ต่ำกว่าค่า Phred score 20 เฟอร์เซ็นต์ ทำการรวมจีโนมโดยใช้โปรแกรม Unicycler

(www.usegalaxy.org) และทำการประเมินคุณภาพของจีโนมที่รวมด้วยโปรแกรม Quast (www.usegalaxy.org) (Wick et al., 2017)

2.3 Genome annotation

ทำการวิเคราะห์ยีนต่าง ๆ ในแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยการทำการ annotation โดยใช้โปรแกรม Prokka (<http://usegalaxy.org>) (Seemann, 2014)

2.4 การเปรียบเทียบจีโนม (genome comparative)

เพื่อเปรียบเทียบค่า Average nucleotide identity (ANI) กับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน โดยเปรียบเทียบค่า ANIb (blast) และ ANIm (Mummer) โดยใช้ JSpecies (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) (Richter et al., 2016) และทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของจีโนม และ digital DNA-DNA hybridization โดยใช้ Type Strain Genome server (<http://tygs.dsmz.de>) (Meier-Kolthoff & Goker, 2019)

2.5 การทำเหมืองข้อมูลจีโนม (Genome data mining)

1) การศึกษาคลัสเตอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ (biosynthesis cluster gene; BGC) และวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น Polyketide synthetase I และ II (PKSI และ PKSII) nonribosomal peptide synthetases (NRPS) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ACC deaminase ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอโมนพืช เป็นต้น และตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ ดังกล่าวข้างต้นโดยใช้ antiSMASH version 7.0 (<https://antismash.secondary metabolites.org/>) (Blin et al., 2023)

2) ทำการพยากรณ์ยีน (gene prediction) ของแอกติโนแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ MK5, MK7, RD1 และ KR29 โดยใช้วิธี *in silico* ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเฉพาะสารที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดเค็ม เช่น ยีนที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ยีนที่ผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส ย่อยสลายฟอสเฟต ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอกโตอิน (ectoine) โพรลีน ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมแรงดันออสโมติก ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (*nif H*) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต antioxidant enzyme และยีน universal stress protein (USP) เป็นต้น โดยใช้ลำดับของกรดอะมิโนที่แปรรหัสมาจากยีนที่ได้จากผลของ annotation ทำการ blast ในฐานข้อมูล UniProt KB (<http://www.uniprot.org>) (The UniProt Consortium, 2023)

3.2.2.2 การศึกษาทางพีโนไทป์

1. การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน (type strains) ตามวิธีของ Shirling and Gottlieb (1966) บนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) และอาหารชนิดอื่น ๆ รวม 8 ชนิด คือ Yeast extract-malt extract agar (ISP 2), Oatmeal agar (ISP 3), Inorganic salts-starch agar (ISP 4), Glycerol Asparagines agar (ISP 5), Tyrosine agar (ISP 7), Bennett's agar, Half strength PDA และ Nutrient agar (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบสีของเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารตามมาตรฐานสีโดยใช้ Centroids for the ISCC-NBS colour system 2 colour specification (<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53470874>) (Centore, 2016) ทำการศึกษา ลักษณะรูปร่างของสปอร์โดยทำ slide culture และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ตรวจดูลักษณะผิวของสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy; SEM) โดยเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 7-21 วัน ตัดชิ้นส่วนวุ้นประมาณ 1x1 เซนติเมตร ตรึงเซลล์และสปอร์ด้วยสารละลาย osmium solution และเตรียมชิ้นส่วนตัวอย่างให้อยู่ในรูปที่เคลือบด้วยทอง (gold coated) และตรวจดูรูปร่างและผิวของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยการเตรียมตัวอย่าง และการถ่ายภาพ ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. การศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแอกติโนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน ตามขั้นตอนดังนี้

2.1 การเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง ISP 2 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 15, 27, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973) โดยขีดเชื้อเป็นเส้นตรง 3 ขีดต่อ 1 งานอาหาร บันทึกการเจริญหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน

2.2 การเจริญที่พีเอชที่ต่างกัน

ทดสอบการเจริญบนอาหารบนอาหารแข็ง ISP2 ที่พีเอชต่างๆ คือ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 (ปรับพีเอชหลังจากนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร) ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973) โดยขีดเชื้อเป็นเส้นตรง 3 ขีดต่อ 1 งาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน และบันทึกผลการเจริญ

2.3 การทนเกลือที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน

ทดสอบการเจริญบนอาหารบนอาหารแข็ง ISP2 ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ต่างกัน คือ 1, 3, 5, 7, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยขีดเชื้อเป็นเส้นตรง 3 ขีดต่อ 1 จาน บ่มเชื้อตามอุณหภูมิที่เชื่อมีการเจริญ เป็นเวลา 14 วัน และบันทึกการเจริญ (Kurup & Schmitt, 1973)

2.4 การผลิตกรดจากแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ต่างกัน (acid production from carbohydrates)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียและสายพันธุ์มาตรฐาน บนอาหารที่มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ต่างกัน 16 ชนิด ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ คือ อะราบินโนส (*L*-arabinose) เซลโลไบโอส (*D*-cellobiose) ฟรุคโตส (*D*-fructose) กาแลคโตส (*D*-galactose) กลูโคส (*D*-glucose) ดูซิทอล (Ducitol) มอลโทส (*D*-maltose) แมนโนส (*D*-mannose) แรมโนส (*L*-rhamnose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (*D*-trehalose) ซัยโลส (*D*-xylose) อินโนซิทอล (*myo*-inositol) แมนนิทอล (*D*-mannitol) ซอบิทอล (*D*-sorbitol) และ ซัยโลส (*D*-Xylose) ดูการสร้างกรดในหลอดอาหารวุ้นแข็งโดยการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

2.5 การย่อยเคซีน

ทดสอบการย่อยเคซีน (decomposition of casein) ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) โดยใช้อาหารแข็งที่เติมโปรตีนเคซีนจากหางนม (skim milk) ขีดเชื้อซีกแซกบนจานอาหาร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ผลบวก คือ บริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ โคล์นของเชื้อ

2.6 ทดสอบการย่อยแป้ง

ทดสอบการย่อยแป้ง (hydrolysis of starch) ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) โดยใช้อาหารแข็งที่เติมแป้ง (soluble starch) ขีดเชื้อซีกแซกบนจานอาหาร แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 7-14 วัน เททับด้วยสารละลาย Lugol's Iodine (0.1% (w/v) iodine และ 0.2% KI (w/v) ทิ้งไว้ 15 – 30 นาที ตรวจสอบบริเวณใสที่เกิดขึ้น

2.7 ทดสอบการผลิตเอนไซม์คาตาเลส

การผลิตเอนไซม์คาตาเลส (Catalase production) ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อ 1 หลูวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดด้วย H₂O₂ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผลบวก คือ การทำปฏิกิริยาทำให้เกิดฟอง

2.8 การใช้อะดีนีน ไฮโปแซนทีน ไทโรซีน และแซนทีน

ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) โดยใช้อาหารแข็งที่มีเติม อะดีนีน (adenine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ไทโรซีน (*L*-tyrosine) และแซนทีน (xanthine) พีเอช 7.4 ปลูกเชื้อโดยขีดเชื้อซีกแซกบนจานอาหาร บ่มเชื้อ 14 วัน ผลบวก คือ ตะกอนที่หายไปของสารที่ใช้ทดสอบ หรือ

บริเวณใสรอบ ๆ โคลนของเชื้อ

2.9 ทดสอบการใช้กรดอินทรีย์ที่ต่างกัน

ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973) เตรียมอาหาร basal medium (ภาคผนวก ก) เติมกรดอินทรีย์แต่ละชนิดในรูปเกลือโซเดียม 7 ชนิด คือ อะซิเตท (acetate) เบนโซเอท (benzoate) ซิเตรท (citrate) แลคเตท (lactate) มาเลท (malate) โพรไพโอเนท (propionate) และทาร์เทรต (tartrate) ปกเชื้อทดสอบ และบ่มเชื้อ 14 วัน ผลบวก คือ สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารที่เปลี่ยนไป เป็นสีแดงม่วง

2.10 การย่อยยูเรีย

การทดสอบการย่อยยูเรีย (Decomposition of urea) ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) เตรียมอาหารเหลวที่มียูเรีย (urease broth) พีเอช 7.4 ใส่เชื้อ 1 ลูบ นำไปเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าเป็นเวลา 14 วัน ผลบวก คือ อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู

2.11 การย่อยเอสคูลิน (Esculin)

ทดสอบการย่อย esculin ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973) โดยเตรียมอาหารเหลวที่มี esculin (esculin broth) (ภาคผนวก ก) ปกเชื้อ 1 ลูบ แล้วบ่มเชื้อแบบเขย่าเป็นเวลา 14-28 วัน จากนั้นปิเปตส่วนใส และหยด 1 เปอร์เซ็นต์ ferric citrate อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำหรือน้ำตาล คือ มี Fluorescence แสดงว่ามีการย่อยเอสคูลิน

2.12 การย่อยฮิปพูเรท (Hippurate)

ทดสอบการย่อย hippurate ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) เตรียมอาหาร hippurate broth ใส่เชื้อ 1 ลูบ บ่มเชื้อแบบเขย่าเป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นใช้ส่วนใสทดสอบการเกิด benzoic acid โดยการผสม 1 มิลลิลิตร ของส่วนน้ำใสด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ 50 เปอร์เซ็นต์ H_2SO_4 หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลบวก คือ มีตะกอนผลึก (crystals) สีขาวเกิดขึ้น

2.13 ทดสอบการใช้สารประกอบฟีนอลิก

การใช้สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ขีดเชื้อลงบนจานอาหาร Basal media ที่เติมสารประกอบฟีนอลิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไพริดีน (pyridine) เบนซีน (benzene) โทลูอีน (toluene) และไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) โดยขีดเป็นเส้นตรง 3 ขีดต่อจานและทำเชื้อละ 2 ข้ำ บ่มใน fume hood 14 วัน และตรวจดูการเจริญ และทำจานควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิก เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ

3.2.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemotaxonomic analyses)

1. การวิเคราะห์ชนิดของ Diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์

การวิเคราะห์ผนังเซลล์ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wellington and Toth (1994), O'Donnell et al. (1985) และ Bousfield et al. (1985) เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนกระดาดเซลโลเฟน ที่วางอยู่บนอาหารแข็ง ISP 2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเซลล์หรือสปอร์ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 6N HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ นำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยสารจนแห้งในน้ำเดือด จากนั้นเติมน้ำ RO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นเติมน้ำ RO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายสุดท้ายที่ทำการระเหย แล้วเก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้จากการย่อยไปจุดลงบนแผ่น TLC cellulose plates (Merck 5552 cellulose coated aluminium sheets) โดยมีสารละลายมาตรฐาน D,L-2,6 Diaminopimelic acid เพื่อเปรียบเทียบ โดยมีสารละลายตัวพา คือ Pyridine : 6 M HCl: DI H₂O: MeOH (10:4:26:80) และตรวจสอบชนิดของ DAP ด้วยการพ่นแผ่น TLC ด้วยสารละลาย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ninhydrin ใน acetone

2. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในเซลล์

การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในเซลล์ ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Hasegawa et al. (1983) เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนกระดาดเซลโลเฟน ที่วางอยู่บนอาหารแข็ง HPDA เป็นเวลา 7 วัน ย่อยเซลล์และสปอร์ด้วย 0.25 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการย่อยเซลล์จุดลงบนแผ่น TLC cellulose plates (Merck 5552 cellulose coated aluminium sheets) โดยมีสารละลายตัวพา คือ n-butanol: RO H₂O: pyridine: toluene (10:6:6:1) และมีสารละลายผสมของน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส แรมโนส ไรโบส อะราบิโนส จุดบนแผ่น TLC เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน และตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยการพ่นแผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline phthalic acid (aniline 2 มิลลิลิตร; phthalic acid 3.3 กรัม; water saturated n-butanol 100 มิลลิลิตร)

3. การวิเคราะห์เมนาควิโนน (Menaquinone) และไขมันที่มีขั้ว (Polar lipid)

3.1 การเตรียมเซลล์ให้แห้ง

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียแห้งมาสกัด menaquinone และ polar lipid ด้วยตัวทำละลายตามวิธีของ Minnikin et al. (1984) มีขั้นตอนดังนี้

3.2 การสกัดเมนาควิโนน

ทำการชั่งเซลล์แห้งปริมาณ 50 มิลลิกรัม ทำการเติม methanol ต่อ 0.3% NaCl solution (100:10) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม Petroleum ether (b.p.60-80 °C) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (Upper layer) ใส่ในหลอดใหม่ ทำการเติม Petroleum ether ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในส่วนที่เป็นตะกอน (lower layer) บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสรวมกัน จากนั้นทำการระเหยสาร (evaporation) โดยใช้แก๊สไนโตรเจน แล้วทำการละลายสารโดยใช้ Hexane : Diethyl ether (85:15) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร นำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่น TLC pre-coated kieselgel 60 F₂₅₄ plastic backed plates (Merck # 5735) โดยใช้วิตามินเค (Vitamin K) เป็นสารมาตรฐาน นำสารสกัดจุดลงบนแผ่น TLC (ขนาด 10x10 เซนติเมตร) หยดสารต่อเนื่องลงบนแผ่น TLC ให้มีความยาว 4 เซนติเมตร ห่างจากขอบด้านล่างของแผ่น 1.5 เซนติเมตร และจุดวิตามินเค 1 จุดเพื่อเปรียบเทียบเป็นสารมาตรฐาน โดยมีสารละลายตัวพา คือ Hexane : diethyl ether (85:15) จากนั้นดูแถบของ menaquinone ภายใต้อินฟราเรด UV 254 นาโนเมตร ที่มี R_f ใกล้เคียงกับวิตามินเค ลักษณะสีของแถบ menaquinone ที่ปรากฏจะมีสีน้ำตาลอมม่วง จากนั้นทำการจุดแถบของเมนาควิโนน ลงในหลอดทดลอง แล้วทำการเติม acetone ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ และทำการระเหยสารโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ทำการเติม acetone ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายลงใส่ในหลอด GC vial เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดของ menaquinone ด้วยเครื่อง Gas Chromatography นำสารละลาย menaquinone ที่ผ่านการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC มาวิเคราะห์ด้วย reverse phase Liquid chromatography Mass spectroscopy (LC-MS) โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Part No. 993967-902) สารละลายตัวพา คือ isopropanol : methanol (1:1) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.3 การสกัดไขมันที่มีชีวิต

นำส่วนตะกอน หรือ lower layer จากการสกัด menaquinone ในข้อ 3.2 ต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเติม Chloroform : Methanol: DI H₂O (90:100:30) ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform : Methanol: RO H₂O (50:100:40) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสรวมกัน แล้วเติม Chloroform: Methanol: DI H₂O (50:100:40) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 30 นาที และเก็บส่วนใสรวมกัน จากนั้นทำการเติม Chloroform ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และ 0.3% NaCl solution ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บ

ส่วน lower layer ใส่ในหลอด แล้วทำการระเหยสารโดยใช้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นละลายสารสกัดด้วย Chloroform : Methanol (2:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดของไขมันที่มีขี้ การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่มีขี้ วิเคราะห์ด้วยวิธี Two-dimension Thin Layer Chromatography ตามวิธีของ Minnikin et al. (1984) สารละลายตัวพา คือ 1) การรัน TLC ในครั้งแรก (first direction) chloroform : methanol: DI H₂O (65:25:4) และ 2) การรัน TLC ในครั้งที่ 2 (second direction) chloroform : acetic acid: methanol: DI H₂O (40:7.5:6:2) และทำการฉีดพ่นแผ่น TLC แต่ละแผ่นด้วยสารละลาย 5% ethanolic molybdophosphoric acid, Ninhydrin sprayed (0.2% in water-saturated butan-1-ol), Molybdenum blue reagent (Sigma), Alpha Naphthol sulphuric acid spray และ Dragendroft reagent

4. การวิเคราะห์ชนิดกรดไขมัน

วิเคราะห์กรดไขมันทั้งหมดภายในเซลล์ (Fatty Acid Methyl Esters; FAMES) ของแอคติโนแบคทีเรีย และสายพันธุ์มาตรฐาน โดยการเลี้ยงในสภาวะเขย่า โดยใช้อาหาร Trypticase Soya Broth (TSB) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และทำการสกัดกรดไขมันและวิเคราะห์ตามวิธีของ Microbial Identification Inc (MIDI) (Sasser, 2001) โดยผ่านขั้นตอน saponification, methylation และการสกัดในรูป FAMES และวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ทำการวิเคราะห์ด้วย Sherlock MIS SITE2 software version 6.1 (RTSBA6 database) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ซึ่ง BIOTEC เป็นผู้สกัด และวิเคราะห์ FAMES

3.2.3 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคข้าว

3.2.3.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร HPDA pH 7.3 สำหรับเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Potato dextrose agar (PDA) pH 6.0 สำหรับเลี้ยงเชื้อราก่อโรคข้าว ได้แก่ เชื้อ *Pyricularia grisea* 21009 โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) ดัดแปลงงานวิจัยของ Coombs and Franco (2003) ขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทบนอาหาร HPDA โดยขีดให้เป็นรูปซิกแซก (Zig zag) 1/4 ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อรา *Pyricularia grisea* 21009 บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันแล้วทำการทดสอบโดยตัดชิ้นส่วนของเชื้อรามาวางบนจานอาหารที่ขีดเชื้อเอนโดไฟติก

แอกติโนแบคทีเรีย โดยวางตรงข้ามกับด้านที่ขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียโดยห่างจากขอบจานอาหาร 3 เซนติเมตร และทำงานควบคุมโดยการตัดเชื้อราก่อโรคข้าววางบนจานอาหาร HPDA ที่ไม่มีการขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำจานทดสอบไปบ่มต่อ วัดผลการยับยั้งที่ 4 และ 7 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดความกว้างของรัศมีโคโลนีของเชื้อราด้านที่เจริญใกล้กับเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญตามสูตรดังนี้

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth: PIRG)

$$\text{PIRG} = (R1-R2) / R1 \times 100$$

โดยที่ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้

| | | |
|-------|-------------|---------------------------------------|
| ≥75 | เปอร์เซ็นต์ | มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี (+++) |
| 50-74 | เปอร์เซ็นต์ | มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (++) |
| 25-49 | เปอร์เซ็นต์ | มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (+) |
| < 25 | เปอร์เซ็นต์ | ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (-) |

3.2.3.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคข้าว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร HPDA pH 7.3 สำหรับเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Nutrient Agar (NA) pH 7.0 สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคข้าว คือ *Xanthomonas oryzae* PXO 71 โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน ตัดแปลงจากงานวิจัยของ Basavaraj et al. (2010) ขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทบนอาหาร HPDA โดยขีดบริเวณกึ่งกลางจานอาหาร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคข้าวบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงอาหาร Nutrient Broth (NB) pH 7.0 แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำเชื้อไปวัดค่าการเจริญ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นปรับให้มีค่าการเจริญเท่ากับ 0.5 และทำการทดสอบโดยขีดเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารที่ขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย โดยขีดห่างจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย 0.5 เซนติเมตร ในทิศทางจากกลางจานไปหาขอบจาน และทำงานควบคุมโดยการขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HPDA ที่ไม่มีการขีดเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำจานทดสอบไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบโดยวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากขอบจาน ดังนี้

- +++ มีการยับยั้งได้ดี เชื้อแบคทีเรียทดสอบมีการเจริญเท่ากับหรือน้อยกว่า 1.5 เซนติเมตร
 - ++ มีการยับยั้งได้ปานกลาง เชื้อแบคทีเรียทดสอบมีการเจริญเท่ากับหรือน้อยกว่า 2.5 เซนติเมตร
 - + มีการยับยั้งได้น้อย เชื้อแบคทีเรียทดสอบมีการเจริญเท่ากับหรือน้อยกว่า 3.5 เซนติเมตร
 - ไม่มีการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียทดสอบมีการเจริญเท่ากับหรือน้อยกว่า 4 เซนติเมตร
- (Basavaraj et al., 2010)

3.2.4 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง

นำเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคข้าวในระดับดี และดีมาททดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase การผลิตฮอร์โมนออกซิน การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการย่อยสลายเซลลูโลสในห้องปฏิบัติการ

3.2.4.1 การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

ทดสอบความสามารถของแอกติโนแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase โดยเลี้ยงในอาหาร DF medium (ภาคผนวก ก) ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหาร DF medium ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 กรัมต่อลิตร และอาหาร DF medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นจานควบคุม โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน (Penrose & Glick, 2003)

3.2.4.2 การผลิตฮอร์โมนออกซิน

นำเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินในรูป IAA ด้วยวิธีการวัดปฏิกิริยาความเข้มของสีที่เกิดขึ้น (Colorimetric method) ตามวิธีของ Khamna et al. (2010) โดยเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหาร HPDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารเหลว ISP 2 (ภาคผนวก ก) ที่เติม 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของ L-tryptophan ในขวดรูปชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเลี้ยงในที่มืด จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณ IAA แต่ละไอโซเลท ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ IAA โดยตัดแปลงจากงานวิจัยของ Khamna et al. (2009) โดยนำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2 มิลลิลิตร ของ Salkowski reagent (ภาคผนวก ก) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม IAA มาตรฐาน ที่ความ

เข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ภาคผนวก ก) มาทำปฏิกิริยาด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น และสร้างกราฟมาตรฐาน

3.2.4.3 การละลายฟอสเฟต

นำเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร Pikovskaya (ภาคผนวก ก) บ่มในที่มืดที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยไอโซเลทที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจะเกิดโซนใสรอบ ๆ โคลินี่ (Hastutih, 2012)

3.2.4.4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย โดยขีดจุดตรงกลางจานอาหาร Carboxymethyl cellulose agar (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิดโซนใสโดยใช้สารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของ congo red ทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นเทสารละลาย congo red ทิ้ง และเทสารละลาย 1M NaCl ให้ท่วมผิวหน้า โดยโคลินี่ที่ย่อยเซลลูเลสได้จะมีโซนใส จากนั้นทำการวัดโซนใสรอบ ๆ โคลินี่

3.2.4.5 การตรึงไนโตรเจน

ทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจน โดยถ่ายเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย ลงในสารอาหารกึ่งแข็งปราศจากแหล่งไนโตรเจน (N-free medium) (ภาคผนวก ก) ทดสอบการตรึงไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของโบรโมไทมอลบลู หากมีการตรึงไนโตรเจนจะมีการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีฟ้า และถ่ายเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่ให้ผลบวก ทดสอบต่อในอาหารชนิดเดียวกันอีก 2 ครั้ง (Baldani et al., 1997)

3.2.5 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะต้นกล้า

คัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ โดยพิจารณาจากผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลองในข้อ 3.2.4 จำนวน 2 ไอโซเลท นำมาทดสอบการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวและการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในระยะต้นกล้า โดยไอโซเลทที่คัดเลือกคือ RD12 และ RD28 ซึ่งมีวิธีดังนี้

3.2.5.1 ทดสอบการควบคุมโรคไหม้ในข้าวในระยะต้นกล้า

1. เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ในอาหาร HPDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อจุลินทรีย์สร้างสปอร์ แช่เมล็ดข้าวหอมมะลิในน้ำประมาณ 48 ชั่วโมง และทำการฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของ

ข้าวโดยใช้ 70% Ethanol เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ตามด้วย 3% NaOHCl (เตรียมทันทีก่อนใช้) เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง

2. เตรียมสารละลายสปอร์ของแอกติโนแบคทีเรียในข้อ 1 และทำการกรองเส้นใยโดยใช้ชุดกรองสปอร์ เก็บสปอร์ในสารละลาย 0.3 % xanthan gum ให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer) เคลือบเมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิวนอก ในอัตราส่วนสารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตร ต่อเมล็ดข้าว 200 เมล็ด และทำการทดลองควบคุมคือเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วย 0.3 เปอร์เซ็นต์ ของ xanthan gum ทำให้เมล็ดข้าวแห้งโดยการเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ Larminar air flow ข้ามคืน

3. นำเมล็ดข้าววางบนจานอาหารที่มีกระดาษกรอง 2 ชั้น ที่ทำการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. ปลูกข้าวในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ ใส่ดินทรายในกระถางปลูก 1.5 กิโลกรัมต่อกระถาง (ขนาดกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร) โดยปลูกข้าวจำนวน 15 เมล็ดต่อกระถางเมื่อข้าวมีใบที่ 2 ให้ถอนให้เหลือเพียง 6 ต้นต่อ 1 กระถาง ทำการทดลองทั้งหมด 6 กระถางต่อ 1 กรรมวิธี รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง คือตอนเช้า และตอนเย็น หลังจากข้าวอายุได้ 30 วัน ทำการทดสอบการควบคุมโรคใหม่ในข้าว

5. เตรียมเชื้อก่อโรค โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas oryzae* PXO 71 (Xoo) ในอาหาร HPDA เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียอยู่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ค่าความขุ่น 0.5 ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี clipping method ดัดแปลงจากวิธีของ Kuaffman et al. (1973) โดยใช้กรรไกรที่ปลอดเชื้อจุ่มสารละลายของ Xoo แล้วตัดจากปลายใบประมาณ 2 เซนติเมตร และมีการทดลองควบคุมคือ ข้าวที่เคลือบด้วย Xanthan gum + เชื้อก่อโรค (positive control) และข้าวที่เคลือบด้วย Xanthan gum + น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control) หลังจากปลูกเชื้อคลุมกระถางด้วยถุงพลาสติก ที่มีสำลีชุบน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 48 ชม. หลังจากนั้นฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น ระหว่าง 6.00 – 18.00 น. ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดการเกิดโรคของใบ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเสียหายหรือการเกิดโรคของใบ (% Diseased leaf area; %DLA) (Yasmin et al., 2017) โดยใช้โปรแกรม SPSS (Version 29) การวัดเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบ คัดจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่เกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$(\% \text{ Diseased leaf area; \%DLA}) = (L/LW) \times 100$$

L = ผลรวมความยาวรอยโรคของใบข้าว

LW = ผลรวมความยาวของใบข้าว

3.2.5.2 ศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวระยะต้นกล้าในสถานะเครียดเกลือ

1. เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวและเตรียมสารละลายแขวนลอยของแอกติโนแบคทีเรียเคลือบเมล็ดข้าวในตามวิธีในข้อ 3.2.4.1

2. ปลูกข้าวในดินทรายที่นิ่งฆ่าเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2.4.1 เป็นเวลา 30 วัน โดยทำการปลูกข้าวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม พ.ศ. 2567 และทำการทดลองโดยปลูกในกระเพาะข้าวที่มีตาข่ายกันแมลง โดยมีแสงแดดธรรมชาติ (12/12 ชั่วโมง มีด/สว่าง) ทำการทดลองทั้งหมด 6 กระถางต่อ 1 กรรมวิธี โดย 1 กรรมวิธี จะมีตัวอย่างต้นข้าวจำนวน 36 ต้น รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร การทดลองมี 6 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่เคลือบเมล็ดข้าวด้วย 0.3% Xanthan gum และกรรมวิธีที่เคลือบด้วยเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ทดสอบในสถานะปกติและสถานะเครียดเกลือ ซึ่งใช้การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) ซึ่งมีการทดลองจำนวน 6 กรรมวิธีคือ

กรรมวิธีที่ 1 ดินที่ไม่เติมเกลือ + 0.3 % Xanthan gum

กรรมวิธีที่ 2 ดินที่ไม่เติมเกลือ + ไอโซเลท RD12

กรรมวิธีที่ 3 ดินที่ไม่เติมเกลือ + ไอโซเลท RD 28

กรรมวิธีที่ 4 ดินที่เติมเกลือ 100 mM+ 0.3 % Xanthan gum

กรรมวิธีที่ 5 ดินที่เติมเกลือ 100 mM + ไอโซเลท RD12

กรรมวิธีที่ 6 ดินที่เติมเกลือ 100 mM+ ไอโซเลท RD 28

ในส่วนของกรรมวิธีที่ต้องเติมเกลือ ทำการเติมสารละลายเกลือ ในวันที่ 30 ของการปลูก โดยเติมสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นที่ 100 mM ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในตอนเช้า และตอนเย็น เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity; EC) ของดินโดยใช้วิธี Saturated soil-paste ตามวิธีของ Rhoades et al. (1999) โดยทำการชั่งตัวอย่างดินในแต่ละกรรมวิธีน้ำหนัก 100 กรัม เติมน้ำกลั่นในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้ดินอิ่มตัวผสมให้เข้ากัน ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำดินมาสกัดโดยใช้บีบสุญญากาศ แล้วนำสารสกัดดินที่ได้มาวัดค่า EC โดยใช้เครื่อง Conductivity meter ในการวัดค่า EC ของดิน เมื่อเติมเกลือครบ 4 วัน ทำการรดน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อวัน ต่อกระถางในทุกกรรมวิธีจนครบ 3 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างข้าวเพื่อวัดการเจริญของข้าว โดยวัดความยาวราก และลำต้น (คือ ผลรวมของยาวราก และลำต้น) น้ำหนักสด (คือ ผลรวมของน้ำหนักสดของราก และลำต้น) และน้ำหนักแห้งของราก และลำต้น (คือผลรวมของน้ำหนักแห้งของราก และลำต้น) นำตัวอย่างข้าวทั้งหมดไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักข้าวจะคงที่ นำผลการทดลองที่ได้มา

วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Version 29) โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

3.2.5.3 การศึกษาสถานะเครียดเกลือที่มีผลต่อทางสรีรวิทยาในข้าว

นำตัวอย่างข้าวจากข้อ 3.2.5.2 มาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ตามวิธีของ Lichtenthaler (1987) การสะสมของโพรลีน (proline content) ตามวิธีของ Bates et al. (1973) และการวิเคราะห์การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte leakage) ตามวิธีของ Wu et al. (2017) โดยวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (photosynthetic pigments)

ทำการชั่งตัวอย่างใบสด 30 มิลลิกรัม บดตัวอย่างโดยทำการเติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จนเป็นผง จากนั้นเติมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ปิดเตาสารสกัดใส่หลอด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470, 646 และ 662 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer จากนั้นคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักใบข้าว) (Lichtenthaler, 1987; Kerbab et al., 2021) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Chl}_a = 15.65 \times A_{662} - 7.340 \times A_{646} \quad (1)$$

$$\text{Chl}_b = 27.05 \times A_{646} - 11.21 \times A_{662} \quad (2)$$

$$\text{Car} = (1000 \times A_{470} - 2.860 \times \text{Chl}_a - 129.2 \times \text{Chl}_b) / 245 \quad (3)$$

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g FW)} = ca * V / (1000 * W)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g FW)} = cb * V / (1000 * W)$$

$$\text{Car (mg/g FW)} = car * V / (1000 * W)$$

V = ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดจากใบพืช (1.2 มล) ; W = น้ำหนักสดของใบข้าว (0.03 กรัม)

Chl_a คือ คลอโรฟิลล์ เอ

Chl_b คือ คลอโรฟิลล์ บี

Car คือ แคโรทีนอยด์

2. การวิเคราะห์ปริมาณของโพรลีน (proline content)

ชั่งตัวอย่างใบข้าวใบที่สอง 30 มิลลิกรัม เติมสารละลาย 3% sulfosalicylic acid ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และเก็บสารที่บดในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดเก็บเฉพาะส่วนใสใส่หลอดใหม่ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ในปฏิบัติการวิเคราะห์โพรลีนประกอบด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารสกัดจากใบพืชในหลอดทดลองที่มีฟลาเกลียวปิด แล้วทำการเติมสารละลาย acidic ninhydrin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมในหลอดให้เข้ากัน บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิบัติการใน

น้ำแข็งแล้วทำการเติม toluene 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 20 วินาที และบ่มแบบเขย่าใน อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด เพื่อให้ชั้นของสารแยกจากชั้นน้ำ แยกส่วนของ chromophore ที่อยู่ในชั้น toluene (ชั้นบน) ไปยังหลอดใหม่ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และใช้ toluene เป็น blank ใช้โพรลีนมาตรฐานสร้างกราฟ (standard curve) ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อคำนวณโพรลีนในหน่วย ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (microgram per gram FW) หรือไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด (micromole per gram FW) (Bates et al., 1973)

3. การวิเคราะห์การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของใบข้าว (Electrolyte leakage)

ใช้ตัวอย่างใบข้าวหนัก 50 มิลลิกรัม ตัดใบขนาด 1 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วทำการเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำน้ำที่แช่ใบข้าวมาวัดค่าการนำไฟฟ้า (EC_1) ด้วยเครื่อง Conductivity meter นำน้ำที่ทำการวัดการนำไฟฟ้าเทคืนใส่หลอดเดิม จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่า (EC_2) (Wu et al., 2017) และนำค่าที่ได้มาคำนวณ Electrolyte leakage จากสูตร

$$\text{Electrolyte leakage (\%)} = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS (version 26) ตรวจสอบค่าการกระจายตัวของ ชุดข้อมูลโดยใช้ Nonparametric statistic ด้วยการทดสอบ Shapiro-Wilk test ถ้าชุดข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance (ANOVA) แต่ถ้าชุดข้อมูลมีการกระจายตัวปกติ จะใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey หรือ Duncan's multiple range test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\text{-value} < 0.05$)

พหุ ประถมศึกษา

บทที่ 4

ผลการทดลอง

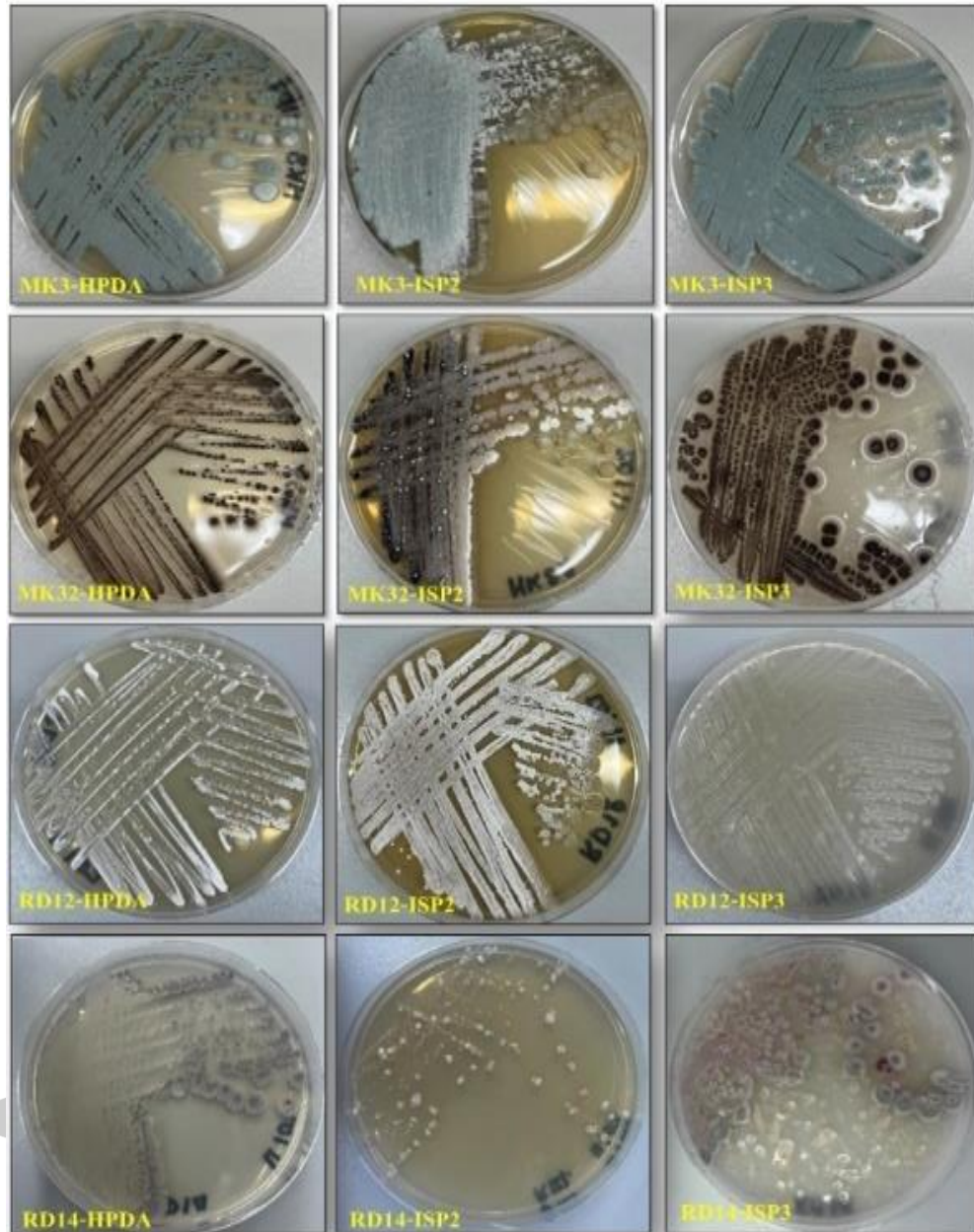
4.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล

4.1.1 ผลการจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

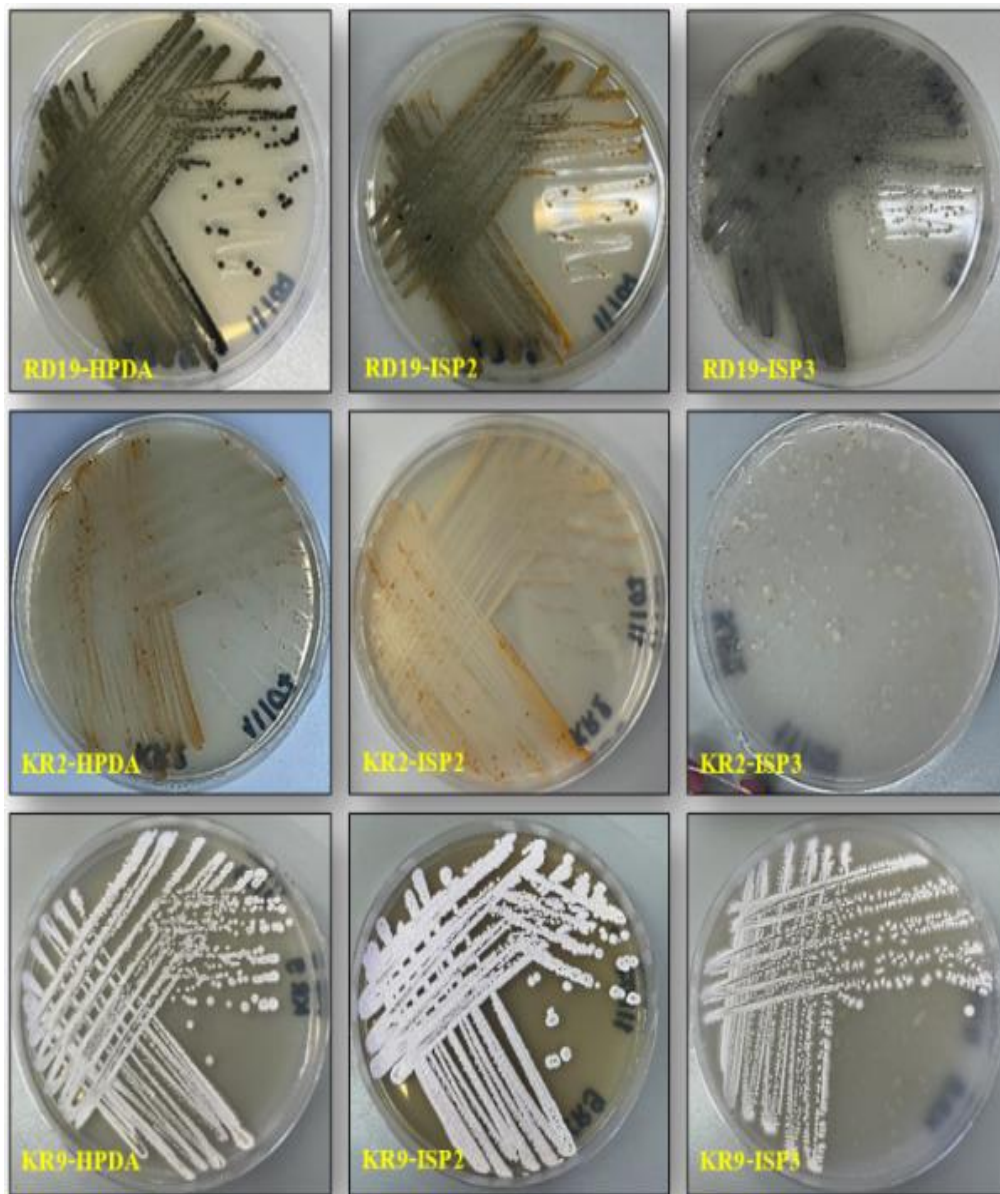
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียทั้งหมด 73 ไอโซเลท โดยการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร 3 ชนิด และลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยการเปรียบเทียบลักษณะสีของเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด เปรียบเทียบสีกับแผ่นสีมาตรฐาน Centroids for the ISCC-NBS colour system 2 colour specification (Centore, 2016) สามารถคัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียแบ่งเป็น 20 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 6 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะสีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ผลการศึกษาพบว่าลักษณะของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารมีสีที่แตกต่างกัน ซึ่งเส้นใยอากาศมีการสร้างสีของสปอร์ ได้แก่ สปอร์สีขาว สีเทาอ่อน สีเทาเข้ม สีเทาอมเหลือง สีชมพูอ่อน สีชมพู สีเขียวมะกอก สีน้ำตาลอมดำ สีส้มอ่อน สีส้ม สีส้มอมน้ำตาล และสีดำ ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร ได้แก่ สีน้ำตาล สีเหลืองอมน้ำตาล สีน้ำตาลอมเขียว สีเหลือง สีเหลืองอ่อน สีครีม สีขาว สีน้ำตาลอมดำ สีชมพู สีเขียวมะกอก สีแดงอมน้ำตาล สีส้มอ่อน สีส้ม สีส้มอมน้ำตาล และสีดำ จากลักษณะสัณฐานวิทยาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม *Streptomyces* และกลุ่ม *Non-Streptomyces* ซึ่งตัวอย่างลักษณะสีโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* และกลุ่ม *Non-Streptomyces* ที่เจริญบนอาหารต่างชนิดกันดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า สามารถจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียเบื้องต้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มของสกุล *Streptomyces* แบ่งเป็น 14 กลุ่มย่อย และกลุ่ม *Non-Streptomyces* แบ่งเป็น 6 กลุ่มย่อย ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยจำนวนสกุล *Streptomyces* มีจำนวน 66 ไอโซเลท (90.4%) พบการสร้างสปอร์ 3 รูปแบบ คือ แบบเส้นตรง (rectiflexibile) 22 ไอโซเลท แบบลูกปัด (retinaculiaperti) 18 ไอโซเลท และแบบเวียนเกลียว (spiral) 26 ไอโซเลท และกลุ่ม *Non-Streptomyces* มีจำนวน 7 ไอโซเลท (9.6%) สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะของสปอร์เบื้องต้นได้ 4 สกุล คือ สกุล *Micromonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวจำนวน 2 ไอโซเลท (2.7%) สกุล *Microbispora* มีการสร้างสปอร์คู่จำนวน 3 ไอโซเลท (4.1%) สกุล *Actinoplanes* มีการสร้างสปอร์อยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) จำนวน 1 ไอโซเลท (1.4%) และ สกุล *Quadrisphaera* พบการสร้างสปอร์ 4 สปอร์ (tetraspore) โดยเกาะกันเป็น 2

สปอร์ต่อกัน จำนวน 1 ไอโซเลท (1.4%) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 5

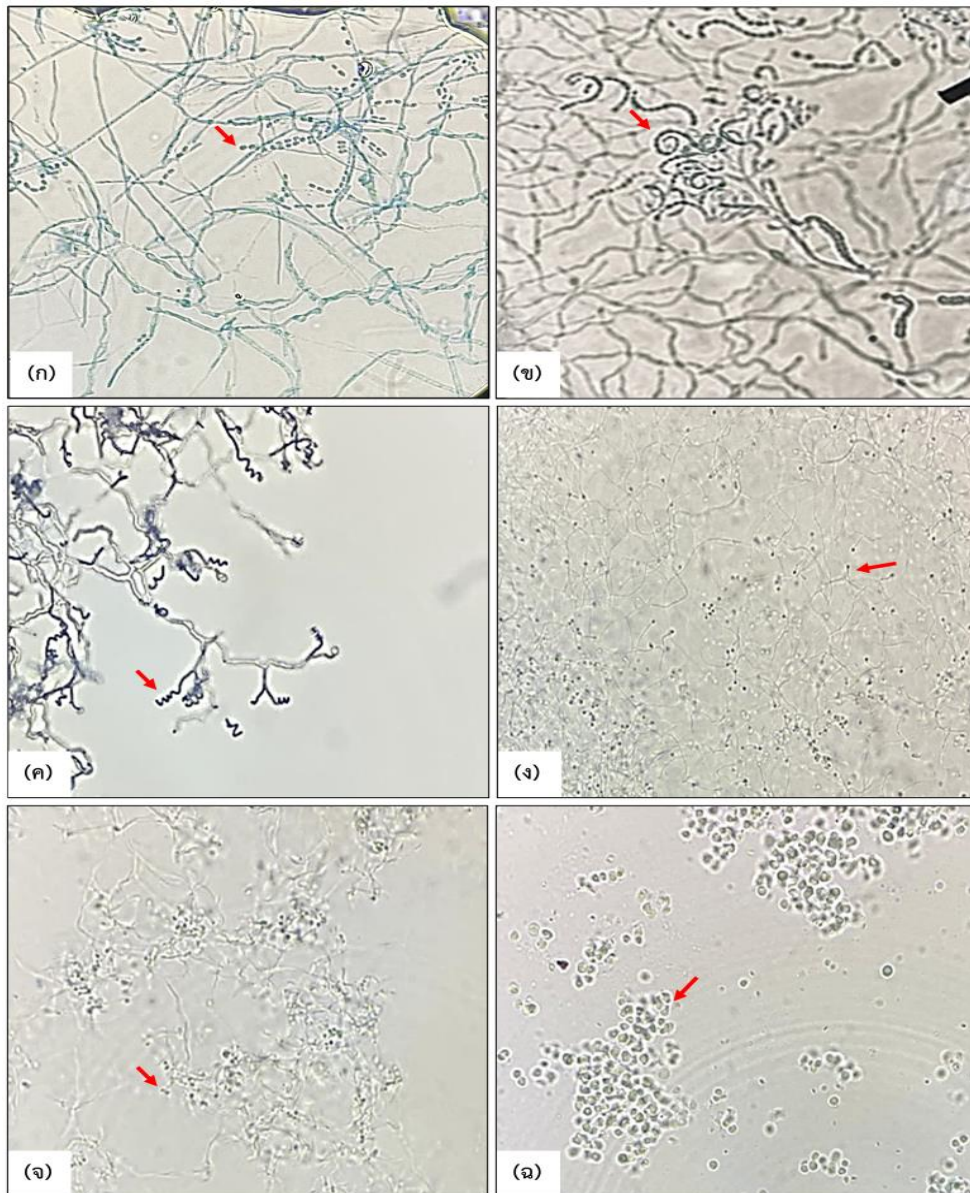


ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท MK3, MK32, RD12 และ RD14 จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลา 14 วัน



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย *Micromonospora* sp. RD19 *Micromonospora* sp. KR2 และ *Microbispora* sp. KR ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลา 14 วัน

พุ่ม ปณ ทิโต ชเว



ภาพที่ 5 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

(ก) สปอร์แบบเส้นตรง (rectiflexible) *Streptomyces* sp. KR8

(ข) สปอร์แบบแบบลูป (retinaculiaperti) *Streptomyces* sp. MK15

(ค) สปอร์แบบเวียนเกลียว (spiral) *Streptomyces* sp. KR23

(ง) สปอร์แบบสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร *Micromonospora* sp. RD19

(จ) สปอร์แบบคู่หรือสปอร์ 2 อัน *Microbispora* sp. KR9

(ฉ) สปอร์สองคู่ หรือสปอร์ 4 อัน *Quadrisphaera* sp. KR2

ตารางที่ 6 ลักษณะสัญญาณของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยแบคทีเรียที่คัดแยกจากข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลานาน 14 วัน

| กลุ่ม | สีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารบนอาหารทั้ง 3 ชนิด | | | จำนวน ไอโซเลท |
|-------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| | HPDA | ISP2 | ISP3 | |
| 1 | สีเทาอ่อน/ สีนํ้าตาล | สีเทาอ่อน / สีเหลืองอมนํ้าตาล | สีเทาขอบขาว/ สีนํ้าตาลอมเขียว | 24 |
| 2 | สีเทาเข้ม/สีเหลืองอมนํ้าตาล | สีเทาเข้ม /สีเหลืองอมนํ้าตาล | สีเทา/ สีนํ้าตาลอมเขียว | 6 |
| 3 | สีเทาอ่อน/ สีเหลือง | สีเทาอ่อน/ สีเหลือง | สีเทา/สีเหลืองอมนํ้าตาล | 11 |
| 4 | สีขาว/สีครีม | สีขาว/สีเหลืองอ่อน | สีขาว/สีขาว | 7 |
| 5 | สีเทาเข้ม/นํ้าตาลเทา | สีเทา/สีเหลืองอมนํ้าตาล | สีเทาเข้ม/สีนํ้าตาลอมเขียว | 4 |
| 6 | สีเทา/ สีนํ้าตาล | สีเทา/สีนํ้าตาลอมเขียว | สีนํ้าตาลอมดำ/สีนํ้าตาลอมดำ | 3 |
| 7 | สีเทา/สีเหลือง | สีเทา/สีชมพู | สีเทา/สีชมพู | 2 |
| 8 | สีเทา/ สีนํ้าตาล | สีขาว/สีครีม | สีเทา/ สีนํ้าตาล | 1 |
| 9 | สีเทาอมเขียวมรกต/ สีเขียวมรกต | สีเทาอมเขียวมรกต/ สีเขียวมรกต | สีเทาอมเขียวมรกต/ สีเขียวมรกต | 2 |
| 10 | สีเทาอมเหลือง/ สีแดงอมนํ้าตาล | สีนํ้าตาลอมส้ม / สีนํ้าตาลอมส้ม | สีเทาอมเขียว/ สีนํ้าตาลอมเหลือง | 2 |

ตารางที่ 6 ลักษณะสัญญาณของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่รีไซเคิลแยกจากข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร HPDA, ISP2 และ ISP3 เป็นเวลานาน 14 วัน (ต่อ)

| กลุ่ม | สีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารบนอาหารทั้ง 3 ชนิด | | | ไอโซเลท | จำนวน ไอโซเลท |
|-------|--|-------------------------------|-------------------------------|-----------|------------------|
| | HPDA | ISP2 | ISP3 | | |
| 11 | สีเทาอ่อน/สีแดงอมน้ำตาล | สีขาว/สีครีม | สีเทาอมแดง/สีเขียวอมออก | RD14 | 1 |
| 12 | สีขาว/ สีเหลืองอ่อน | สีขาว/ สีเหลืองอ่อน | สีขาว/ สีเหลืองอ่อน | RD12 | 1 |
| 13 | สีน้ำตาลอมดำ/ สีน้ำตาลอมดำ | สีน้ำตาลอมดำ/ สีน้ำตาลอมดำ | สีน้ำตาลอมดำ/ สีน้ำตาลอมดำ | MK32 | 1 |
| 14 | สีเทา/ สีน้ำตาล | สีขาว/สีน้ำตาลอมเหลือง | สีขาว/สีขาว | MK7 | 1 |
| 15 | สีส้ม/ สีส้ม | สีดำ/สีดำ | สีดำ/สีดำ | RD19 | 1 |
| 16 | สีส้ม/สีส้ม | สีส้มอมน้ำตาล/สีส้มอมน้ำตาล | สีส้ม/สีส้มอมเหลือง | KR2 | 1 |
| 17 | สีส้มอ่อน/ สีส้มอ่อน | สีส้มอ่อน/ สีส้มอ่อน | สีส้ม/ สีส้ม | RD1 | 1 |
| 18 | สีชมพูอ่อน/ สีชมพูเข้ม | สีส้ม/ สีส้ม | สีขาว/สีชมพู | MK28, KR9 | 1 |
| 19 | สีชมพู/สีน้ำตาล | สีชมพู/ สีชมพูเข้ม | สีขาว/ สีชมพูเข้ม | RD6 | 1 |
| 20 | สีส้ม/ สีส้ม | สีส้ม/ สีส้ม | สีส้ม/ สีส้ม | KR29 | 1 |

ตารางที่ 7 ผลการจำแนกตามลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

| กลุ่ม | ลักษณะสปอร์ | ไอโซเลท | จำนวนไอโซเลท |
|--------------------------|---|---|--------------|
| <i>Streptomyces</i> | แบบเวียนเกลียว (spiral) | KR3, KR6, KR32, KR33, MK2, MK3, MK6, MK9, MK12, MK14, MK16, MK21, MK23, MK31, KR28, RD7, RD11, RD16, RD20, RD22, RD23, RD28 | 22 |
| | แบบรูป (retinaculiaperti) | KR1, KR23, KR31, KR32, RD2, RD5, RD9, MK5, MK7, MK5, MK19, MK11, MK20, MK22, MK32, RD8, RD18, RD31 | 18 |
| | แบบเส้นตรง (rectiflexible) | KR8, KR10, KR13, KR16, KR20, KR21, KR23, KR26, KR31, MK8, MK10, MK15, MK17, MK18, MK24, MK25, MK27, MK29, MK30, RD3, RD4, RD12, RD14, RD21, RD29, RD32 | 26 |
| Non- <i>Streptomyces</i> | <i>Actinoplanes</i> (สปอร์อยู่ในถุง sporangium) | RD1 | 1 |
| | <i>Micromonospora</i> (มีสปอร์ 1 อัน) | KR2, RD19 | 2 |
| | <i>Microbispora</i> (มีสปอร์ 2 อัน) | MK28, KR9, RD6 | 3 |
| | <i>Quadrisphaera</i> (มีสปอร์ 4 อัน) | KR29 | 1 |

4.1.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลยีน 16S rRNA

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานเบื้องต้นของแอกติโนแบคทีเรีย 73 ไอโซเลท จำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียได้ 20 กลุ่ม พบว่าจำนวน 14 กลุ่มย่อย จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งตัวแทนของแต่ละกลุ่มประกอบด้วยไอโซเลท MK1, MK3, MK5, MK7, MK9, MK12, MK20, MK32, RD2, RD3, RD12, RD14, RD28 และ RD31 ได้นำมาศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล EZBioCloud ดังแสดงในตารางที่ 8 จากการเปรียบเทียบพบว่า

กลุ่มที่ 1 ที่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773^T คือ ไอโซเลท MK1, MK9, MK20 และ RD3 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.8, 100, 100 และ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T คือ ไอโซเลท MK12 และ RD28 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 และ 99.7 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces naganishii* NBRC 12892^T คือ ไอโซเลท MK5 และ MK7 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.4 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 4 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces malaysiense* MUSC 136^T คือ ไอโซเลท RD31 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.8 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T คือ ไอโซเลท MK32 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.6 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 6 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^T คือ ไอโซเลท MK3 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.6 เปอร์เซ็นต์

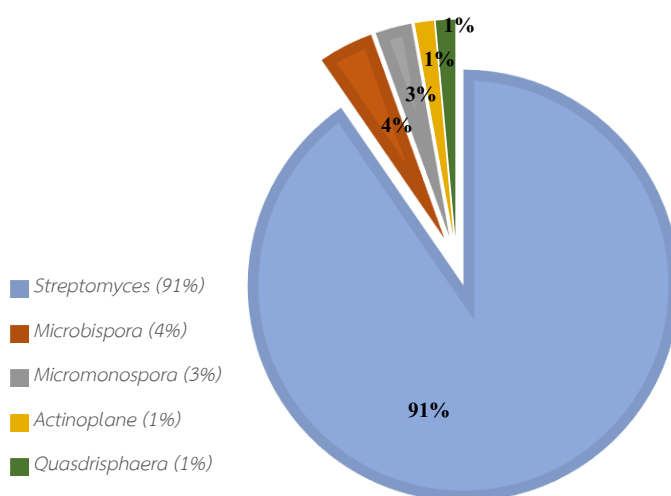
กลุ่มที่ 7 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces albogriseolus* NRRL B-1305^T คือ ไอโซเลท RD2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 8 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces tendae* ATCC 19812^T คือ ไอโซเลท RD14 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 9 ไอโซเลทที่ใกล้เคียงกับ *Streptomyces xylanilyticus* SR2-123^T คือ ไอโซเลท RD12 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.3 เปอร์เซ็นต์

กลุ่ม *Non-Streptomyces* มีจำนวน 6 กลุ่ม ซึ่งตัวแทนของแต่ละกลุ่มประกอบด้วยไอโซเลท KR2, KR9, KR29, RD1, RD6 และ RD19 จัดอยู่ใน 4 สกุล คือ *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Quadrisphaera*

โดยไอโซเลท RD1 มีความใกล้เคียงกับ *Actinoplanes lichenis* LDG1-22^T (98.2%) ไอโซเลท RD19 มีความใกล้เคียงกับ *Micromonospora soli* SL3-70^T (100%) ไอโซเลท KR2 มีความใกล้เคียงกับ *Micromonospora purpureochromogenes* DSM 43821^T (99.2%) ไอโซเลท KR9 มีความใกล้เคียงกับ *Microbispora clausenae* CLES2^T (99.8%) ไอโซเลท RD6 มีความใกล้เคียงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2^T (99.9%) ไอโซเลท KR29 มีความใกล้เคียงกับ *Quadrisphaera oryzae* RL12-15^T (99.6%) จากการจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างข้าว แสดงสัดส่วนของไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 5 สกุล ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนภูมิวงกลมแสดงความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างข้าวมะลิจำนวน 5 สกุล

4.1.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* จำนวน 14 ไอโซเลท กับสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียง โดยมี *Embleya scabrisporus* DSM 41855^T เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (out group) โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA โดยวิธี Maximum-likelihood (ML) (ภาพที่ 7) และ Neighbor joining (NJ) (ภาคผนวก ข ภาพที่ 1) จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA โดยวิธี ML พบว่ามีจำนวน clade ของแผนภูมิต้นไม้แยกออกเป็นจำนวน 6 clade โดยไอโซเลท MK1, MK9, MK20 และ RD3 อยู่ใน Clade เดียวกัน ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลทมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และมีเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงคือ *S. ardesiacus* NRRL B-1773^T และมีค่าความเหมือนของยีน 16S rRNA กับสายพันธุ์มาตรฐาน 99.8, 100, 100 และ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลท MK32 และ RD31 อยู่ใน clade เดียวกัน และมีเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียง คือ *S. malaysiense* MUSC 136^T และมีค่าความเหมือนของยีน 16S rRNA กับสายพันธุ์มาตรฐาน 99.6 และ 99.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและไอโซเลท MK5 และ MK7 อยู่ใน clade เดียวกัน และมีเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียง คือ *S. griseicoloratus* TRM S81-3^T และมีค่าความเหมือนของยีน 16S rRNA กับสายพันธุ์มาตรฐานเท่ากับคือ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Streptomyces* sp. ไอโซเลทอื่น ๆ จะแยกอยู่ในตำแหน่งที่อยู่เดี่ยว โดยมีตำแหน่งที่ใกล้ชิดกับสายพันธุ์มาตรฐานของแต่ละไอโซเลท และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่ม Non-*Streptomyces* ทั้ง 6 ไอโซเลท กับสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกัน โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML (ภาพที่ 8) และ NJ (ภาคผนวก ข ภาพที่ 2) แผนภูมิต้นไม้แยกออกเป็นจำนวน 4 clade แบ่งเป็น 4 สกุล ซึ่งประกอบด้วย *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Microbispora* และ *Quadrisphaera* ไอโซเลท RD1 มีความใกล้ชิดกับ *Nucisporomicrobium flavum* NEAU-24^T มีความน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Nucisporomicrobium* และไอโซเลท KR29 มีตำแหน่งที่อยู่ห่างจากสายพันธุ์มาตรฐานในสกุล *Quadrisphaera* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไอโซเลท KR9 และ RD6 มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์มาตรฐาน *M. clausenae* CLES2^T (99.8%) และ *M. bryophytorum* NEAU-TX2-2^T (99.9%) ไอโซเลท KR2 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA กับ *Micromonospora purpureochromogenes* DSM 43821^T (99.2%) ซึ่งตำแหน่งของ KR2 บนแผนภูมิต้นไม้แยกห่างออกจาก clade ของสายพันธุ์มาตรฐาน ส่วนไอโซเลท RD19 มีความเหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน *Micromonospora soli* SL3-70^T เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีตำแหน่งอยู่ใน clade เดียวกันกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 8 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเอนโดไฟติกแอสโคดีโนแบบคทีเรีย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตุลาตราฐานที่ผลิตจำนวน 3 สายพันธุ์

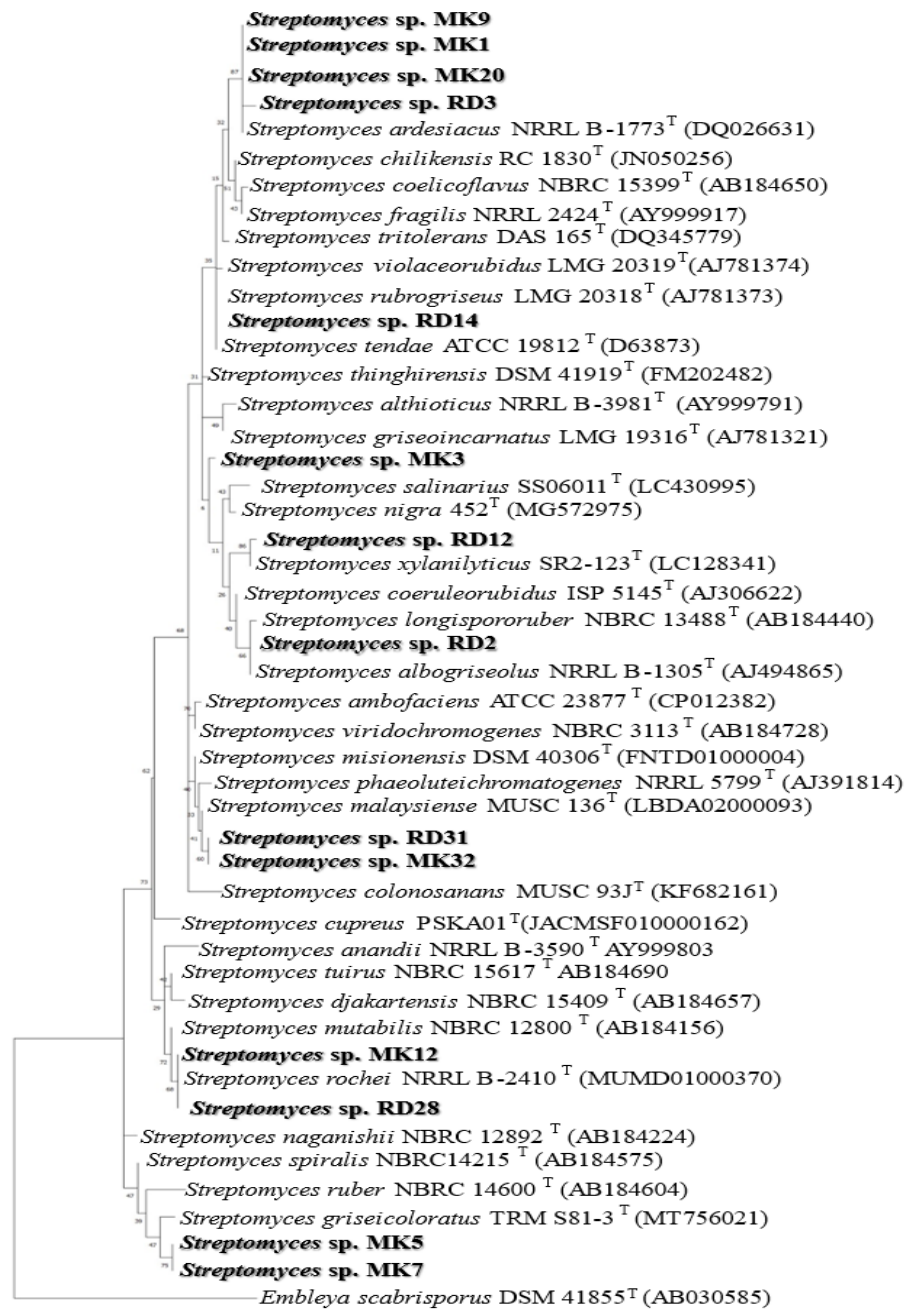
| กลุ่มที่ | ตัวแทน | สายพันธุ์ผลิตลำดับ 1 | สายพันธุ์ผลิตลำดับ 2 | สายพันธุ์ผลิตลำดับ 3 |
|----------|--------|--|--|---|
| 1 | RD3 | <i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T (99.9) | <i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (99.2%) | <i>Streptomyces salinaris</i> SS06011 ^T (98.9%) |
| 2 | MK20 | <i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T (100%) | <i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (99.3%) | <i>Streptomyces chilikensis</i> RC 1830 ^T (99.3%) |
| 3 | MK12 | <i>Streptomyces rochei</i> NRRL B- 2410 ^T (100%) | <i>Streptomyces mutabilis</i> NBRC 12800 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces tuiirus</i> NBRC 15617 ^T (99.4%) |
| 4 | MK9 | <i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T (100%) | <i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (99.2%) | <i>Streptomyces salinaris</i> SS06011 ^T (99.0%) |
| 5 | MK1 | <i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T (99.8%) | <i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T (99.0%) | <i>Streptomyces salinaris</i> SS06011 ^T (98.9%) |
| 6 | MK5 | <i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892 ^T (99.4%) | <i>Streptomyces griseicoloratus</i> TRMS81-3 ^T (99.2%) | <i>Streptomyces spiralis</i> NBRC 14215 ^T (98.9%) |
| 7 | RD28 | <i>Streptomyces rochei</i> NRRL B- 2410 ^T (99.73%) | <i>Streptomyces mutabilis</i> NBRC 12800 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces tuiirus</i> NBRC 15617 ^T (99.1%) |

ตารางที่ 8 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอมโมไนต์ที่พบในดินแอมโมไนต์ที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดจำนวน 3 สายพันธุ์ (ต่อ)

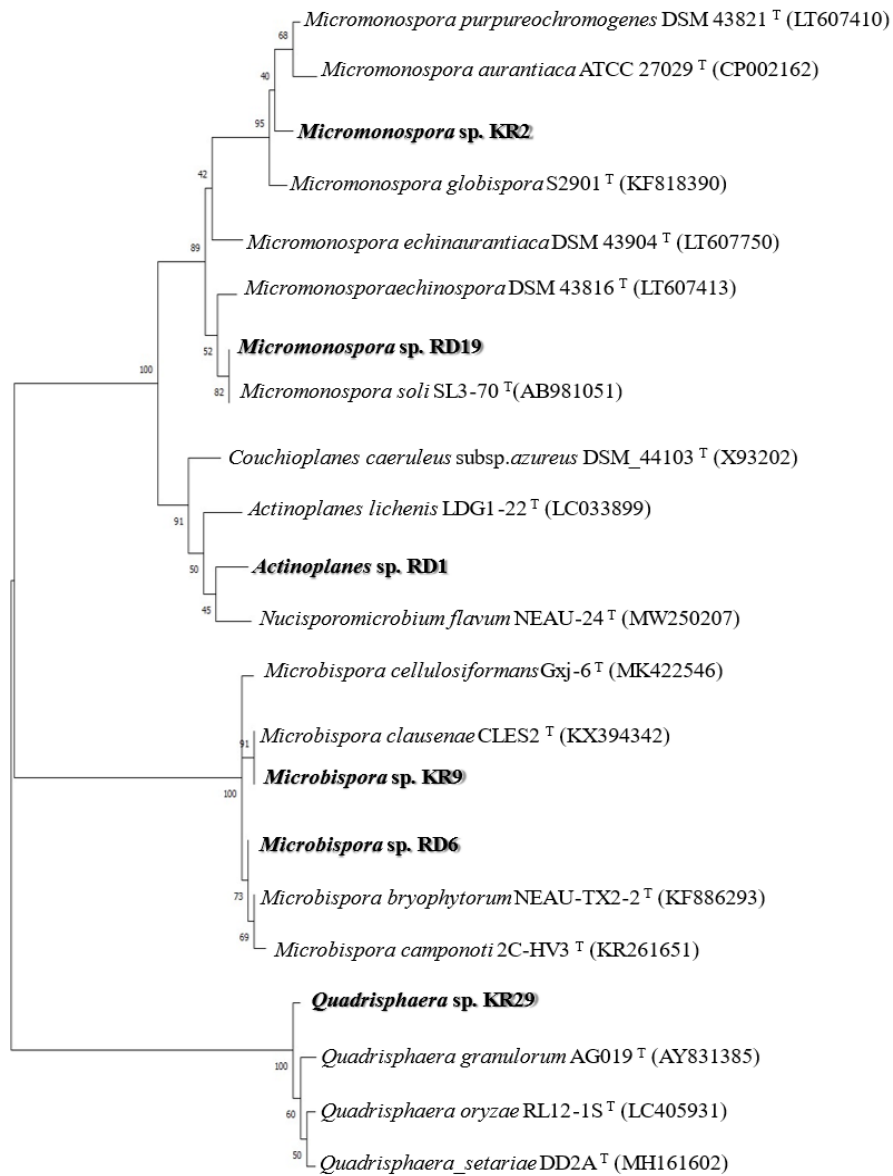
| กลุ่มที่ | ตัวแทน กลุ่ม | สายพันธุ์ใกล้ชิดลำดับ 1 | สายพันธุ์ใกล้ชิดลำดับ 2 | สายพันธุ์ใกล้ชิดลำดับ 3 |
|----------|-----------------|--|--|---|
| 8 | RD31 | <i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136 ^T (99.8%) | <i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T (99.7%) | <i>Streptomyces phaeolutei-</i> <i>Chromatogenes</i> NRRL 5799 ^T (99.6%) |
| 9 | MK3 | <i>Streptomyces viridochromo-</i> <i>genes</i> NBRC 3113 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces nigra</i> 452 ^T (99.5%) | <i>Streptomyces althioticus</i> NRRLB- 3981 ^T (99.3%) |
| 10 | RD2 | <i>Streptomyces albogriseolus</i> NRRL B-1305 ^T (100%) | <i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC 13488 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316 ^T (99.5%) |
| 11 | RD14 | <i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812 ^T (100%) | <i>Streptomyces violaceorubridus</i> LMG 20319 ^T (99.9%) | <i>Streptomyces tritolerans</i> DAS 165 ^T (99.8%) |
| 12 | RD12 | <i>Streptomyces xylanilyticus</i> SR2- 123 ^T (99.3%) | <i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919 ^T (98.5%) | <i>Streptomyces coeruleorubridus</i> ISP 5145 ^T (98.5%) |
| 13 | MK32 | <i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136 ^T (99.6%) | <i>Streptomyces</i> <i>phaeoluteichromatogenes</i> NRRL 5799 ^T (99.4%) |
| 14 | MK7 | <i>Streptomyces naganishii</i> NBRC12892 ^T (99.5%) | <i>Streptomyces griseicoloratus</i> TRM S81-3 ^T (99.2%) | <i>Streptomyces spiralis</i> NBRC 14215 ^T (99.0%) |

ตารางที่ 8 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอนโดไฟติกแอสโคดีโนไมต์ที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดจำนวน 3 สายพันธุ์ (ต่อ)

| กลุ่มที่ | ตัวแทน | สายพันธุ์ใกล้เคียงลำดับ 1 | สายพันธุ์ใกล้เคียงลำดับ 2 | สายพันธุ์ใกล้เคียงลำดับ 3 |
|----------|--------|---|--|--|
| 15 | RD19 | <i>Micromonospora soli</i> SL3-70 ^T (100%) | <i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 ^T (99.55%) | <i>Micromonospora</i> <i>echinaurantiaca</i> DSM 43904 ^T (99.40%) |
| 16 | KR2 | <i>Micromonospora</i> <i>purpureochromogenes</i> DSM 43821 ^T (99.2%) | <i>Micromonospora globispora</i> S2901 ^T (99.2%) | <i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T (99.0%) |
| 17 | RD1 | <i>Nucisporomicrobium flavum</i> NEAU-24 ^T (98.7%) | <i>Couchioplanes caeruleus</i> subsp. <i>azureus</i> DSM 44103 ^T (98.4%) | <i>Actinoplanes lichenis</i> LDG1-22 ^T (98.2%) |
| 18 | KR9 | <i>Microbispora clausenae</i> CLES2 ^T (99.8%) | <i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 ^T (99.5%) | <i>Microbispora camponoti</i> 2C- HV3 ^T (99.4%) |
| 19 | RD6 | <i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 ^T (99.9%) | <i>Microbispora camponoti</i> 2C- HV3 ^T (99.7%) | <i>Microbispora cellulosisformans</i> Gxj-6 ^T (99.6%) |
| 20 | KR29 | <i>Quadrisphaera oryzae</i> RL12-1S ^T (99.6%) | <i>Quadrisphaera setariae</i> DD2A ^T (99.4%) | <i>Quadrisphaera granulorum</i> AG019 ^T (99.0%) |



ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ *Streptomyces* จำนวน 14 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกันโดยมี *Embleya scabrisporus* DSM 41855^T เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ



0.010

ภาพที่ 8 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ non-*Streptomyces* จำนวน 6 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ

4.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ใน 3 สกุล คือ *Streptomyces* คือ ไอโซเลท MK5 และ MK7 สกุล *Quadrisphaera* คือ ไอโซเลท KR29 และ สกุล *Actinoplanes* คือ ไอโซเลท RD1 เนื่องจากมีความเหมือนของยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับสายพันธุ์มาตรฐานน้อยกว่า 99.7 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al., 2014)

4.2.1 *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7

Streptomyces สายพันธุ์ MK5 และ MK7 ถูกคัดแยกจากเนื้อเยื่อรากที่พอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* KDML 105) โดยเจริญขึ้นมาจากชิ้นส่วนรากหลังจากบ่มเป็นเวลา 2 อาทิตย์ โดยใช้อาหารร่วน Humic acid vitamin B เก็บเซลล์ในอาหารร่วนเอียงที่ 4 องศาเซลเซียส และเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

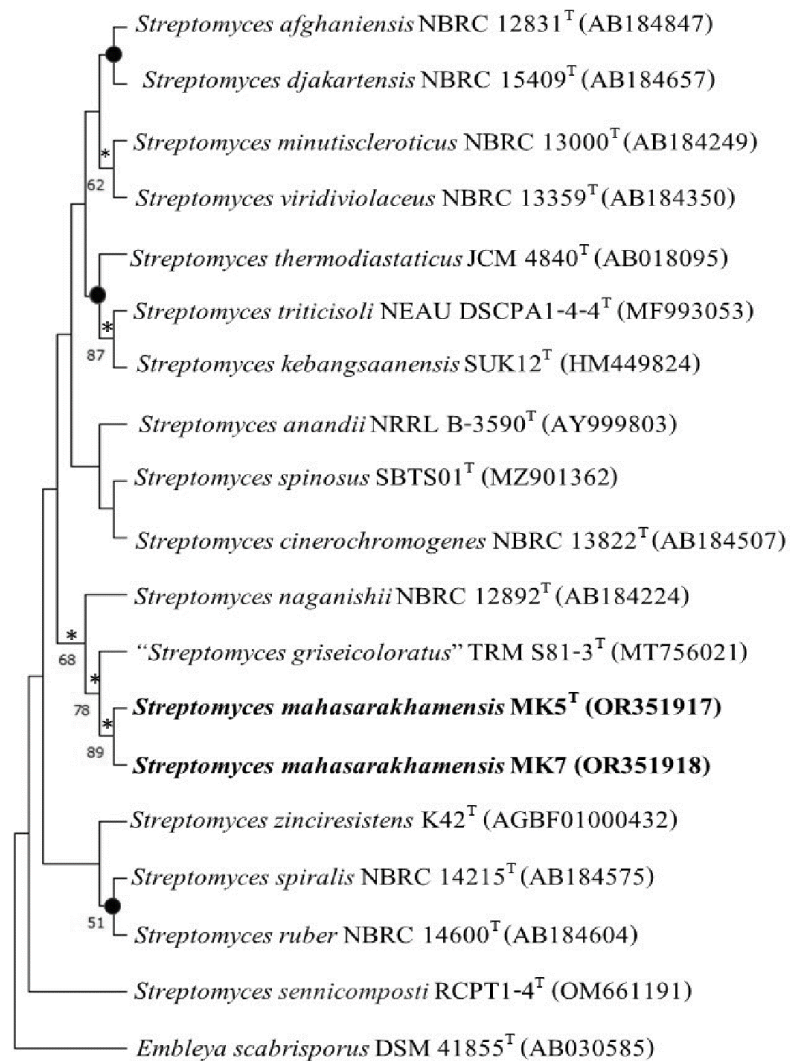
4.2.1.1 ลักษณะทางจีโนมไทป์ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7

1. ค่าความเหมือนของยีน 16S rRNA

ค่าความเหมือนลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และทั้ง 2 สายพันธุ์มีความเหมือนของยีน 16S rRNA กับสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์ คือ *Streptomyces naganishii* NBRC 12892^T (99.4%), *Streptomyces griseicoloratus* TRM S81-3^T (99.2%), *Streptomyces spiralis* NBRC 14215^T (98.9%) และ *Streptomyces ruber* NBRC 14600^T (98.8%)

ตำแหน่งของแผนภูมิต้นไม้ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 อยู่ใน clade เดียวกัน แผนภูมิต้นไม้ที่สร้างโดยวิธี Maximum-likelihood (ML) (ภาพที่ 9) และ Neighbor joining (NJ) (ภาคผนวก ข ภาพที่ 5) และถูกล้อมรอบโดยสปีชีส์อื่น ๆ ที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* (ภาพที่ 9) และมีเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงมากที่สุดคือ *Streptomyces griseicoloratus* TRM S81-3^T และ *Streptomyces naganishii* NBRC 12892^T

พหุ ประถมศึกษา



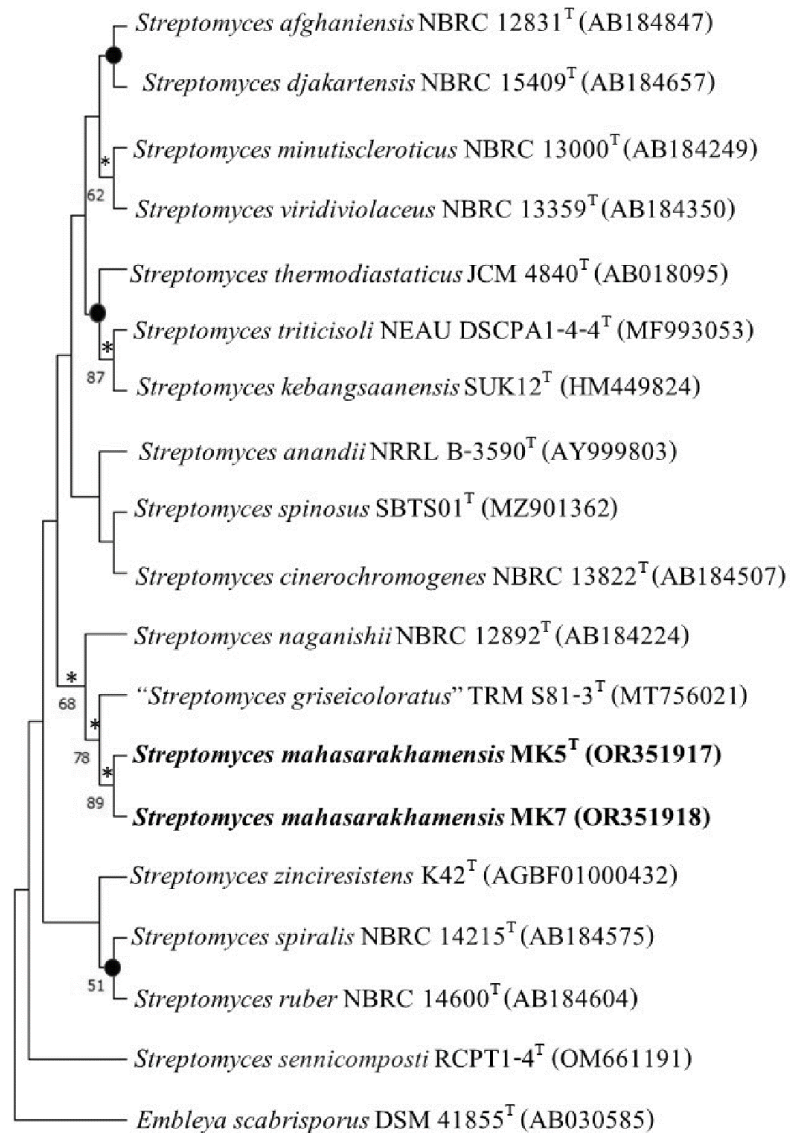
ภาพที่ 9 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้ชิดกับ *Embleya scabrisporus* DSM 41855^T เป็น out group เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ (* คือ ตำแหน่งที่เหมือนกันของ ML และ NJ trees)

2. ลักษณะของจีโนม (Genome characterization)

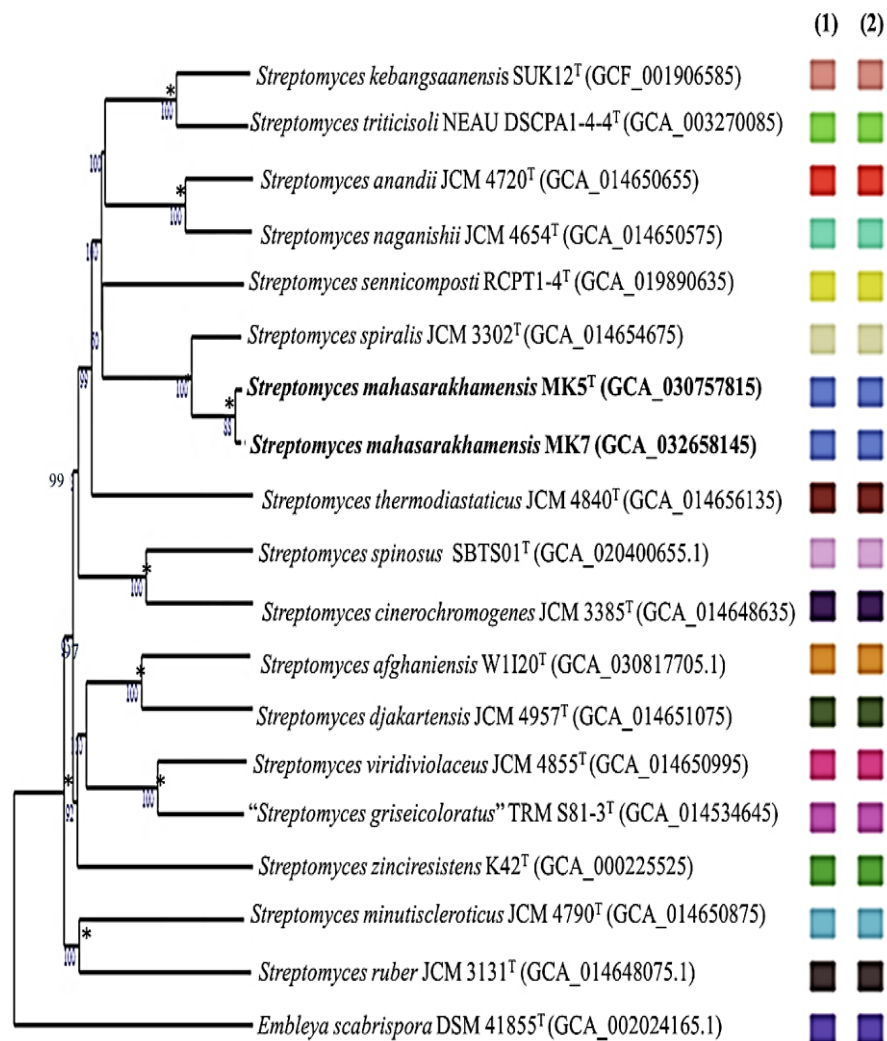
ทำการประกอบจีโนมของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 และนำไปฝากข้อมูลไว้ที่ GenBank โดยมี accession number คือ JAUQWI000000000 และ JAVACL000000000 ตามลำดับ ขนาดจีโนมของสายพันธุ์ MK5^T เท่ากับ 8.77 Mbp (million base pair) โดยมีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 71.4 mol% และจำนวนโปรตีนเท่ากับ 7843 ขนาดจีโนมของสายพันธุ์ MK7 เท่ากับ 8.89 Mbp และมีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 70.4 mol% (mole percent) และจำนวนโปรตีนเท่ากับ 7886 จะเห็นได้ว่าปริมาณเบส G+C content ของทั้งสองสายพันธุ์นี้อยู่ในช่วงของสายพันธุ์ที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด ในช่วง 71.0 ถึง 73.1 เปอร์เซ็นต์

3. การเปรียบเทียบจีโนมของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7

การเปรียบเทียบจีโนมของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 พบว่ามีค่า ANIb, ANIm และ dDDH, เท่ากับ 99.2, 99.5, และ 95.3 เปอร์เซ็นต์ จากผลการเปรียบเทียบพบว่าสายพันธุ์ MK5 และ MK7 จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่กำหนดความแตกต่างของสปีชีส์ที่ค่า cut off ของ dDDH ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ (Meier-Kolthoff et al., 2013; Chun et al., 2018) และจากรายงานของ Richter and Rossello-Mora (2009) ค่า ANI ที่มีค่าต่ำกว่า 95-96 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสปีชีส์ที่ต่างกัน จึงใช้สายพันธุ์ MK5^T เป็นตัวแทนในการศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงที่สุดกับสายพันธุ์ MK5^T คือ *Streptomyces spiralis* NBRC 14215^T มีค่าเท่ากับ 93.4, 95.5 และ 61.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงลำดับถัดไปคือ *Streptomyces sennicomposti* RCPT1-4^T เท่ากับ 85.2, 88.6 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันของยีน 16S rRNA สูงสุด คือ *S. naganishii* NRRL ISP-5282^T มีค่าเท่ากับ 85.0, 88.4 และ 31.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า ANIb, ANIm และ dDDH ต่ำกว่าเกณฑ์เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นจากการสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างด้วย Type Strain Genome Server (TYGS) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ MK5 และ MK7 อยู่ใน clade เดียวกัน โดยมี *S. spiralis* NBRC 14215^T เป็นเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุด (ภาพที่ 10) แต่มี species cluster ที่แตกต่างกัน จากการศึกษารูปเปรียบเทียบจีโนมและความใกล้เคียงกันของยีน 16S rRNA จึงทำการเลือกสายพันธุ์มาตรฐาน *S. Spiralis* NBRC 14215^T, *S. sennicomposti* RCPT1-4^T และ *S. naganishii* NRRL ISP-5282^T สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลฟีโนไทป์กับสายพันธุ์ MK5^T



ภาพที่ 9 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML แสดงตำแหน่งของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกับ *Embleya scabrissporus* DSM 41855T เป็น out group เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ (* คือ ตำแหน่งที่เหมือนกันของ ML และ NJ trees)



(1) Species cluster; (2) Subspecies cluster

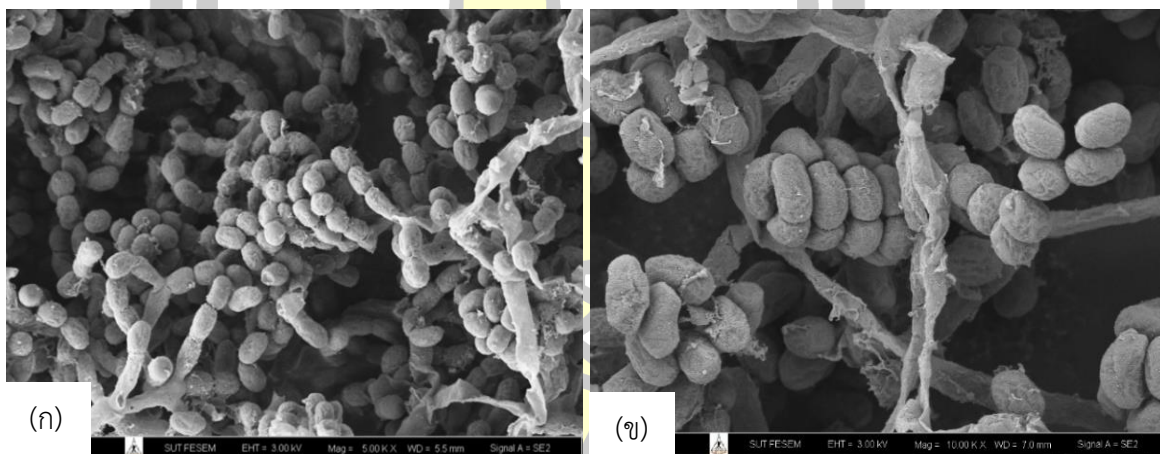
ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน ในสกุล *Streptomyces* และ *Embleya scabriscpora* DSM41855^T เป็น out group ค่า GBDP pseudo-bootstrap support > 60 เปอร์เซ็นต์ จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ

4.2.1.2 การจำแนกด้วยลักษณะฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7

1. ลักษณะสัณฐานและลักษณะทางสรีรวิทยาของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7

สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่จำแนกได้ในสกุล *Streptomyces* มีการสร้างเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศได้ดี (ตารางที่ 9) จากภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะสายโซ่สปอร์ที่เรียงตัวแบบเกลียวปิด (close spiral) มีขนาดยาวประมาณ 0.75 ไมโครเมตร และกว้าง 1 ไมโครเมตร และมีผิวสปอร์เรียบ (ภาพที่ 11) ลักษณะทางโคโลนีของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 ที่เจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน 8 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 9

การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 พบว่ามีความแตกต่างกันในการผลิตกรดจากน้ำตาลมอลโทส และซูโครส การใช้กรดอินทรีย์ชนิดมาเลท การย่อยแขนหิน และยูเรีย และการใช้สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) คือ โทลูอีน เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้สีของเส้นใยอากาศของทั้งสองสายพันธุ์ยังแตกต่างกันบนอาหาร ISP2, ISP7 และ Bennet agar ดังแสดงตารางที่ 9 และ 10



ภาพที่ 11 ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T (ก) และ MK7 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เจริญบนอาหาร HPDA นาน 7 วัน

พูน ปณ ทิโต ชีเว

ตารางที่ 9 ลักษณะการเจริญของ *Streptomyces mahasarakhamensis* MK5^T และ *Streptomyces mahasarakhamensis* MK7 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ที่ 27 องศาเซลเซียส

| อาหาร | ลักษณะ | สายพันธุ์ MK5 ^T | สายพันธุ์ MK7 |
|--------|-------------|----------------------------|------------------|
| ISP2 | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| | เส้นใยอากาศ | สีเทา | สีน้ำตาลหม่นเทา |
| ISP3 | เส้นใยอาหาร | สีน้ำตาล | สีน้ำตาล |
| | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| ISP4 | เส้นใยอากาศ | สีเทา | สีเทา |
| | เส้นใยอาหาร | สีเทา | สีเทา |
| ISP5 | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| | เส้นใยอากาศ | สีเทาเข้ม | สีเทาเข้ม |
| ISP7 | เส้นใยอาหาร | สีเทาเข้ม | สีเทาเข้ม |
| | การเจริญ | เจริญได้ปานกลาง | เจริญได้ปานกลาง |
| Bennet | เส้นใยอากาศ | สีขาว | สีขาว |
| | เส้นใยอาหาร | สีขาว | สีขาว |
| HPDA | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| | เส้นใยอากาศ | สีน้ำตาล | สีเทา |
| NA | เส้นใยอาหาร | สีน้ำตาล | สีน้ำตาลเข้ม |
| | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| HPDA | เส้นใยอากาศ | สีน้ำตาล | สีเทาอ่อน |
| | เส้นใยอาหาร | สีเหลืองอมน้ำตาล | สีเหลืองอมน้ำตาล |
| NA | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| | เส้นใยอากาศ | สีเทาหม่นขาว | สีเทา |
| NA | เส้นใยอาหาร | สีเหลืองอมเทา | สีเหลืองอมเทา |
| | การเจริญ | เจริญได้ดี | เจริญได้ดี |
| NA | เส้นใยอากาศ | สีขาว | สีขาว |
| | เส้นใยอาหาร | สีครีม | สีครีม |

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสรีรวิทยาของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7

| ลักษณะ | MK5 ^T | MK7 | ลักษณะ | MK5 ^T | MK7 |
|----------------------------------|------------------|-----|---------------------------|------------------|-------|
| การผลิตกรด | | | การย่อย | | |
| อะราบิโนส (arabinose) | + | + | อะซิเตท (Acetate) | + | + |
| เซลโลไบโอส (cellobiose) | + | + | เบนโซเอต (benzoate) | - | - |
| กาแลคโตส (galactose) | + | + | ซิเตรท (citrate) | + | + |
| ดูซิทอล (ducitol) | - | - | แลคเตท (lactate) | + | + |
| ฟรุคโตส (fructose) | + | + | มาเลต (Malate) | + | - |
| กลูโคส (glucose) | + | + | โพรไพโอเนต (propionate) | + | + |
| มอลโทส (maltose) | + | - | ทาร์เทรต (tartrate) | - | - |
| แมนนิทอล (Mannitol) | + | + | เอสคูลิน (esculin) | - | - |
| แมนโนส (mannose) | + | + | ฮิปพูเรท (hippurate) | - | - |
| อินซิทอล (Myo-inositol) | + | + | แป้ง (starch) | - | - |
| แรมโนส (rhamnose) | + | + | หางนม (skim milk) | + | + |
| ไรโบส (ribose) | + | + | อะดีนีน (adenine) | + | + |
| ซอร์บิทอล (sorbitol) | - | - | ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) | + | + |
| ซูโครส (sucrose) | + | - | ไทโรซีน (tyrosine) | + | + |
| ทรีฮาโลส (trehalose) | + | + | แซนทีน (xanthine) | + | w |
| ไซโลส (xylose) | + | + | ยูเรีย (urea) | + | - |
| การใช้แหล่งคาร์บอน (ISP9) | | | ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) | - | - |
| อะราบิโนส (arabinose) | + | + | ไพริดีน (pyridine) | + | + |
| ฟรุคโตส (fructose) | + | + | โทลูอีน (toluene) | + | - |
| อินซิทอล (Myo-inositol) | + | + | เบนซีน (benzene) | + | + |
| แรมโนส (rhamnose) | + | + | การเจริญที่ | | |
| ราฟฟิโนส (Raffinose) | + | + | อุณหภูมิ (°C) | 15-37 | 15-37 |
| ไซโลส (D-Xylose) | + | + | พีเอช (pH) | 5-10 | 5-10 |
| | | | ความเข้มข้นเกลือ (% NaCl) | 10 | 10 |

หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1, สายพันธุ์ MK5^T; 2, สายพันธุ์ MK7 +, ให้ผลเป็นบวก ; w, ให้ผลน้อย; -, ให้ผลเป็นลบ

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกับสายพันธุ์มาตรฐาน

สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 แตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน *S. spiralis* NBRC 14215^T โดยมีลักษณะของเส้นใยอาหารในการเจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, และ ISP7 ทั้ง 2 สายพันธุ์แตกต่างกันในการผลิตกรดจากน้ำตาลอินซิทอล และไซโลส การย่อยโปรตีนเคซีนจากหางนมและการเจริญที่พีเอช และอุณหภูมิที่ต่างกัน (ตารางที่ 11)

4.2.1.3 ลักษณะทางเคมี

1. ชนิดของ DAP ในเซลล์

สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 มีชนิดของ LL-isomer ซึ่งสอดคล้องกับสมาชิกอื่น ๆ ที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* (ภาคผนวก ข ภาพที่ 6)

2. ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์

พบน้ำตาลกาแลกโทส และกลูโคส และแมนโนสในเซลล์ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 (ภาคผนวก ข ภาพที่ 7)

3. ชนิดของ Phospholipid

พบชนิดของไขมันแบบมีหัวในเซลล์ของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 เป็นแบบเดียวกันคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyl glycerol (PG) (ภาคผนวก ข ภาพที่ 8) และไขมันที่ไม่สามารถจำแนกได้ โดยจัดอยู่ในกลุ่ม 2 (phospholipid type II) (Lechevalier et al., 1977)

4. ชนิดของ isoprenoid quinones

สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 มีชนิดของเมนาควิโนนที่เป็นส่วนประกอบหลัก คือ MK-9(H₆) และพบชนิด MK-9(H₄) ในปริมาณน้อย

5. ชนิดของกรดไขมัน

กรดไขมันที่วิเคราะห์ในรูปแบบ Fatty acid methyl ethers (FAMES) สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 มีชนิดของกรดไขมันแบบ *iso-anteiso-branched type* (ตารางที่ 12) ซึ่งมีกรดไขมันหลัก (>10%) ของสายพันธุ์ MK5^T คือ *anteiso-C*_{15:0} 20.2 เปอร์เซ็นต์, *iso-C*_{16:0} 21.7 เปอร์เซ็นต์ และ *anteiso-C*_{17:0} 20.2 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ MK7 ประกอบด้วย *anteiso-C*_{15:0} 22.3 เปอร์เซ็นต์, *anteiso-C*_{17:0} 22.2 เปอร์เซ็นต์ และ *iso-C*_{16:0} 19.5 เปอร์เซ็นต์, *iso-C*_{16:0} 51.6 เปอร์เซ็นต์, *anteiso-C*_{15:0} 13.0 เปอร์เซ็นต์ และ *iso-C*_{16:1} H 12.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งรูปแบบของชนิดของกรดไขมันนั้นมีรูปแบบเดียวกันกับสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 12)

จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่า สายพันธุ์ MK5^T เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ และตั้งชื่อว่า *Streptomyces mahasarakhamensis* sp. nov.

ตารางที่ 11 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 และสายพันธุ์มาตรฐาน

| ลักษณะการเจริญ | 1 | 2 | 3 | 4 ^a | 5 |
|---------------------------|-----------|--------------|------------------|----------------------|--------------|
| เส้นใยอาหาร | | | | | |
| ISP 2 | สีน้ำตาล | สีน้ำตาล | สีส้มเหลืองเข้ม | สีน้ำตาลอมเหลืองอ่อน | สีแดง |
| ISP 3 | สีเทา | สีเทา | สีเหลืองส้มอ่อน | สีน้ำตาลอมเหลือง | สีแดง |
| ISP 4 | สีเทาเข้ม | สีเทาเข้ม | สีน้ำตาลอมเหลือง | สีเหลืองอมเขียวอ่อน | สีเทาน้ำตาล |
| ISP5 | สีขาว | สีขาว | สีเหลืองอ่อน | สีเหลืองแกมเขียว | สีครีม |
| ISP7 | สีน้ำตาล | สีน้ำตาลเข้ม | สีน้ำตาลแดง | สีเหลืองส้ม | สีน้ำตาลเข้ม |
| การผลิตกรด | | | | | |
| อิโนซิทอล | + | + | - | + | + |
| ซูโครส | + | - | + | - | + |
| ไซโลส | + | + | - | + | + |
| การใช้แหล่งคาร์บอน | | | | | |
| แรมโนส | + | + | + | - | + |
| ราฟฟิโนส | + | + | + | - | + |
| การย่อย | | | | | |
| ยูเรีย | + | - | + | + | - |
| หางนม | + | + | - | + | + |
| การเจริญที่ | | | | | |
| อุณหภูมิ (°C) | 15-37 | 15-37 | 15-45 | 15-47 | 27-37 |
| พีเอช | 5-10 | 5-10 | 6-10 | 5-10 | 5-10 |
| ความเข้มข้นของเกลือ | 10 | 10 | 7 | 6 | 3 |
| สูงสุด (%w/v) | | | | | |

หมายเหตุ: 1. สายพันธุ์ MK5^T; 2. สายพันธุ์ MK7; 3. *S. spiralis* NBRC 14215^T; 4. *S. sennicomposti* RCPT1-4^T; 5. *S. naganishii* NRRL ISP-5282^T. +; ผลบวก, -; ผลลบ ^a ข้อมูลได้จาก (Duangupama et al., 2022)

ตารางที่ 12 ปริมาณของกรดไขมัน (%) ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7

| ชนิดของกรดไขมัน | MK5 ^T (%) | MK7 (%) |
|--------------------------------------|----------------------|---------|
| <i>iso</i> -C _{14:0} | 2.5 | 2.1 |
| C _{14:0} | 0.2 | 0.2 |
| <i>iso</i> -C _{15:0} | 9.3 | 9.6 |
| <i>anteiso</i> -C _{15:0} | 20.2 | 22.3 |
| w8c-C _{15:0} | 0.3 | - |
| w8c-C _{15:1} | - | 0.1 |
| w6c-C _{15:1} | - | 0.4 |
| <i>iso</i> H-C _{16:0} | 2.50 | - |
| <i>iso</i> -C _{16:0} | 21.7 | 19.5 |
| C _{16:0} | 2.7 | 2.6 |
| <i>iso</i> H-C _{16:1} | - | 2.4 |
| <i>anteiso</i> w9c-C _{17:1} | 3.0 | 2.7 |
| <i>iso</i> -C _{17:0} | 7.7 | 8.1 |
| <i>anteiso</i> -C _{17:0} | 20.2 | 22.2 |
| w8c-C _{17:1} | 0.4 | 0.3 |
| cyclo-C _{17:0} | 0.6 | 0.7 |
| C _{17:0} | 0.4 | 0.4 |
| <i>iso</i> w5c-C _{17:1} | - | 0.1 |
| 2OH-C _{16:1} | 0.2 | - |
| <i>iso</i> H-C _{18:1} | 0.2 | 0.1 |
| <i>iso</i> -C _{18:0} | 1.0 | 1.0 |
| w9c-C _{18:1} | 0.6 | 0.3 |
| C _{18:0} | 0.4 | 0.3 |
| <i>iso</i> 3OH-C _{17:0} | 0.1 | - |
| 10-methyl,TBSA-C _{18:0} | 0.2 | - |
| C _{20:0} | 1.9 | 1.4 |

หมายเหตุ ; แสดงปริมาณของกรดไขมันมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1, - คือ ไม่พบกรดไขมัน

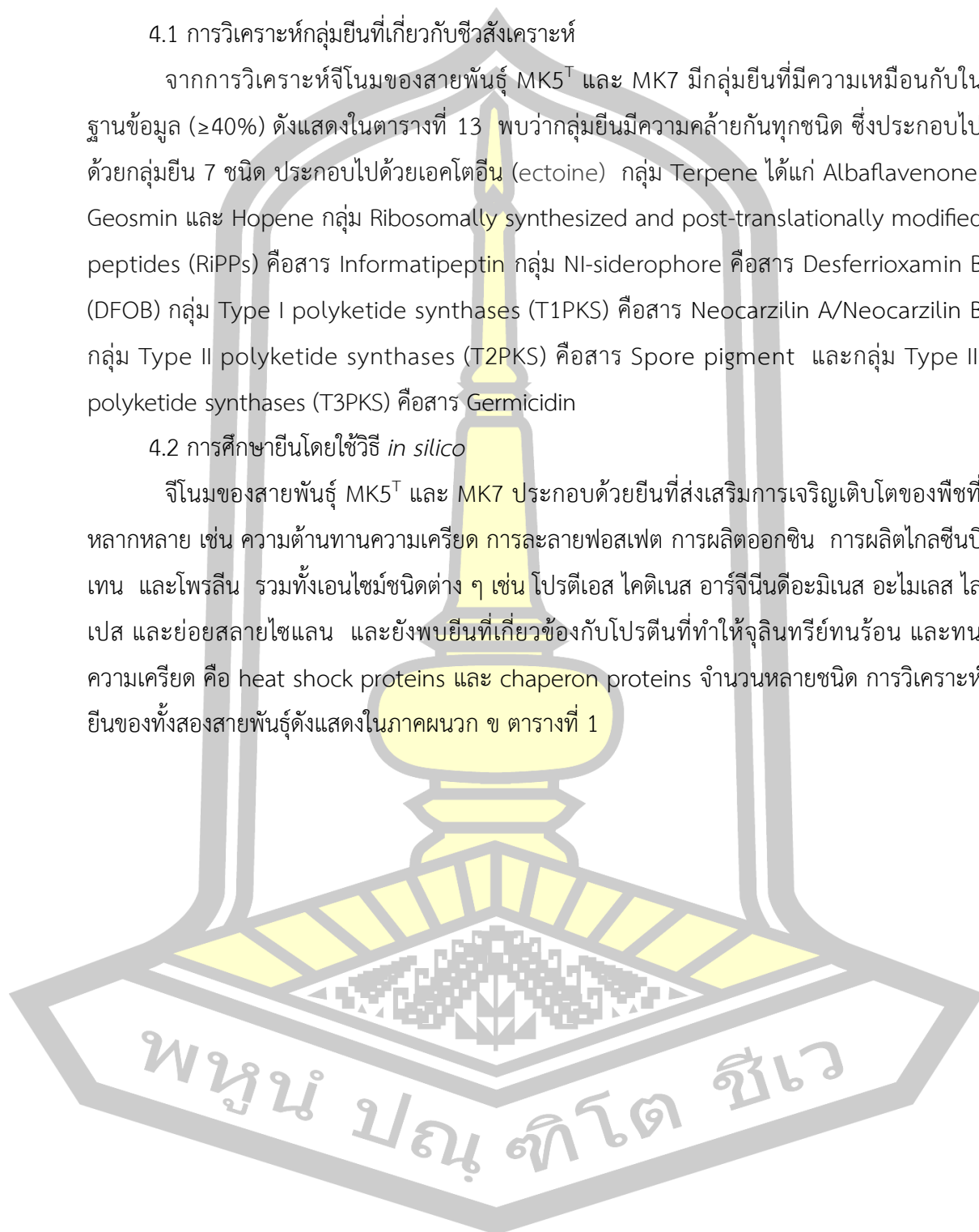
4. การทำเหมืองข้อมูลของจีโนมสายพันธุ์ MK5^T และ MK7

4.1 การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์

จากการวิเคราะห์จีโนมของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 มีกลุ่มยีนที่มีความเหมือนกับในฐานข้อมูล ($\geq 40\%$) ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่ากลุ่มยีนมีความคล้ายกันทุกชนิด ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มยีน 7 ชนิด ประกอบไปด้วยเอคโตอิน (ectoine) กลุ่ม Terpene ได้แก่ Albaflavenone, Geosmin และ Hopene กลุ่ม Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) คือสาร Informatipeptin กลุ่ม NI-siderophore คือสาร Desferrioxamin B (DFOB) กลุ่ม Type I polyketide synthases (T1PKS) คือสาร Neocarzililn A/Neocarzililn B กลุ่ม Type II polyketide synthases (T2PKS) คือสาร Spore pigment และกลุ่ม Type III polyketide synthases (T3PKS) คือสาร Germicidin

4.2 การศึกษายีนโดยใช้วิธี *in silico*

จีโนมของสายพันธุ์ MK5^T และ MK7 ประกอบด้วยยีนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่หลากหลาย เช่น ความต้านทานความเครียด การละลายฟอสเฟต การผลิตออกซิน การผลิตไกลซีนบีเทน และโพรตีน รวมทั้งเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น โพรตีเอส ไคติเนส อาร์จินินดีอะมิเนส อะไมเลส ไลเปส และย่อยสลายไซแลน และยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ทำให้จุลินทรีย์ทนร้อน และทนความเครียด คือ heat shock proteins และ chaperon proteins จำนวนหลายชนิด การวิเคราะห์ยีนของทั้งสองสายพันธุ์ดังแสดงในภาคผนวก ข ตารางที่ 1



ตารางที่ 13 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 โดยการศึกษาวิเคราะห์ด้วย “antiSMASH”

| | | สายพันธุ์ MK5 ^T | | | สายพันธุ์ MK7 | | |
|-----------------------|------------------|----------------------------|-------------------|---------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| ชนิดของ กลุ่มยีน | ผลิตภัณฑ์ | Span (nt) | ความเหมือน (%) | ชนิดของ กลุ่มยีน | ผลิตภัณฑ์ | Span (nt) | ความเหมือน (%) |
| Ectoine | | | | | | | |
| | Ectoine | 339,879 - 350,283 | 100 | Ectoine | Ectoine | 75,301 - 85,705 | 100 |
| NI-siderophore | | | | | | | |
| | Desferrioxamin B | 52,498 - 64,267 | 83 | Desferrioxamin B | Desferrioxamin B | 22,145 - 33,914 | 83 |
| Terpene | | | | | | | |
| | Geosmin | 235,573 - 257,768 | 100 | Geosmin | Geosmin | 175,321 - 197,516 | 100 |
| | Albaflavenone | 86,256 - 106,457 | 100 | Albaflavenone | Albaflavenone | 75,886 - 96,809 | 100 |
| | Hopene | 26,358 - 44,889 | 61 | Hopene | Hopene | 50,525 - 77,293 | 92 |

ตารางที่ 13 กลุ่มเอ็นที่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 โดยการวิเคราะห์ด้วย “antiSMASH” (ต่อ)

| | สายพันธุ์ MK5 ^T | สายพันธุ์ MK7 |
|---|----------------------------|--|
| RIPP-like | | |
| Informatipeptin | 34,497-44,712 | 42 Informatipeptin 112,355 - 122,570 |
| T1PKS | | |
| | | T1PKS |
| Neocarzilin A/ Neocarzilin B | 1 - 33,773 | 50 Neocarzilin A/ Neocarzilin B 1 - 33,897 |
| T2PKS | | |
| | | T2PKS |
| Spore pigment | 139,217 - 227,732 | 83 Spore pigment 1 - 91,435 |
| T3PKS | | |
| | | T3PKS |
| Flaviolin/ 1,3,6,8- tetrahydroxynaph -thalene Germicidin | 91,068 - 132,126 | 100 Not Detected 100 Germicidin 1 - 34,423 |

4.2.2 Actinoplanes สายพันธุ์ RD1

Actinoplanes สายพันธุ์ RD1 คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อใบข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าของข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* KDML 105) โดยเจริญขึ้นมาจากชิ้นส่วนใบหลังจากบ่มเป็นเวลา 2 อาทิตย์ โดยใช้อาหารร่วน Humic acid vitamin B เก็บเซลล์ในอาหารร่วนเอียงที่ 4 องศาเซลเซียส และเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

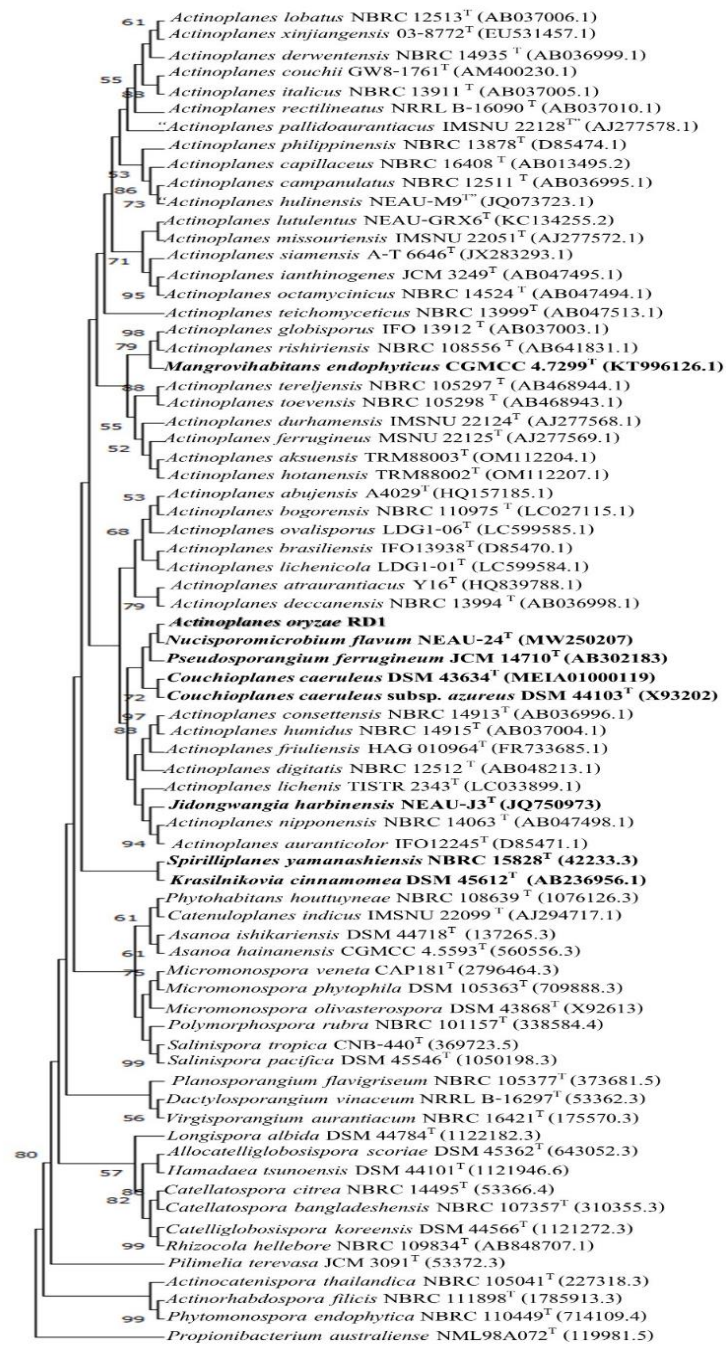
4.2.2.1 ลักษณะทางจีโนมไทป์ของสายพันธุ์ RD1

1. ความเหมือนของยีน 16S rRNA

จากข้อมูลของยีน 16S rRNA พบว่า *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *Nucisporomicrobium flavum* NEAU-24^T เท่ากับ 98.9 เปอร์เซ็นต์ และมีความใกล้เคียงกับสกุลอื่น ๆ คือ *Pseudosporangium ferrugineum* 3-44-a-19^T, *Couchioplanes caeruleus* subsp. *caeruleus* DSM 43634^T, *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* DSM 44103^T และ *Actinoplanes lichenis* TISTR 2343^T เท่ากับ 98.5, 98.3, 98.3 และ 97.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีสายพันธุ์มาตรฐานที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดอีก 10 สายพันธุ์ อยู่ใน 9 สกุลที่แตกต่างกัน ในวงศ์ *Micromonosporaceae* (97.1 - 98.9%) เมื่อทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA พบว่าเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุดของสายพันธุ์ RD1 ในรูปแบบ ML คือ *N. flavum* NEAU-24^T ซึ่งอยู่ใน Clade เดียวกันกับ *P. ferrugineum* 3-44-a-19^T และเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุดของสายพันธุ์ RD1^T ในรูปแบบ NJ คือ *P. ferrugineum* 3-44-a-19^T และ *Jidongwangia harbinensis* NEAU-J3^T ดังภาพที่ 12 และภาคผนวก ข ภาพที่ 10 ตามลำดับ

2. ลักษณะของจีโนมของสายพันธุ์ RD1 (Genome characterization)

ทำการประกอบจีโนมของสายพันธุ์ RD1^T และ *A. lichenis* TISTR 2343^T จากนั้นนำข้อมูลจีโนมที่ได้ฝากที่ฐานข้อมูล GenBank โดยมี accession numbers คือ JAUQWH000000000 และ JAUZQD000000000 ตามลำดับ ขนาดของจีโนมของสายพันธุ์ RD1 เท่ากับ 9.45 Mpb มีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 72.34 mol% และจำนวนโปรตีนเท่ากับ 8631 ขนาดของจีโนม *A. lichenis* TISTR 2343^T เท่ากับ 9.0 Mbp มีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 72.0 mol% และจำนวนโปรตีนคือ 8160



ภาพที่ 12 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML (1396 bp) แสดงตำแหน่งของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกัน ในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ

3. การเปรียบเทียบจีโนม (genome comparative)

3.1 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree

ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของสายพันธุ์ RD1 และสกุลอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด จำเป็นต้องสร้างแผนภูมิ ML ของสายวิวัฒนาการของจีโนม โดยใช้ single core genes ในฐานข้อมูล PATRIC ผลการวิจัยพบว่า มีกลุ่มของสกุล *Actinoplanes* (G1-G6, G8, G9) จำนวน 8 กลุ่ม ในขณะที่ G7 ประกอบด้วยสมาชิกในสกุล *C. caeruleus* subsp. *caeruleus* NBRC 13939^T, *C. caeruleus* subsp. *azureus* NBRC 13993^T, *P. ferrugineum* JCM 14710^T และ *N. flavum* NEAU 24^T (ภาพที่ 13) โดยสมาชิกใน G7 นี้มีตำแหน่งที่ถูกล้อมรอบไว้โดยสมาชิกอื่น ๆ ในสกุล *Actinoplanes* และพบว่า *A. lichenis* TISTR 2343^T และสายพันธุ์ RD1^T อยู่ใน clade เดียวกัน และเป็นเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุดของสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 4 และพบว่าตำแหน่งของ *J. harbinensis* NEAU-J3^T และ *Mangrovihabitans endophyticus* CGMCC 4.7299^T อยู่ใน clade เดียวกัน (G10 และ G11) และแยกจากสายพันธุ์ทั้ง 4 ใน G7 และสมาชิกอื่น ๆ ของ *Actinoplanes* พบว่า *K. cinnamomea* DSM 45162^T มีตำแหน่งเดี่ยว และมีเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุดคือ *J. harbinensis* NEAU-J3^T และ *Mangrovihabitans endophyticus* CGMCC 4.7299^T, *Spirilliplanes yamanashiensis* NBRC 15828^T และ *Catenuloplanes indicus* DSM 44709^T เป็นเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงที่สุดลำดับถัดไปของทั้งสามสกุลนี้ และสกุล *Micromonospora* ทั้ง 3 สปีชีส์ รวมตัวอยู่ใน cluster ที่แตกต่างจาก *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่มีความใกล้ชิดกัน

3.2 ต้นไม้สายวิวัฒนาการ TYGS

เนื่องจากต้นไม้สายวิวัฒนาการของ TYGS จำกัดจำนวนเพียง 50 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกสมาชิกของสกุล *Actinoplanes* และสกุลที่เกี่ยวข้องในกลุ่ม G5-G15 บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ ML ในการสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการ TYGS เท่านั้น พบว่าตำแหน่งของ *C. caeruleus* subsp. *caeruleus* NBRC 13939^T และ *C. caeruleus* subsp. *azureus* NBRC 13993^T บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ ML และ TYGS อยู่ใน clade เดียวกันและมีสมาชิกที่ใกล้ชิด คือ *P. ferrugineum* JCM 14710^T และ *N. flavum* NEAU 24^T และต้นไม้สายวิวัฒนาการของ TYGS แสดงตำแหน่งของ *C. caeruleus* subsp. *caeruleus* NBRC 13939^T และ *C. caeruleus* subsp. *azureus* NBRC 13993^T เป็นสปีชีส์ที่ต่างกัน พบว่าตำแหน่งของ *K. cinnamomea* DSM 45162^T มีความใกล้ชิดกับ *Actinoplanes* สายพันธุ์อื่น ๆ และอยู่ในตำแหน่งที่แยกจากกันโดยมี *J. harbinensis* NEAU-J3^T และ *M. endophyticus* CGMCC 4.7299^T เป็นสมาชิกที่ใกล้เคียงมากที่สุด และพบว่า *J.*

harbinensis NEAU-J3^T และ *M. endophyticus* CGMCC 4.7299^T อยู่ใน clade เดียวกันและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกอื่น ๆ ในสกุล *Actinoplanes* (ภาพที่ 14)

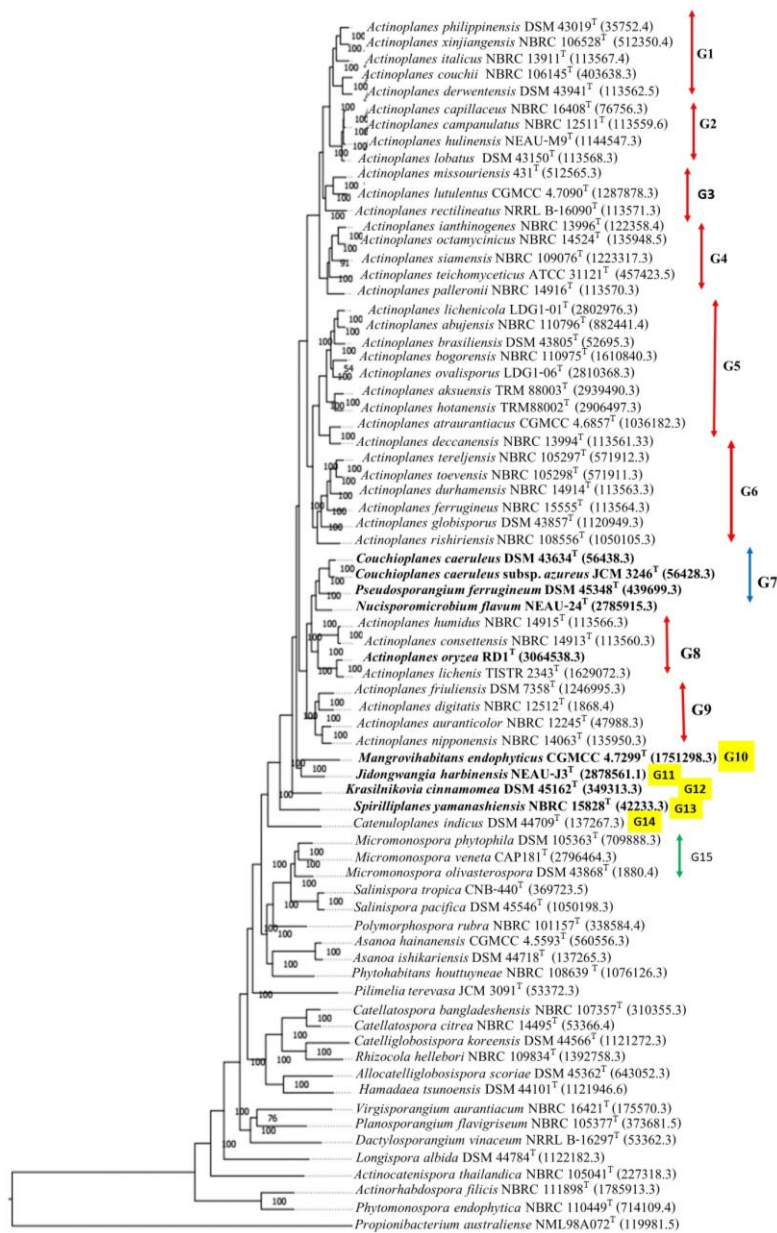
3.3 การเปรียบเทียบค่า ANIb ANIm และ dDDH

การศึกษาเปรียบเทียบจีโนม พบว่า สายพันธุ์มาตรฐาน *A. lichenis* TISTR 2343^T มีความใกล้เคียงที่สุดกับสายพันธุ์ RD1 ซึ่งมีค่า ANIb, ANIm และ dDDH เท่ากับ 89.8, 91.2 และ 40.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงลำดับถัดมาคือ *C. caeruleus subsp. azureus* DSM 44103^T มีค่าเท่ากับ 79.0, 85.7 และ 24.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ *P. ferrugineum* 3-44-a-19^T มีค่าเท่ากับ 79.0, 85.6 และ 24.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ *C. caeruleus subsp. caeruleus* DSM 43634^T มีค่าเท่ากับ 78.5, 85.6 และ 24.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ *N. flavum* NEAU-24^T มีค่าเท่ากับ 78.9, 85.6 และ 24.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตามรายงานของ Richter and Rossello-Mora (2009) ค่า cut off ของ ANI ที่ต่ำกว่า 95-96 เปอร์เซ็นต์ และ dDDH ที่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จะใช้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์

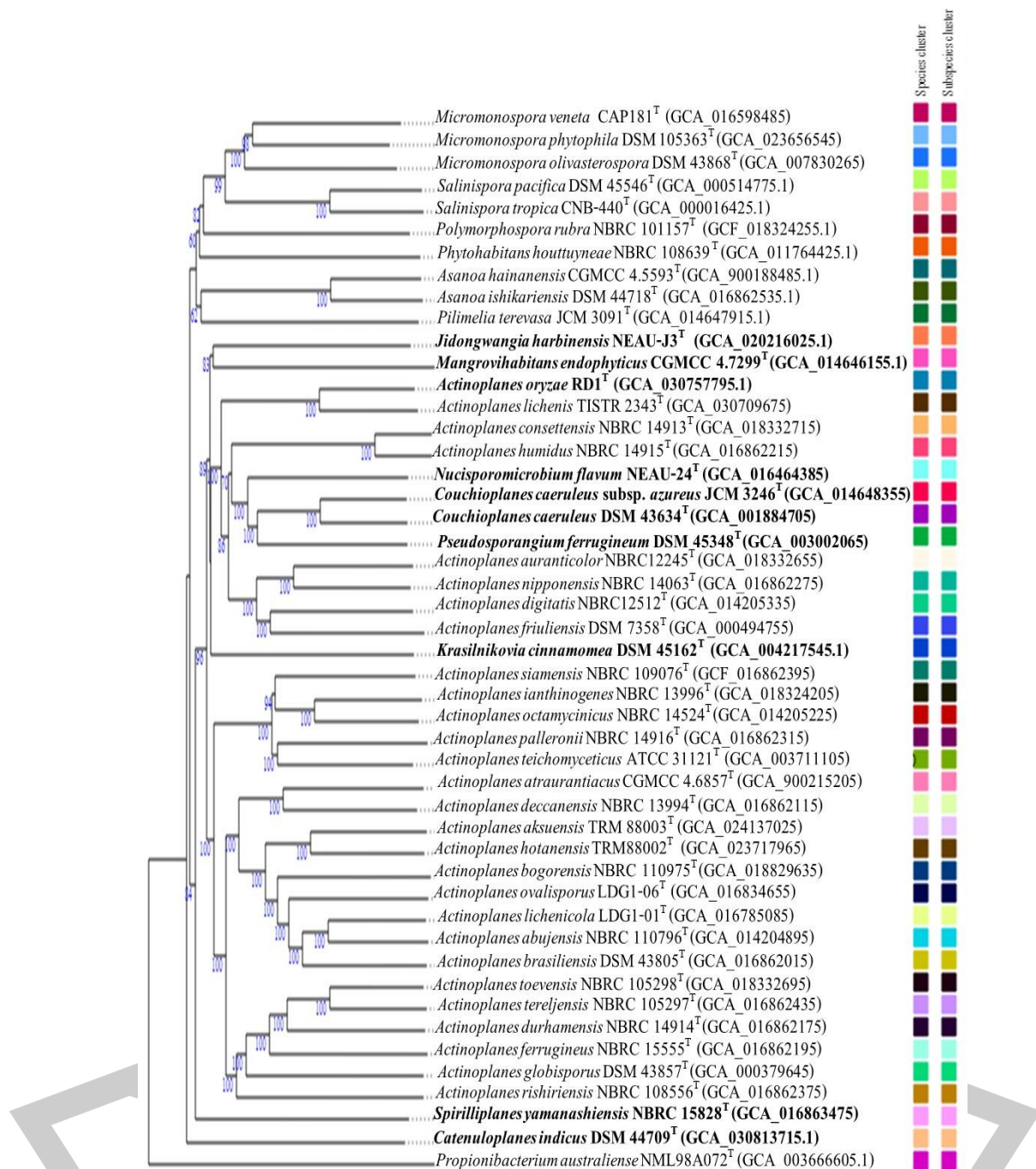
การสร้างแผนภูมิต้นไม้ของจีโนมของสายพันธุ์ RD1 โดยใช้ TYGS พบว่าอยู่ใน clade เดียวกันกับ *A. lichenis* TISTR 2343^T แต่แยกออกมาอยู่ในสปีชีส์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานนี้ ดังแสดงภาพที่ 14 เพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงลำดับถัดไปคือ *Actinoplanes humidus* NBRC 14915^T และ *Actinoplanes consettensis* JCM 7624^T

โดยสรุป จากข้อมูลของจีโนมไทป์ โดยตำแหน่งของสายพันธุ์ RD1 บนสายวิวัฒนาการของ ML และ TYGS และการเปรียบเทียบจีโนมโดยใช้ค่า ANIb, ANIm และ dDDH สายพันธุ์ที่ใกล้ชิดที่สุดกับสายพันธุ์ RD1 คือ *A. lichenis* TISTR 2343^T ไม่ใช่ *N. flavum* NEAU-24^T ที่มีความใกล้เคียงของยีน 16S rRNA ยีนมากที่สุด และเป็นเพื่อนบ้านที่ใกล้เคียงบนแผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA จึงสามารถสรุปได้ว่า สายพันธุ์ RD1 อยู่ในสกุล *Actinoplanes* และเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ข้อมูลทางพีโนไทป์ ซึ่งจะได้อธิบายต่อไป

พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย maximum likelihood (ML) โดยใช้ codon tree option ที่อยู่ในฐานข้อมูล PATRIC แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ RD1 *Actinoplanes* และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group

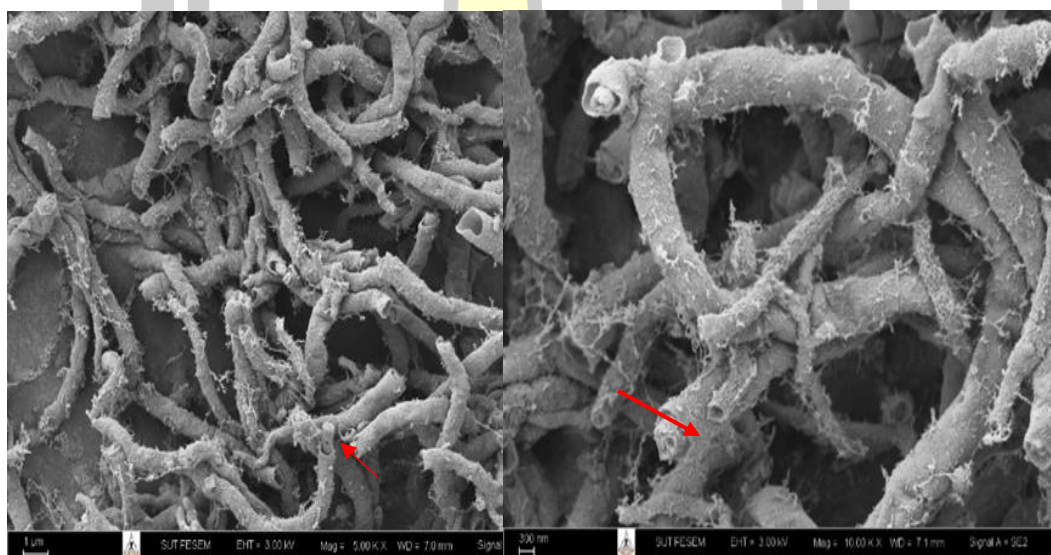


ภาพที่ 14 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS strain RD1 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ RD1^T และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group

4.2.2.2 การจำแนกด้วยลักษณะฟิโนไทป์

1. ลักษณะสัณฐานวิทยา

จากการทดสอบลักษณะการเจริญของสายพันธุ์ RD1 บนอาหารแข็ง 8 ชนิด พบว่า สายพันธุ์ RD1 เจริญได้ดีบนอาหาร 7 ชนิด มีเพียงอาหาร ISP5 ที่เจริญในระดับปานกลาง ลักษณะของเส้นใยอาหาร มีสีส้มอมชมพูอ่อนบนอาหาร HPDA และมีสีส้มอมเหลืองอ่อน บนอาหาร ISP2 และ ISP3 สีเหลืองอ่อน บนอาหาร Bennet และ NA และสีครีม บนอาหาร ISP4 และ ISP5 ส่วนของเส้นใยอาหารในอาหารแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 14) จากภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสายพันธุ์ RD1^T สร้างเส้นใยอาหารได้ดี แต่มีการสร้างเส้นใยอากาศน้อยมาก การสร้างสปอร์ อยู่ภายในถุงหุ้มที่มีรูปร่างเป็นท่อยาว (tubular sporangia) และขนาดของสปอร์มีความกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร และยาวมากกว่า 6 ไมโครเมตร (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ลักษณะสปอร์แบบถุงเป็นท่อยาวของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เลี้ยงบนอาหาร HPDA เวลา 21 วัน (ลูกศรสีแดง แสดงสปอร์ที่อยู่ในถุง)

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 14 ลักษณะโคโลนีของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 ที่เจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน 8 ชนิด

| ชนิดอาหาร | การเจริญ | เส้นใยอากาศ | เส้นใยอาหาร |
|----------------|-----------------|---------------|-------------|
| ISP 2 | เจริญได้ดี | สีเหลืองส้ม | สีเหลือง |
| ISP 3 | เจริญได้ดี | สีเหลืองส้ม | สีเหลือง |
| ISP 4 | เจริญได้ดี | สีขาวอมเหลือง | สีครีม |
| ISP 5 | เจริญได้ปานกลาง | สีครีม | สีครีม |
| ISP 7 | เจริญได้ดี | สีส้มอมชมพู | สีน้ำตาลแดง |
| Bennett's agar | เจริญได้ดี | สีเหลือง | สีเหลือง |
| HPDA | เจริญได้ดี | สีส้มอ่อน | สีส้มอ่อน |
| NA | เจริญได้ดี | สีเหลือง | สีเหลือง |

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

พบว่า ไอโซเลต RD1 เจริญที่อุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเกลือที่ 0 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ และช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6 ถึง 10 สามารถย่อยแป้ง หางนม ไทโรซีน เอสคูลิน และยูเรียได้ แต่ไม่สามารถย่อย ฮิปบูเรท อะดีนีน ไฮโปแซนทีน และแซนทีนได้ นอกจากนี้การทดสอบการใช้สารอินทรีย์ทั้ง 7 ชนิด พบเพียงอะซิเตท และแลคเตท เท่านั้นที่เกิดการย่อย การใช้น้ำตาลในการผลิตกรด 16 ชนิด พบว่าสายพันธุ์ RD1^T ผลิตกรดได้ในน้ำตาล 15 ชนิด ยกเว้นน้ำตาล ดูซิทอลที่ให้ผลเป็นลบ และสามารถใช้อคาร์บอนได้ 4 ชนิด คือ อะราบิโนส อินซิทอล แรมโนส และ ราฟิโนส และสามารถใช้อสารประกอบในกลุ่มพีนอลิกได้ทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 15

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว

ตารางที่ 15 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1

| ลักษณะ | RD1 ^T | ลักษณะ | RD1 ^T |
|--------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| การใช้สารอินทรีย์ | | การย่อย | |
| อะซิเตท | + | เอสคูลิน | + |
| เบนโซเอต | - | ฮิปบูเรท | - |
| ซิเตรท | - | แป้ง | + |
| แลคเตท | + | หางนม | + |
| มาเลต | - | อะดีนีน | - |
| โพรไพโอเนต | - | ไฮโพแซนทีน | - |
| ทาร์เทรต | - | ไทโรซีน | + |
| การผลิตกรด | | แซนทีน | - |
| อะราบิโนส | + | ยูเรีย | + |
| เซลโลไบโอส | + | เจริญที่อุณหภูมิ (°C) | 15 -37 |
| กาแลคโตส | + | พีเอชที่เจริญ | 6-10 |
| ดูซิทอล | - | เจริญที่ความเข้มข้นเกลือ (% NaCl) | 2 |
| ฟรุกโตส | + | การใช้แหล่งคาร์บอน | |
| กลูโคส | + | อะราบิโนส | + |
| มอลโทส | + | ฟรุกโตส | - |
| แมนนิทอล | + | อีโนซิทอล | + |
| แมนโนส | + | แรมโนส | + |
| อินโนซิทอล | + | ราฟฟิโนส | + |
| แรมโนส | + | ไซโลส | - |
| ไรโบส | + | การใช้สารประกอบฟีนอลิก | |
| ซอร์บิทอล | + | ไซโคลเฮกเซน | + |
| ซูโครส | + | ไพรีดีน | + |
| ทรีฮาโลส | + | โทลูอิน | + |
| ไซโลส | + | เบนซีน | + |

หมายเหตุ: +, ให้ผลเป็นบวก ; w, ให้ผลน้อย; -, ให้ผลเป็นลบ

3. ลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกับสายพันธุ์มาตรฐาน

การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ RD1 จำนวน 5 สายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์มาตรฐานที่มีความใกล้เคียงของจีโนมมากที่สุด คือ *A. lichenis* TISTR 2343^T มีความแตกต่างของการย่อยโปรตีนเคซีนจากหางนม การใช้แหล่งคาร์บอนคือ อิโนซิทอล ราฟฟิโนส และไซโลส การเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชที่ต่างกัน และการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 16

4.2.2.3 การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางเคมี

1. ชนิดของ DAP ในเซลล์

สายพันธุ์ RD1 มีชนิดของ *meso-isomer* ซึ่งสอดคล้องกับสมาชิกอื่น ๆ ที่อยู่ในสกุล *Actinoplanes* (ภาคผนวก ข ภาพที่ 6)

2. ชนิดน้ำตาลภายในเซลล์

พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และแมนโนส ในเซลล์ของสายพันธุ์ RD1^T (ภาคผนวก ข ภาพที่ 7)

3. ชนิดของ Phospholipid

พบชนิดของไขมันแบบมีขั้ว Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidyl glycerol (PG), ไกลโคไลปิด และไกลโคไลปิดมีหมู่อะมิโน และไขมันที่จำแนกไม่ได้ 4 ชนิด (ภาคผนวก ข ภาพที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับชนิดของไขมันแบบมีขั้ว phospholipid type II (Lechevalier et al., 1977)

4. ชนิดของ Isoprenoid quinones และชนิดของกรดไขมัน

พบว่า สายพันธุ์ RD1 มี MK-9(H_d) เป็นเมนาควิโนนหลัก และพบ MK-9(H₆) ในปริมาณน้อย

5. กรดไขมัน

กรดไขมันหลักในรูปแบบ FAMES ในเซลล์ของสายพันธุ์ RD1^T ($\geq 10\%$) คือ *anteiso*-C_{15:0} (27.6%), *anteiso*-C_{17:0} (18.2%), *iso*-C_{15:0} (15.4%) และ *iso*-C_{16:0} (13.3%)

กรดไขมันหลักในรูปแบบ FAMES ในเซลล์ของสายพันธุ์มาตรฐาน *A. lichenis* TISTR 2343^T คือ *anteiso*-C_{15:0} (31.2%), *iso*-C_{16:0} (14.2%) และ C_{16:0} (9.9%) ดังแสดงในตารางที่ 17

จากผลการศึกษาโดยใช้ข้อมูลของจีโนมไทป์ และพีโนมไทป์ สรุปได้ว่า สายพันธุ์ RD1 เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ และตั้งชื่อว่า *Actinoplanes oryzae* sp. nov.

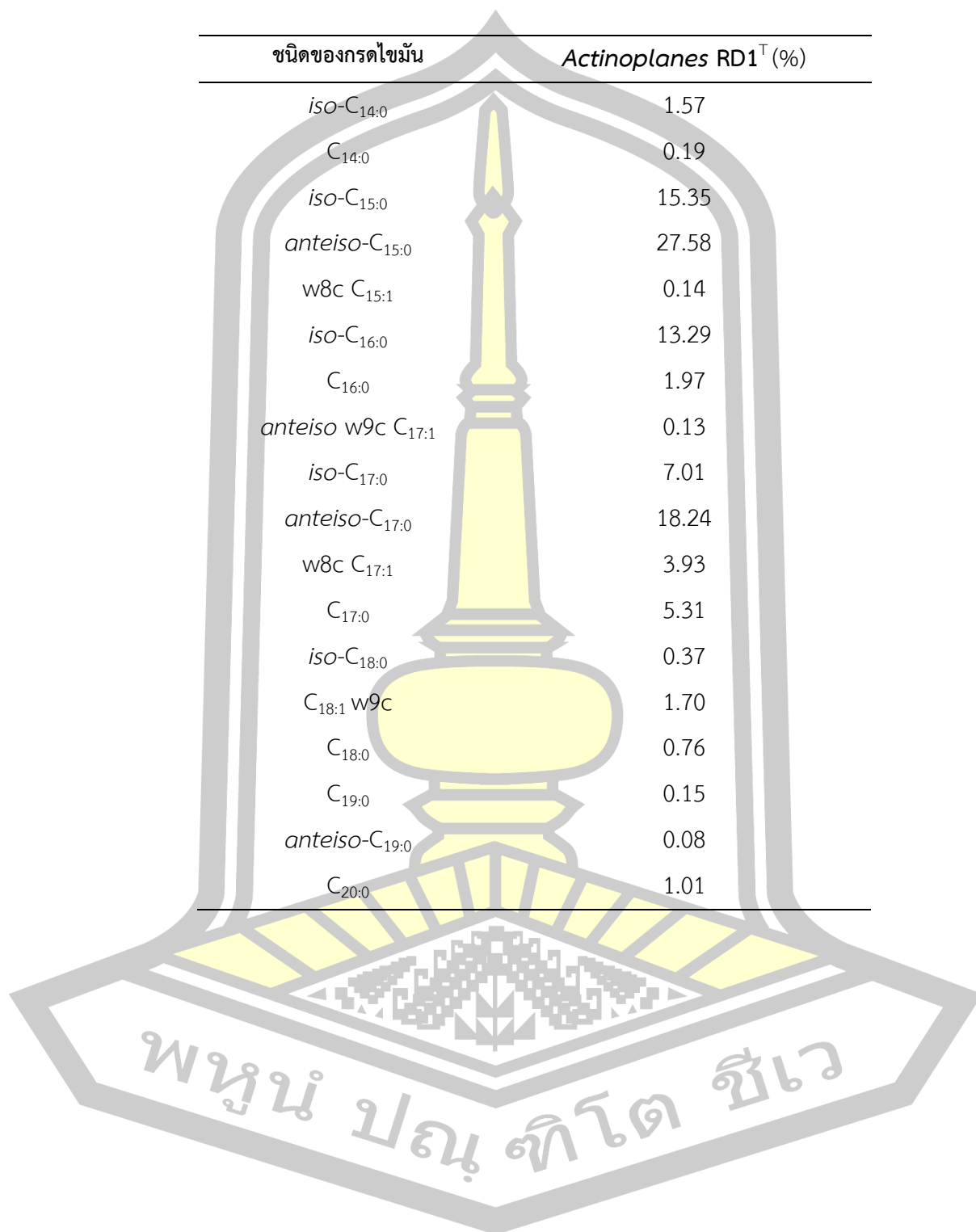
ตารางที่ 16 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของสายพันธุ์ RD1 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันจำนวน 5 สายพันธุ์

| การย่อย | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|---------|---------|-----|---------|-------|-------|
| เอสคูลิน | + | + | ND | ND | ND | - |
| แป้ง | + | + | ND | + | ND | + |
| หางนม | + | - | ND | - | ND | + |
| ยูเรีย | + | ND | ND | ND | ND | + |
| การใช้คาร์บอน | | | | | | |
| อะราบิโนส | + | + | +++ | - | ++ | + |
| ฟรุกโตส | - | - | ++ | ++ | + | - |
| อิโนซิทอล | + | - | ++ | ++ | + | - |
| แรมโนส | + | + | + | + | + | ND |
| ราฟฟิโนส | + | - | + | - | + | ND |
| ไซโลส | - | + | + | - | + | + |
| การเจริญที่ | | | | | | |
| อุณหภูมิ (°C) | 15 - 37 | 16.5-38 | 28 | 22-28 | 20-37 | 20-37 |
| พีเอช | 6 - 10 | 6-9 | 7.2 | 7.0-7.5 | 5-9 | 3-11 |
| ความเข้มข้นเกลือ (% NaCl) | 2% | 0-3% | ND | 0-1% | 0-2% | 2-11% |

หมายเหตุ: 1, *Actinoplanes oryzae* RD1 2, *Actinoplanes lichenis* TISTR 2343^T (ข้อมูลได้จาก Phongsopitanun et al., 2016) 3, *Actinoplanes nipponensis* NBRC 14063^T (ข้อมูลได้จาก Wink et al., 2014) 4, *Couchiplane caeruleus* subsp. *caeruleus* IFO 13939^T (ข้อมูลได้จาก Thawai et al., 1986) 5, *Pseudosporangium ferrugineum* 3-44-a-19^T (ข้อมูลได้จาก Ara et al., 2008) 6, *Nucisporomicrobium flavum* NEAU-24^T (Han et al., 2022)
 ND ยังไม่ทำการศึกษา, - ไม่เกิดการย่อย +, ให้ผลเป็นบวก; w, ให้ผลน้อย; -, ให้ผลเป็นลบ

ตารางที่ 17 ชนิดของกรดไขมันภายในเซลล์ *Actinoplanes* RD1

| ชนิดของกรดไขมัน | <i>Actinoplanes</i> RD1 ^T (%) |
|--------------------------------------|--|
| <i>iso</i> -C _{14:0} | 1.57 |
| C _{14:0} | 0.19 |
| <i>iso</i> -C _{15:0} | 15.35 |
| <i>anteiso</i> -C _{15:0} | 27.58 |
| w8c C _{15:1} | 0.14 |
| <i>iso</i> -C _{16:0} | 13.29 |
| C _{16:0} | 1.97 |
| <i>anteiso</i> w9c C _{17:1} | 0.13 |
| <i>iso</i> -C _{17:0} | 7.01 |
| <i>anteiso</i> -C _{17:0} | 18.24 |
| w8c C _{17:1} | 3.93 |
| C _{17:0} | 5.31 |
| <i>iso</i> -C _{18:0} | 0.37 |
| C _{18:1} w9c | 1.70 |
| C _{18:0} | 0.76 |
| C _{19:0} | 0.15 |
| <i>anteiso</i> -C _{19:0} | 0.08 |
| C _{20:0} | 1.01 |



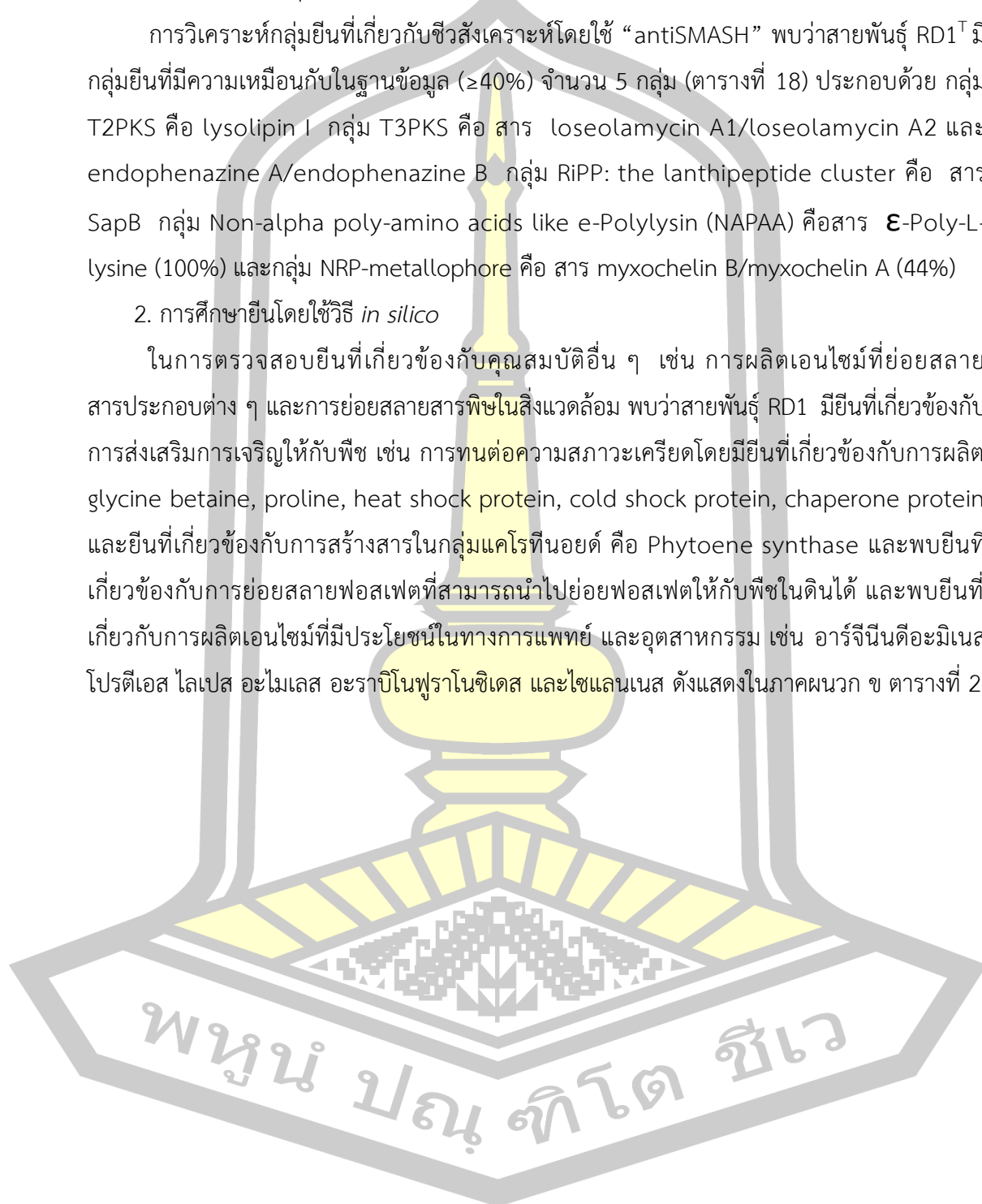
4.2.2.4 การทำเหมืองข้อมูลของจีโนมสายพันธุ์ RD1

1. การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์

การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์โดยใช้ “antiSMASH” พบว่าสายพันธุ์ RD1^T มีกลุ่มยีนที่มีความเหมือนกับในฐานข้อมูล ($\geq 40\%$) จำนวน 5 กลุ่ม (ตารางที่ 18) ประกอบด้วย กลุ่ม T2PKS คือ lysolipin I กลุ่ม T3PKS คือ สาร loseolamycin A1/loseolamycin A2 และ endophenazine A/endophenazine B กลุ่ม RiPP: the lanthipeptide cluster คือ สาร SapB กลุ่ม Non-alpha poly-amino acids like e-Polylysine (NAPAA) คือสาร ϵ -Poly-L-lysine (100%) และกลุ่ม NRP-metallophore คือ สาร myxochelin B/myxochelin A (44%)

2. การศึกษายีนโดยใช้วิธี *in silico*

ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ และการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม พบว่าสายพันธุ์ RD1 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช เช่น การทนต่อความเครียดโดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต glycine betaine, proline, heat shock protein, cold shock protein, chaperone protein และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ คือ Phytoene synthase และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟอสเฟตที่สามารถนำไปย่อยฟอสเฟตให้กับพืชในดินได้ และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรม เช่น อาร์จินีนดีอะมิเนส โปรตีเอส ไกลเปส อะไมเลส อะราบีโนฟูราโนซิเดส และไซแลนเนส ดังแสดงในภาคผนวก ข ตารางที่ 2



ตารางที่ 18 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสายพันธุ์ RD1 โดยการวิเคราะห์ด้วย “antiSMASH”

| ชนิดของกลุ่มยีน | ผลิตภัณฑ์ | Span (nt) | ความเหมือน (%) |
|---|---------------------------|-----------------|----------------|
| T3PKS | Loseolamycin | 1 - 32,076 | 52 |
| | A1/loseolamycin A2 | | |
| | Endophenazine | 21,203 - 62,378 | 44 |
| T2PKS | A/endophenazine B | | |
| | Lysolipin I | 1 - 34,311 | 50 |
| RiPP | SapB biosynthetic | 48,027 - 70,573 | 100 |
| Lanthipeptide-class-iii | | | |
| NAPAA (Non-alpha poly-amino acids like e-Polylysin) | ϵ -Poly-L-lysine | 6,150 - 39,965 | 100 |
| NRP-metallophore | Myxochelin | 1 - 22,898 | 44 |
| | B/myxochelin A | | |

4.2.3 *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29

Quadrisphaera สายพันธุ์ KR29 คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อใบข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* KDML 105) โดยเจริญขึ้นมาจากชิ้นส่วนใบหลังจากบ่มเป็นเวลา 2 อาทิตย์ โดยใช้อาหารฐาน Humic acid vitamin B เก็บเซลล์ในอาหารฐานเอียงที่ 4 องศาเซลเซียส และเก็บใน 50 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

พหุ ประสิทธิภาพ ชีวะ

4.2.3.1 ลักษณะทางจีโนมไทป์ของสายพันธุ์ KR29

1. ความเหมือนของยีน 16S rRNA และสายวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA

จากข้อมูลของยีน 16S rRNA พบว่า *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์มาตรฐานคือ *Quadrisphaera oryzae* RL12-1S^T (99.6%), *Quadrisphaera setariae* DD2A^T (99.4%) และ *Quadrisphaera granulorum* AG019^T (99.0%) ตามลำดับ จากแผนภูมิต้นไม้รูปแบบ ML และ NJ สายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงที่สุดคือ *Q. oryzae* TBRC 8486^T และ *Q. granulorum* JCM 16010^T ส่วน *Q. setariae* DD2A^T เป็นเพื่อนบ้านที่อยู่ต่างกลุ่มกัน และมีสายพันธุ์มาตรฐานที่เกี่ยวข้องสกุลอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง ในวงศ์ *Kineosporiaceae* ล้อมรอบดังภาพที่ 21 และภาคผนวก ข ภาพที่ 12

2. ลักษณะของจีโนม

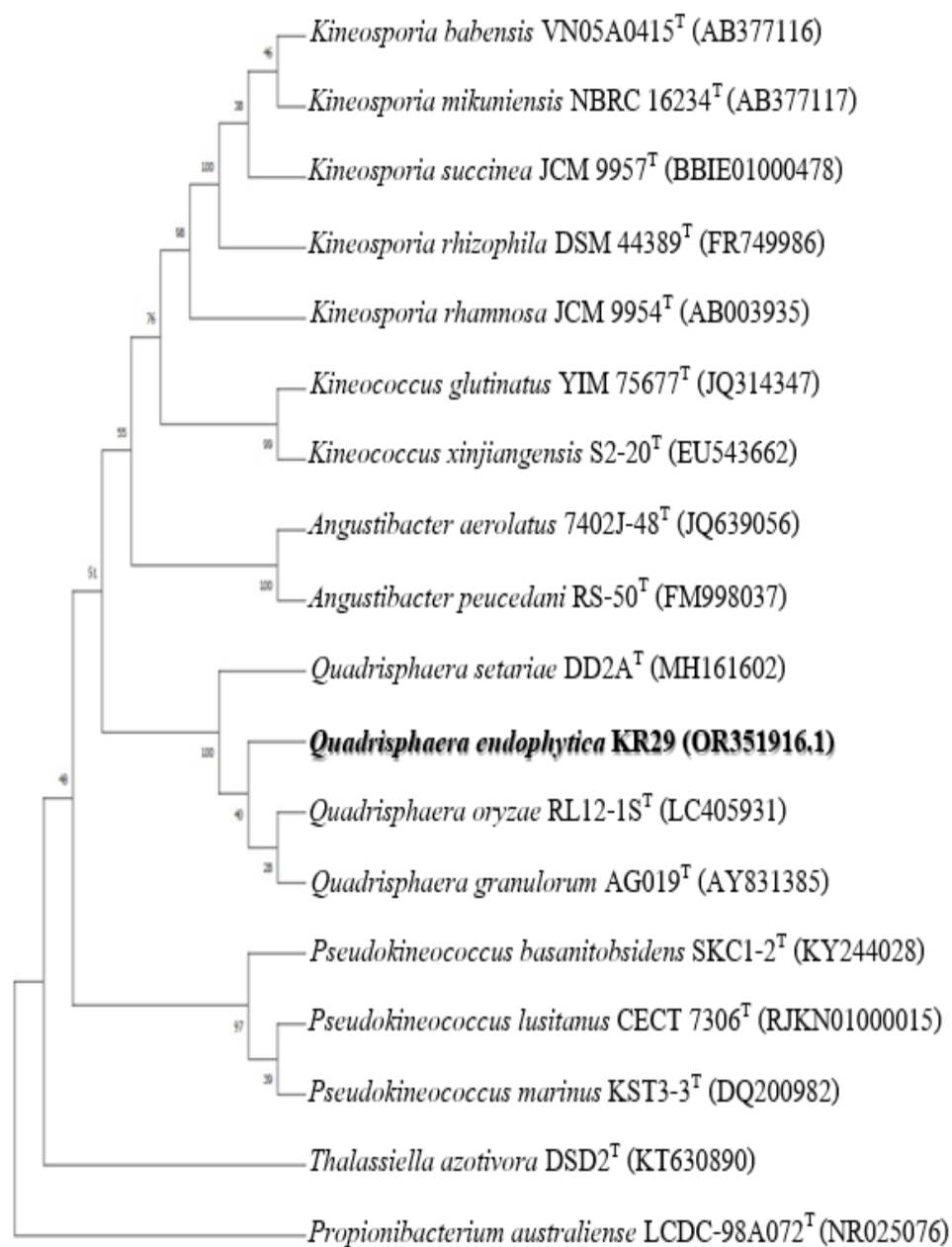
การประกอบจีโนมของสายพันธุ์ KR29 และ *Q. oryzae* TBRC 8486^T ขนาดของจีโนมของสายพันธุ์ KR29 เท่ากับ 3.95 Mbp มีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 76.1 mol% และจำนวนโปรตีนเท่ากับ 3591 ขนาดของจีโนม *Q. oryzae* TBRC 8486^T เท่ากับ 4.54 Mbp มีปริมาณเบส G+C content เท่ากับ 75.17 mol% และจำนวนโปรตีนเท่ากับ 4169

3. การเปรียบเทียบจีโนม

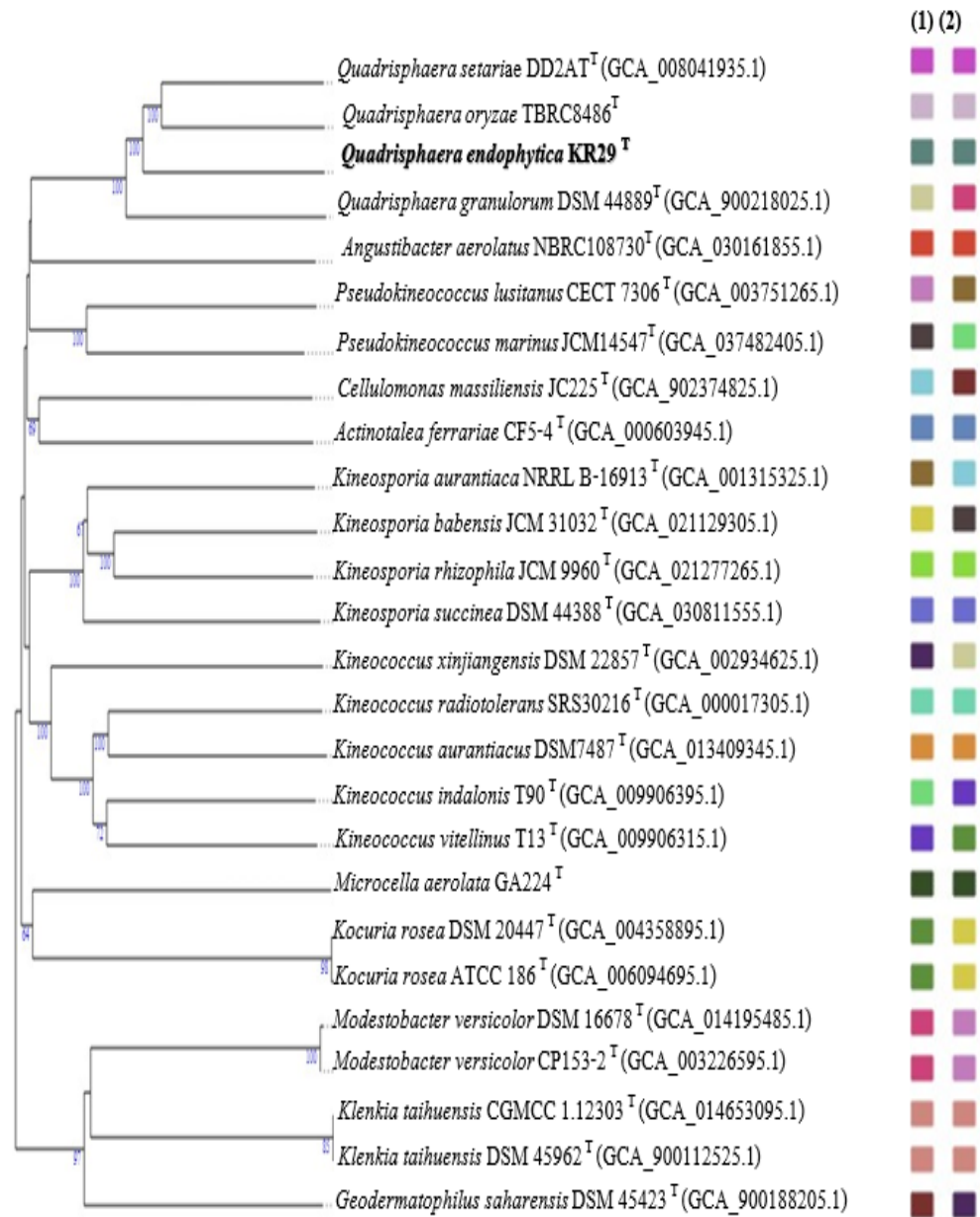
การศึกษาเปรียบเทียบจีโนมแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงที่สุดกับสายพันธุ์ KR29 คือ *Q. oryzae* TBRC 8486^T โดยมีค่า ANIb, ANIm และ dDDH เท่ากับ 85.2, 87.6 และ 28.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์มาตรฐานที่มีความใกล้ชิดรองลงมา คือ *Q. granulorum* DSM 44889^T มีค่าเท่ากับ 83.37, 86.79 และ 26.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *Q. setariae* DD2A^T มีค่าเท่ากับ 85.33, 87.63 และ 28.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการรายงานของ Richter and Rosselló-Móra (2009) และ Meier-Kolthoff et al. (2013) ค่ากำหนด (cut off) ของ ANI ที่ต่ำกว่า 95-96 เปอร์เซ็นต์ และค่า dDDH ที่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จะใช้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ของจีโนมของสายพันธุ์ KR29 โดยใช้ Type Strain Genome server พบว่าสายพันธุ์ KR29 อยู่ต่างกับกลุ่ม *Q. granulorum* JCM 16010^T และ *Q. oryzae* TBRC 8486^T ที่อยู่ใน clade เดียวกัน แต่อยู่ใน cluster เดียวกัน และแสดงสปีชีส์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สปีชีส์ในสกุล *Quadrisphaera* ดังแสดงในภาพที่ 22

จากข้อมูลของจีโนมไทป์ สรุปได้ว่าสายพันธุ์ KR29 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ จึงทำการศึกษาข้อมูลฟีโนไทป์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *Q. oryzae* TBRC 8486^T, *Q. granulorum* DSM 44889^T และ *Q. setariae* DD2A^T



ภาพที่ 16 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี ML (1474 bp) แสดงตำแหน่งของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกันในสกุล *Quadrisphaera* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Kineosporaceae* โดยมี *Propionibacterium australiense* LCDC-98A072^T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ



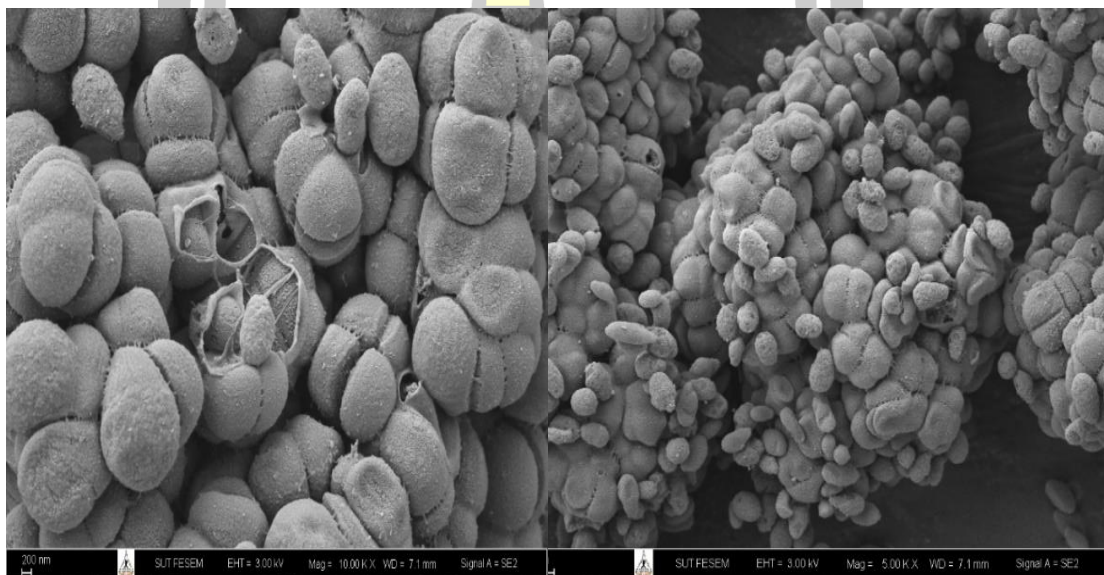
(1) Species cluster; (2) Subspecies cluster

ภาพที่ 17 แผนภูมิต้นไม้ของจีโนมที่สร้างโดย TYGS แสดงตำแหน่งของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกันในสกุล *Quadrisphaera* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Kineosporaceae*

4.2.3.2 การจำแนกด้วยลักษณะฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ KR29

1. ลักษณะสัณฐานวิทยา

จากการทดสอบลักษณะการเจริญของสายพันธุ์ KR29 บนอาหาร 8 ชนิด พบว่า สายพันธุ์ KR29สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร 3 ชนิด คือ ISP2, Bennet และ HPDA ลักษณะของเส้นใยอากาศมากกว่าเส้นใยอาหารมีสีส้ม โดยมีการเจริญของเส้นใยอากาศมากกว่าเส้นใยอาหาร และพบว่ามี การเจริญได้น้อยบนอาหาร 5 ชนิด อีกทั้งลักษณะสีของเส้นใยอากาศมีสีส้มอ่อนบนอาหาร ISP5 และ ISP7 ซึ่งมีความแตกต่างจากอาหารชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 19 จากภาพถ่าย SEM จะเห็นได้ว่า เซลล์มีรูปร่างแบบกลม สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบ 4 เซลล์ (tetrad) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมครอน ดังแสดงในภาพที่ 18 เซลล์ที่อยู่ในระยะอ่อนจะมีการแตกหน่อมีรูปร่างรีเรียวยาว (slender bud shaped) และมีพื้นผิวเรียบ



ภาพที่ 18 ลักษณะสปอร์ของ *Quadrisphaera* KR29 ที่เจริญบนอาหาร Half potato dextrose agar เวลา 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 19 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Quadrifera* สายพันธุ์ KR29 บนอาหาร 8 ชนิด

| ชนิดอาหาร | การเจริญ | เส้นใยอากาศ | เส้นใยอาหาร |
|----------------|--------------|-------------|-------------|
| ISP 2 | เจริญได้ดี | สีส้มสด | สีส้มสด |
| ISP 3 | เจริญได้น้อย | สีส้มสด | สีส้มสด |
| ISP 4 | เจริญได้น้อย | สีครีม | สีครีม |
| ISP 5 | เจริญได้น้อย | สีส้มอ่อน | สีส้มอ่อน |
| ISP 7 | เจริญได้น้อย | สีส้มอ่อน | สีส้มอ่อน |
| Bennett's agar | เจริญได้ดี | สีส้มสด | สีส้มสด |
| HPDA | เจริญได้ดี | สีส้มสด | สีส้มสด |
| NA | เจริญได้น้อย | สีส้มสด | สีส้มสด |

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KR29 พบว่าเจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 45 ช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4 ถึง 10 เจริญได้ดีที่พีเอช 7 และ 8 เจริญได้ที่มีความเข้มข้นเกลือที่ 0 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ สามารถย่อยแป้ง ย่อยโปรตีนเคซีน จากหางนม ไทโรซีน เอสคูลิน ฮีปปูเรท และยูเรียได้ มีการใช้น้ำตาลในการผลิตกรดเพียง 1 ชนิด คือ แรมโนส การทดสอบการใช้กรดอินทรีย์ทั้งหมด 7 ชนิดพบว่ามีการใช้ อะซิเตทเพียงชนิด และการทดสอบใช้สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 4 ชนิด สามารถใช้ ไพริดิน และโทลูอิน เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ดังแสดงตารางที่ 20

3. ลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกับสายพันธุ์มาตรฐาน

การศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของสายพันธุ์ KR29 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานที่มีความใกล้เคียงกัน 3 สายพันธุ์ คือ *Q. oryzae* TBRC 8486^T, *Q. granulorum* DSM 44889^T และ *Q. setariae* DD2A^T พบว่าสายพันธุ์ KR29 และสายพันธุ์มาตรฐานทุกสายพันธุ์ สามารถย่อยเอสคูลิน และ ฮีปปูเรท และใช้ไพริดินเป็นแหล่งของไฮโดรคาร์บอนได้ และสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงสุดที่ 7 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *Q. granulorum* JCM 16010^T ที่เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงสุดที่ 2 เปอร์เซ็นต์

จากการเปรียบเทียบสายพันธุ์ KR29 กับสายพันธุ์มาตรฐานที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ ยีน 16S rRNA มากที่สุด คือ *Q. oryzae* TBRC 8486^T พบว่ามีความแตกต่างกันคือ การย่อยไทโรซีน และแซนทีน การใช้ไซโคลเฮกเซน และเบนซีนเป็นแหล่งคาร์บอน และการผลิตกรดจากแรมโนส และ ช่วงของพีเอชในการเจริญที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 20 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29

| ลักษณะ | KR29 | ลักษณะ | KR29 |
|-------------------------------|------|-----------------------------------|----------|
| การผลิตกรด | | การย่อย | |
| อะราบีโนส | - | เอสคูลิน | + |
| เซลโลไบโอส | - | อิปปูเรท | + |
| กาแลคโตส | - | แป้ง | + |
| ดูซิทอล | - | หางนม | + |
| ฟรุกโตส | - | อะดีนีน | - |
| กลูโคส | - | ไฮโปแซนทีน | - |
| มอลโทส | - | ไทโรซีน | w |
| แมนนิทอล | - | แซนทีน | - |
| แมนโนส | - | ยูเรีย | + |
| อินซิทอล | - | การใช้กรดอินทรีย์ | |
| แรมโนส | w | อะซิเตท | + |
| ไรโบส | - | เบนโซเอต | - |
| ซอร์บิทอล | - | ซิเตรท | - |
| ซูโครส | - | แลคเตท | - |
| ทรีฮาโลส | - | มาเลต | - |
| ไซโลส | - | โพรไพโอเนต | - |
| การใช้สารประกอบพีนอลิก | | ทาร์ทเรต | - |
| ไซโคลเฮกเซน | - | การเจริญที่ | |
| ไพรีดีน | + | เจริญที่อุณหภูมิ (°C) | 15-45 °C |
| โทลูอีน | + | พีเอชที่เจริญ | 4-10 |
| เบนซีน | - | เจริญที่ความเข้มข้นเกลือ (% NaCl) | 7 |

หมายเหตุ: + ให้ผลเป็นบวก ; w, ให้ผลน้อย; -, ให้ผลเป็นลบ

ตารางที่ 21 ผลแสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 ที่แตกต่างกับสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์

| ลักษณะ | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| การผลิตกรด | | | | |
| มอลโทส | - | - | - | + |
| แมนนิทอล | - | - | - | + |
| แรมโนส | w | - | - | - |
| ซูโครส | - | - | - | w |
| การย่อย | | | | |
| แป้ง | + | + | - | + |
| หางนม | + | w | - | - |
| ไทโรซีน | w | - | - | - |
| แซนทีน | - | + | - | w |
| ยูเรีย | + | + | + | - |
| การใช้สารประกอบฟีนอลิก | | | | |
| ไซโคลเฮกเซน | - | + | + | + |
| เบนซีน | - | + | + | - |
| การใช้กรดอินทรีย์ | | | | |
| อะซิเตด | + | + | - | + |
| เบนโซเอต | - | - | - | + |
| ซิเตรท | - | - | - | + |
| แลคเตท | - | - | - | + |
| ทาร์เตรต | - | - | - | + |
| การเจริญที่ | | | | |
| เจริญที่อุณหภูมิ (°C) | 15-45 | 15-45 | 15-45 | 15-37 |
| พีเอชที่เจริญ | 4-10 | 4-8 | 5-10 | 5-10 |
| เจริญที่ความเข้มข้นเกลือ (% NaCl) | 7 | 7 | 7 | 2 |

หมายเหตุ: 1, สายพันธุ์ KR29^T 2, *Q. oryzae* TBRC8486^T 3, *Q. setariae* 113770^T 4, *Q. granulorum* JCM 16010^T +, ให้ผลเป็นบวก; w, ให้ผลน้อย; -, ให้ผลเป็นลบ

4.2.3.3 ลักษณะทางเคมีของสายพันธุ์ KR29

1. ชนิดของ DAP ในเซลล์

สายพันธุ์ KR29 มีชนิดของ *meso*-DAP ซึ่งสอดคล้องกับสมาชิกอื่น ๆ ที่อยู่ในสกุล *Quadriflustra* (ภาคผนวก ข ภาพที่ 6)

2. ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์

พบน้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส ในเซลล์ของสายพันธุ์ KR29 (ภาคผนวก ข ภาพที่ 7)

3. ชนิดของไขมันที่มีหัว

พบชนิดของไขมันแบบมีหัว คือ Diposphatidylglycerol (DPG), Phosphatidyl glycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), ไกลโคลิปิดที่มีหมู่อะมิโน, ไกลโคลิปิดและ ไขมันที่ไม่สามารถจำแนกได้จำนวน 4 ชนิด (ภาคผนวก ข ภาพที่ 13)

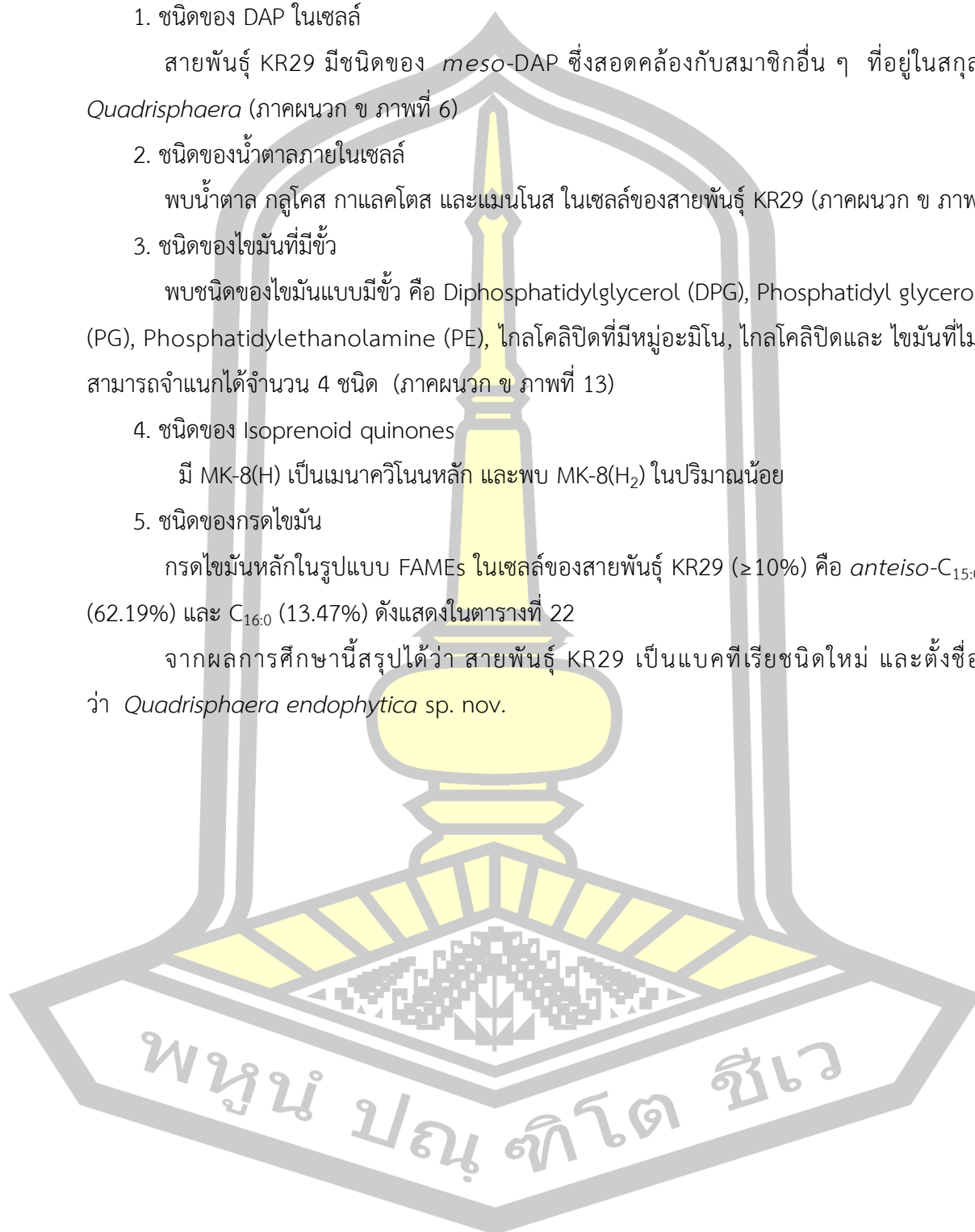
4. ชนิดของ Isoprenoid quinones

มี MK-8(H) เป็นเมนาควิโนนหลัก และพบ MK-8(H₂) ในปริมาณน้อย

5. ชนิดของกรดไขมัน

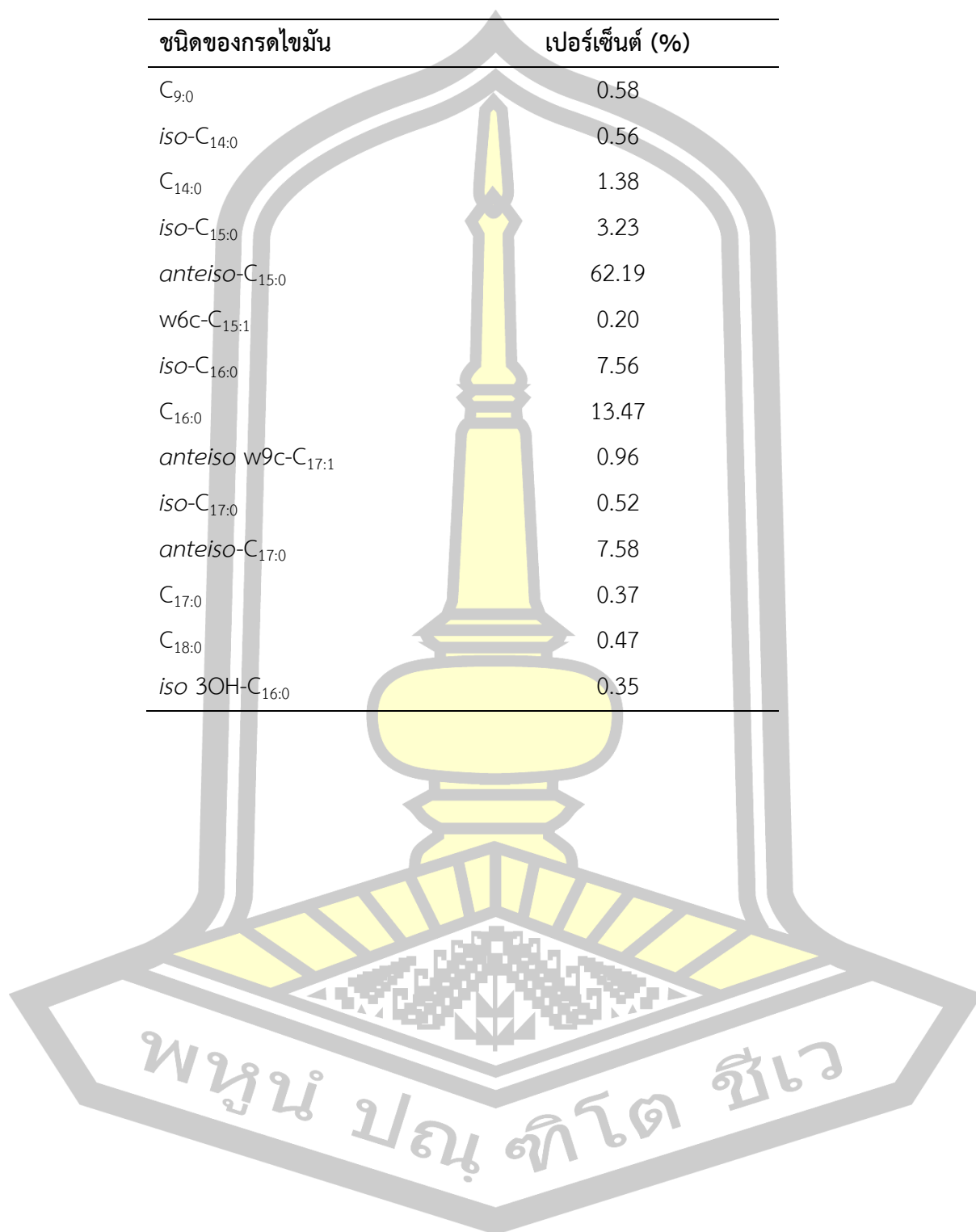
กรดไขมันหลักในรูปแบบ FAMES ในเซลล์ของสายพันธุ์ KR29 ($\geq 10\%$) คือ *anteiso*-C_{15:0} (62.19%) และ C_{16:0} (13.47%) ดังแสดงในตารางที่ 22

จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่า สายพันธุ์ KR29 เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ และตั้งชื่อว่า *Quadriflustra endophytica* sp. nov.



ตารางที่ 22 ชนิดกรดไขมันภายในเซลล์ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29

| ชนิดของกรดไขมัน | เปอร์เซ็นต์ (%) |
|--------------------------------------|-----------------|
| <i>C</i> _{9:0} | 0.58 |
| <i>iso-C</i> _{14:0} | 0.56 |
| <i>C</i> _{14:0} | 1.38 |
| <i>iso-C</i> _{15:0} | 3.23 |
| <i>anteiso-C</i> _{15:0} | 62.19 |
| <i>w6c-C</i> _{15:1} | 0.20 |
| <i>iso-C</i> _{16:0} | 7.56 |
| <i>C</i> _{16:0} | 13.47 |
| <i>anteiso w9c-C</i> _{17:1} | 0.96 |
| <i>iso-C</i> _{17:0} | 0.52 |
| <i>anteiso-C</i> _{17:0} | 7.58 |
| <i>C</i> _{17:0} | 0.37 |
| <i>C</i> _{18:0} | 0.47 |
| <i>iso 3OH-C</i> _{16:0} | 0.35 |



4.2.3.4 การทำเหมืองข้อมูลของจีโนมสายพันธุ์ KR29

1. การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์

การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์โดยใช้ “antiSMASH” พบว่าสายพันธุ์ KR29^T มีกลุ่มยีนที่มีความเหมือนกับในฐานข้อมูล ($\geq 40\%$) พบเพียง 1 กลุ่ม คือ T3PKS คือสาร Alkylresorcinol (66%) จากรายของ Zabolotneva et al. (2022) ระบุว่า alkylresorcinol เป็นสารประกอบเคมีที่พบในธรรมชาติที่สังเคราะห์โดย แบคทีเรีย เชื้อรา ฟองน้ำ และพืช เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง

2. การศึกษา ยีนโดยใช้วิธี *in silico*

จากการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติอื่น ๆ ของสายพันธุ์ KR29 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชในสภาวะความเครียด เช่น trehalose synthase, phosphatase, superoxide dismutase และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลาย เช่น alpha/beta hydrolase, ABC transporter substrate-binding protein และ voltage-gated potassium channel และ glycine dehydrogenase เป็นต้น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น asparaginase, 2,3-butanediol dehydrogenase (BDH), alpha-L-arabinofuranosidase และ riboflavin biosynthesis protein นอกจากนี้ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ ซึ่งกระตุ้นปฏิกิริยาได้หลากหลาย (ภาคผนวก ข ตารางที่ 3)



4.3 การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคข้าว และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง

4.3.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว

จากการทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลท ในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว *Pyricularia grisea* 21009 ผลการทดลองพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราในระดับดี ($\geq 75\%$) จำนวน 2 ไอโซเลทคิดเป็น 2.7 เปอร์เซ็นต์ คือ *Streptomyces* ไอโซเลท MK32 และ RD12 ยับยั้งในระดับปานกลาง ($\geq 50\%$) จำนวน 1 ไอโซเลทคิดเป็น 1.4 เปอร์เซ็นต์ คือ *Streptomyces* ไอโซเลท RD31 และการยับยั้งในระดับน้อย ($\geq 25\%$) จำนวน 3 ไอโซเลทคิดเป็น 4.1 เปอร์เซ็นต์ คือ *Streptomyces* ไอโซเลท RD2 และ RD9 และ *Microbispora* ไอโซเลท RD6 ดังแสดงในตารางที่ 23

4.3.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคข้าว

การทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลท ในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งของข้าว *Xanthomonas oryzae* PXO71 ผลการทดลองพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่ยับยั้งแบคทีเรียในระดับดีจำนวน 13 ไอโซเลทคิดเป็น 17.8 เปอร์เซ็นต์ประกอบไปด้วยไอโซเลท MK9, MK12, MK23, KR13, KR33, RD2, RD9, RD12, RD14, RD20, RD22, RD23 และ RD28 การยับยั้งในระดับปานกลาง ($\geq 50\%$) จำนวน 5 ไอโซเลทคิดเป็น 6.8 เปอร์เซ็นต์ คือ MK14, KR6, KR10, RD6 และ RD32 และการยับยั้งในระดับน้อย ($\geq 25\%$) จำนวน 7 ไอโซเลทคิดเป็น 9.6 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วยไอโซเลท MK3, MK6, MK8, MK18, KR3, RD1 และ RD11 ดังแสดงในตารางที่ 23 ซึ่งเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคข้าวส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (24.7%) มีเพียงไอโซเลท KR9 และ RD6 ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* (2.7%)

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคข้าวบนจานอาหาร

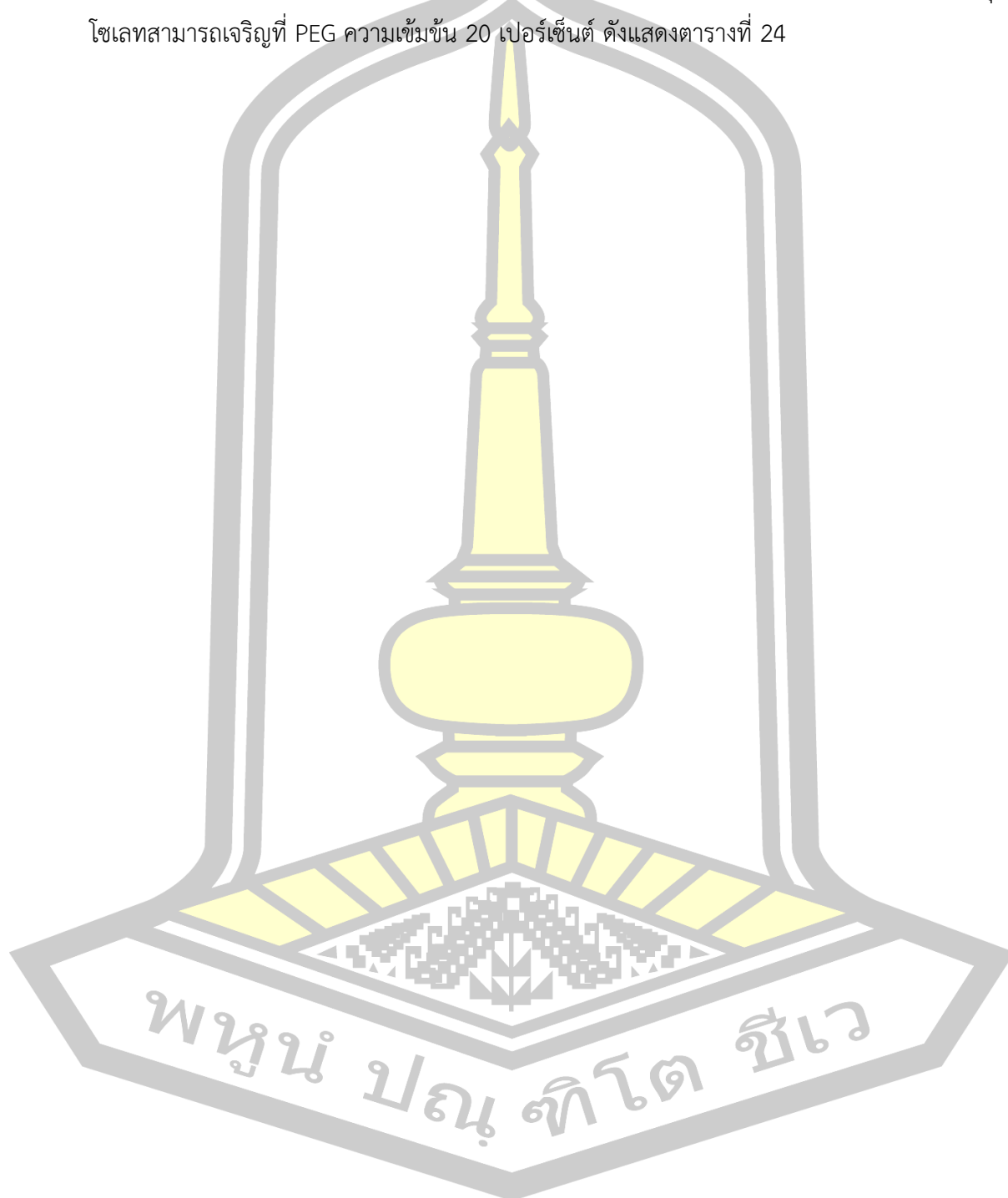
| ระดับการยับยั้ง | จำนวนไอโซเลตที่ยับยั้ง | จำนวนไอโซเลตที่ยับยั้ง |
|-----------------|------------------------|------------------------|
| | <i>P. oryzae</i> 21009 | <i>X. oryzae</i> PX071 |
| +++ | 2 ไอโซเลต (2.7%) | 13 ไอโซเลต (17.8%) |
| ++ | 1 ไอโซเลต (1.4%) | 5 ไอโซเลต (6.8%) |
| + | 3 ไอโซเลต (4.1%) | 7 ไอโซเลต (9.6%) |
| - | 67 ไอโซเลต (91.8%) | 48 ไอโซเลต (65.8%) |

หมายเหตุ: +++; ยับยั้งได้ดี $\geq 75\%$ ++; ยับยั้งได้ปานกลาง ($\geq 50\%$) +; ยับยั้งได้น้อย ($\geq 25\%$) และ -; ไม่ยับยั้ง

4.3.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง

จากผลการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคพืช ทำการคัดเลือกเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิดได้ในระดับปานกลางและดี ซึ่งมีทั้งหมด 20 ไอโซเลต มาทำการทดสอบการย่อยฟอสเฟต การย่อยเซลลูโลส การตรึงไนโตรเจน การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และ PEG ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาพบว่าเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต (75%) สามารถละลายฟอสเฟตได้ มีจำนวน 11 ไอโซเลต (55%) มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดคือ *Streptomyces* ไอโซเลต RD12 โดยมีความกว้างของบริเวณโซนใสเท่ากับ 42.25 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Streptomyces* ไอโซเลต MK32 และ RD31 โดยมีความกว้างของบริเวณโซนใสเท่ากับ 24.5 และ 17.00 มิลลิเมตรตามลำดับ การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase มีจำนวน 6 ไอโซเลต (30%) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ประกอบไปด้วยไอโซเลตที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* คือ MK32, KR10, RD6, RD12, RD23 และ RD31 การทดสอบความสามารถในการผลิต IAA พบว่าทุกไอโซเลตมีความสามารถในการผลิต IAA ตั้งแต่ 24.17 ± 1.99 ถึง 271.17 ± 5.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไอโซเลตที่มีความสามารถผลิต IAA ได้ดีที่สุดคือ *Streptomyces* RD28 เท่ากับ 271.17 ± 5.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือไอโซเลต *Streptomyces* MK23 มีความสามารถที่ผลิต IAA เท่ากับ 237.44 ± 9.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *Streptomyces* RD12 ที่ผลิต IAA เท่ากับ 196.39 ± 8.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจน พบว่าไม่มีไอโซเลตใดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ การศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และ PEG ที่แตกต่างกัน พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 1-10 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 12 ไอ

โชนเลข (60%) ที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 โชนเลข (5%) ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 โชนเลข (5%) และที่ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 6 โชนเลข (30%) และพบว่าทุกโชนเลขสามารถเจริญที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงตารางที่ 24



ตารางที่ 24 ผลการทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท ในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง

| ไอโซเลท | การละลายฟอสเฟต | ACC deaminase | การย่อยเซลลูโลส (มิลลิเมตร) | การผลิต IAA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | เกลือโซเดียมคลอไรด์ (% w/v) | PEG (% w/v) |
|---------|----------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------|
| KR6 | + | - | 3.75 | 36.15±3.65 ^{EF} | 7 | 1-20 |
| KR10 | + | + | - | 40.31±0.79 ^{EF} | 10 | 1-20 |
| KR13 | + | - | - | 45.54±5.57 ^{EF} | 7 | 1-20 |
| KR33 | + | - | 11.25 | 78.19±7.80 ^{DE} | 7 | 1-20 |
| MK9 | - | - | - | 45.82±4.93 ^{EF} | 10 | 1-20 |
| MK12 | + | - | - | 41.55±1.44 ^{EF} | 10 | 1-20 |
| MK14 | + | - | 7.25 | 58.87±6.04 ^E | 7 | 1-20 |
| MK23 | - | - | - | 237.44±9.67 ^B | 10 | 1-20 |
| MK32 | + | + | 24.5 | 33.56±3.04 ^{EF} | 7 | 1-20 |
| RD2 | + | - | 8.5 | 27.80±0.18 ^F | 10 | 1-20 |
| RD6 | - | + | - | 54.07±2.72 ^{EF} | 3 | 1-20 |
| RD9 | + | - | 8.0 | 32.44±0.86 ^{EF} | 10 | 1-20 |
| RD12 | + | + | 42.25 | 196.39±8.32 ^C | 10 | 1-20 |
| RD14 | + | - | - | 53.39±3.01 ^{EF} | 10 | 1-20 |
| RD20 | + | - | 4.00 | 67.52±2.39 ^{DE} | 7 | 1-20 |
| RD22 | + | - | - | 84.57±4.21 ^D | 10 | 1-20 |
| RD23 | + | + | 16.25 | 35.62±0.27 ^{GH} | 10 | 1-20 |
| RD28 | - | - | - | 271.17±5.26 ^A | 10 | 1-20 |
| RD31 | + | + | 17.00 | 24.17±1.99 ^F | 5 | 1-20 |
| RD32 | - | - | 3.5 | 67.80±2.99 ^{DE} | 10 | 1-20 |

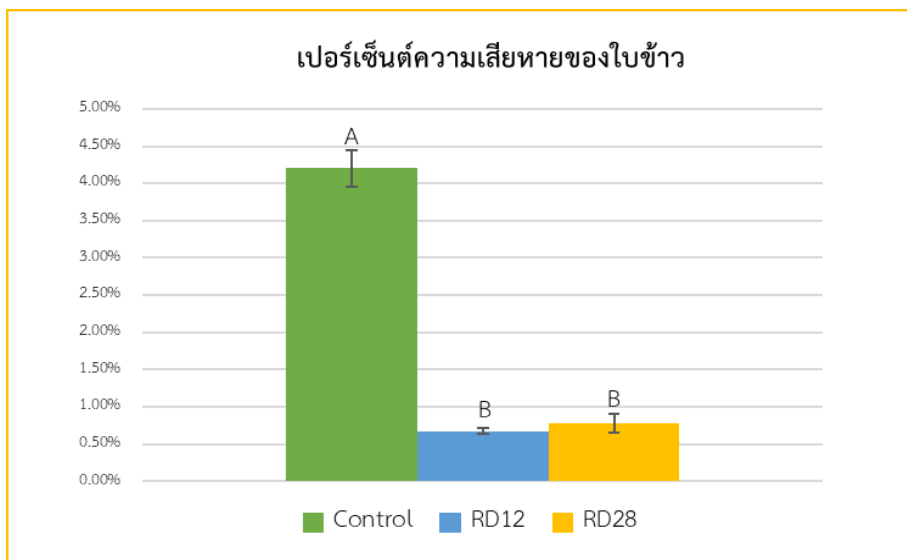
หมายเหตุ; ข้อมูลการผลิต IAA แสดงค่า Mean±SE และตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) + คือ ให้ผลบวก, - คือ ให้ผลลบ

4.4 ความสามารถของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะต้นกล้า

จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลองในข้อ 4.2.3 คัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Streptomyces* RD12 และ RD28 ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคข้าวในงานทดสอบ การผลิต IAA ในปริมาณ 196.39 ± 8.32 และ 271.17 ± 5.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไอโซเลท RD12 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ย่อยเซลลูโลส การผลิต ACC deaminase และสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวในงานทดสอบได้ในระดับดี จึงทำการคัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทนี้มาทดสอบการควบคุมโรคแบคทีเรียขอบใบแห้งในข้าว และการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในระยะต้นกล้าดังนี้

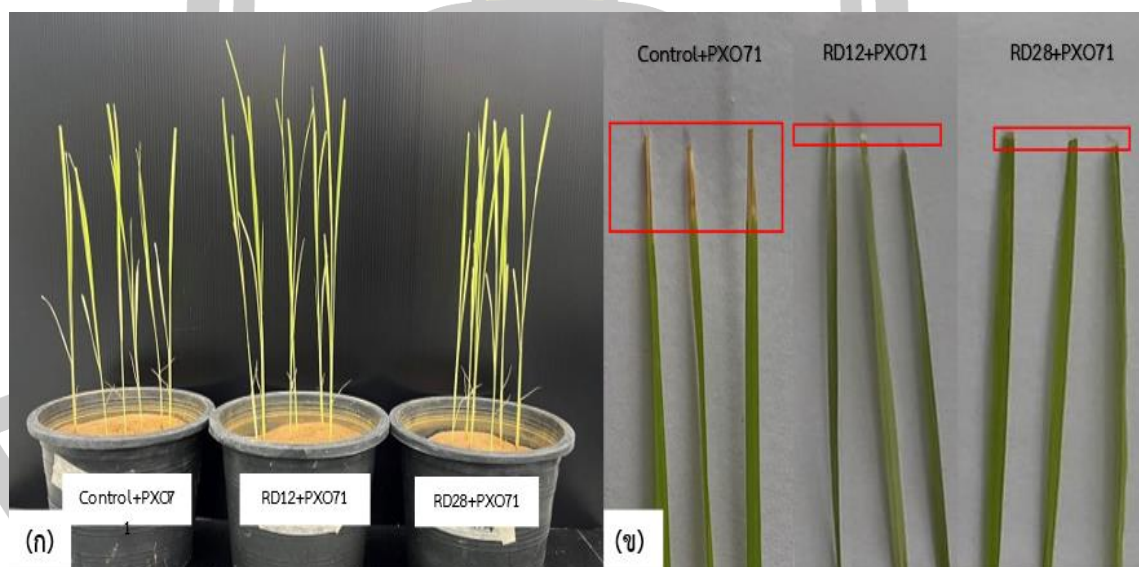
4.4.1 ผลการศึกษาการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวในระยะต้นกล้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแบคทีเรียขอบใบแห้งในข้าวในระยะต้นกล้าของไอโซเลท RD12 และ RD28 โดยใช้แบคทีเรีย *X. oryzae* PXO71^T ทดสอบโดยวิธี clipping method ทำการวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของใบข้าว พบว่ากรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 และ RD28 มีเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบข้าวที่ 4.20 ± 0.24 , 0.67 ± 0.04 และ 0.78 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 19) ซึ่งกรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความเสียหายของข้าวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ RD28 ซึ่งกรรมวิธีที่มีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทั้ง 2 กรรมวิธีนี้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของข้าวน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ความเสียหายของใบข้าวของชุดกรรมวิธีที่มีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจะมีรอยโรคที่น้อยกว่าการกรรมวิธีควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบข้าวที่มีสาเหตุจาก *X. oryzae* PXO71 ในกรรมวิธีควบคุม และมีเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์

หมายเหตุ:แสดงผลในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบข้าว (Mean±Standard Error) ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 20 การเจริญของข้าวและรอยโรคของใบข้าวจากโรคขอบใบแห้งที่ทดสอบโดยวิธี clipping method

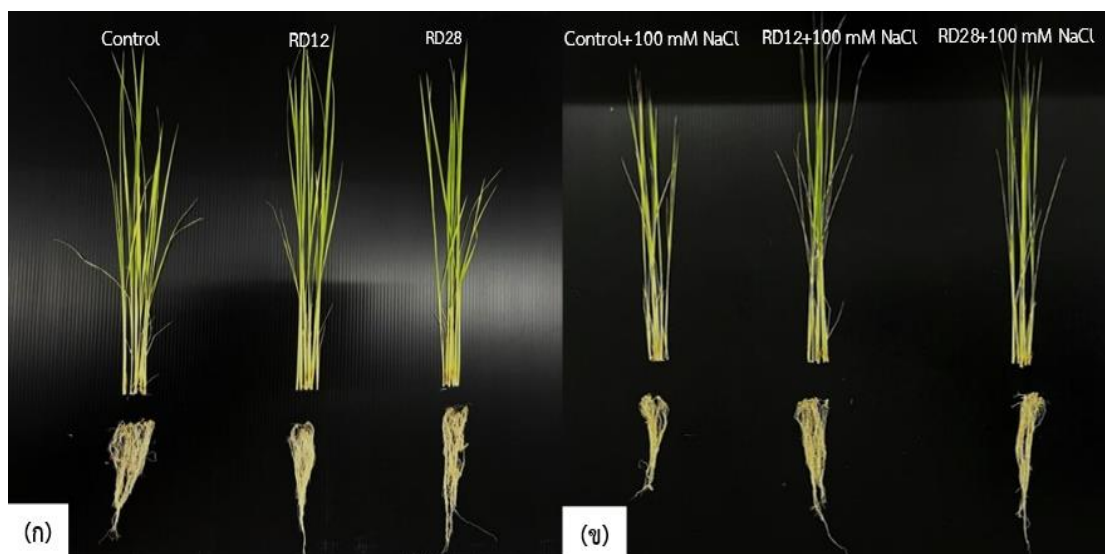
(ก) การเจริญของข้าวและการเกิดโรคขอบใบแห้ง ในกระถางปลูกอายุ 37 วัน

(ข) ลักษณะรอยโรคของใบข้าวจากโรคขอบใบแห้ง

4.4.2 การศึกษาเอนไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือในระยะต้นกล้า

การทดสอบเอนไฟติกแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท RD12 และ RD28 ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวใน สภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือด้วยวิธีการปลูกในกระถาง โดยทำการเปรียบเทียบความยาวรากและลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก จากการเปรียบเทียบการเจริญของข้าวพบว่าในทุก ๆ กรรมวิธีในสภาวะเครียดเกลือจะมีการเจริญที่น้อยกว่าสภาวะที่ไม่มีเกลือ ในสภาวะที่มีเกลือ 100 mM ในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีแอกติโนแบคทีเรีย ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากลดลงโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีเกลือ 0 mM ซึ่งกรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 จะให้ผลดีที่สุดเมื่อเจริญในสภาวะเครียดเกลือ โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ 100 mM กรรมวิธีไอโซเลท RD12 จะมีความยาวลำต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากสูงที่สุดเมื่อเปรียบกรรมวิธีอื่น ๆ และการเจริญของข้าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่สภาวะที่ไม่เติมเกลือ ($p > 0.05$) กรรมวิธีที่มีแอกติโนแบคทีเรียมีการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุมทั้งในสภาวะปกติกับสภาวะเครียดเกลือดังแสดงในภาพที่ 21 และภาพที่ 22 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 100 mM ไอโซเลท RD12 และ RD28 จะให้ความยาวลำต้น น้ำหนักแห้งของรากที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทั้ง 2 ไอโซเลทจะมีค่ามากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไอโซเลท RD12 จะให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นที่มากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม และแต่ที่ความเข้มข้นของเกลือ 100 mM ค่าความยาวราก และน้ำหนักสดของราก ในกรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 และ RD28 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 25





ภาพที่ 21 ลักษณะการเจริญของข้าวในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM

(ก) ลักษณะลำต้นและรากข้าวในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM

(ข) ลักษณะลำต้นและรากข้าวในสภาวะที่มีเกลือ 100 mM

4.4.3 การศึกษาเอนไฟติกแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะต้นกล้า ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ

4.4.3.1 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์

จากการศึกษาพบว่า เมื่อพืชเจริญในสภาวะที่มีเกลือจะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญในสภาวะที่ไม่เติมเกลือในทุก ๆ กรรมวิธี เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจะเห็นได้ว่ากรรมวิธีที่มีแอคติโนแบคทีเรีย จะมีการผลิตคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมทั้งในสภาวะที่ไม่เติมเกลือและสภาวะที่เติมเกลือ ในสภาวะเครียดเกลือกรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 และ RD28 จะมีการผลิตคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งกรรมวิธีที่มีการผลิตสารตั้งที่กล่าวมาได้ดีที่สุดคือ กรรมวิธีที่มี RD12 รองลงมาคือ RD28 ดังแสดงในตารางที่ 26 และภาพที่ 23

4.4.3.2 ปริมาณสะสมของโพรลีน

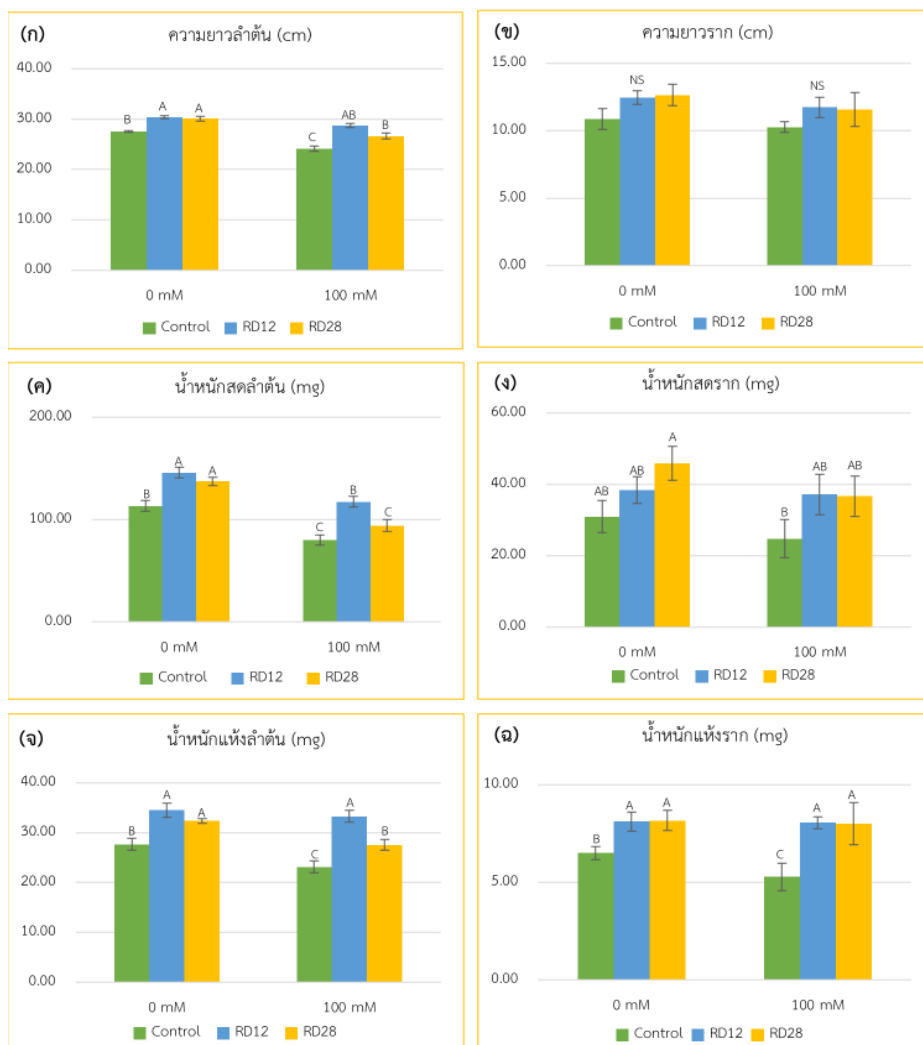
ในสภาวะเครียดเกลือ ปริมาณโพรลีนมีการเพิ่มขึ้นในทุกๆ กรรมวิธี โดยในสภาวะที่มีเกลือ 100 mM กรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD28 และ RD12 จะมีการเพิ่มขึ้นของโพรลีนมากกว่าที่ 0 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ กรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD28 มีการสะสมโพ

รลีนที่ใบข้าวมากที่สุดที่ 186.40 ± 15.71 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดของใบ รองลงมาคือ RD12 มีปริมาณการสะสมโพรลีนที่ 168.73 ± 33.70 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดของใบ ซึ่งทั้งสองไอโซเลทมีปริมาณของโพรลีนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีปริมาณโพรลีนมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีการสะสมโพรลีนน้อยที่สุดเท่ากับ 31.83 ± 2.94 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดของใบ ดังแสดงในตารางที่ 26 และภาพที่ 23

4.4.3.2 การร่วไหลของอิเล็กโทรไลต์

ในทุกๆ กรรมวิธี ภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่ 100 mM มีการร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ที่สูงกว่าสภาวะที่มีเกลือที่ 0 mM แต่มีเฉพาะกรรมวิธีควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของการร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่ 100 mM กรรมวิธีควบคุมมีการร่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์มากที่สุดที่ 93.41 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีไอโซเลท RD12 และ RD28 ซึ่งให้ค่าการร่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 26 และภาพที่ 23)





ภาพที่ 22 กราฟแสดงการวัดการเจริญของข้าวในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มีแอกติโนแบคทีเรีย ในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM

(ก-ข) ความยาวลำต้นและรวง

(ค-ง) น้ำหนักสดลำต้นและรวง

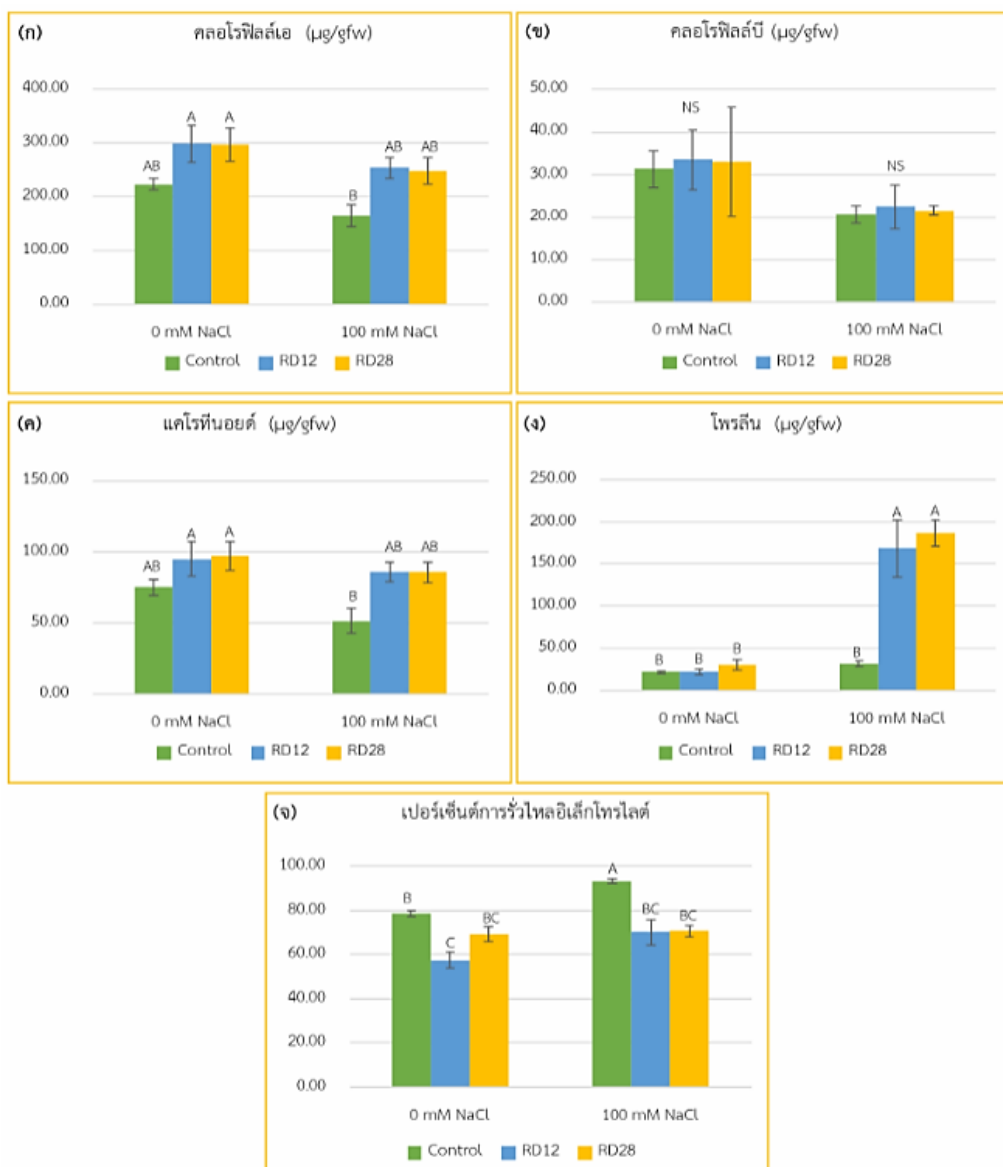
(จ-ฉ) น้ำหนักแห้งลำต้นและรวง

หมายเหตุ; ข้อมูลแสดงค่า Mean±SE และตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) และ NS หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 25 การวัดการเจริญของข้าวในกรรมวิธีควบคุม และการมวิธีที่มีเชื้อแอคติโนแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM

| กรรมวิธี | การวัดการเจริญของข้าว | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | ความยาวลำต้น (เซนติเมตร) | ความยาวราก (เซนติเมตร) | น้ำหนักสดลำต้น (มิลลิกรัม) | น้ำหนักสดราก (มิลลิกรัม) | น้ำหนักแห้งลำต้น (มิลลิกรัม) | น้ำหนักแห้งราก (มิลลิกรัม) |
| ควบคุม 0 mM NaCl | 27.53± 0.18 ^B | 10.87± 0.78 | 113.44± 6.37 ^B | 30.94± 4.44 ^{AB} | 27.67± 1.17 ^B | 6.50± 0.33 ^B |
| ไอโซเลท RD12 0 mM NaCl | 30.40± 0.25 ^A | 12.46± 0.52 | 145.94± 5.33 ^A | 38.39± 3.77 ^{AB} | 34.50± 1.41 ^A | 8.11± 0.48 ^A |
| ไอโซเลท RD28 0 mM NaCl | 30.14± 0.50 ^A | 12.64± 0.78 | 137.44± 4.03 ^A | 45.89± 4.78 ^A | 32.33± 0.42 ^A | 8.17± 0.52 ^A |
| ควบคุม 100 mM NaCl | 24.13± 0.56 ^C | 10.26± 0.40 | 80.28± 5.00 ^C | 24.78± 5.39 ^B | 23.14± 1.20 ^C | 5.28± 0.70 ^C |
| ไอโซเลท RD12 100 mM NaCl | 28.76± 0.46 ^{AB} | 11.74± 0.75 | 117.50± 5.30 ^B | 37.17± 5.63 ^{AB} | 33.28± 1.17 ^A | 8.06± 0.31 ^A |
| ไอโซเลท RD28 100 mM NaCl | 26.64± 0.60 ^B | 11.57± 1.27 | 94.28± 6.02 ^C | 36.67± 5.65 ^{AB} | 27.56± 1.12 ^B | 8.00± 1.07 ^A |

หมายเหตุ; ข้อมูลแสดงค่า Mean±SE ตัวอักษรที่ต่างกันแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 23 กราฟแสดงปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ โปรตีน และการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ของใบข้าวในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มีแอกติโนแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM

(ก-ค) ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ของใบข้าวในสภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือ

(ง) ปริมาณโปรตีนของใบข้าวในสภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือ

(จ) การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ในใบข้าวในสภาวะปกติและสภาวะเครียดเกลือ

หมายเหตุ; ข้อมูลแสดงค่า Mean \pm SE และตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) และ NS หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 26 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ โพรตีน และการร่วงหลุดของอิเล็กโทรไลต์ของกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่มี แอคติโนแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ 0 mM และ 100 mM

| กรรมวิธี | ปริมาณ | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| | คลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัม/กรัม*) | คลอโรฟิลล์บี (ไมโครกรัม/กรัม*) | แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัม*) | โพรตีน (ไมโครกรัม/กรัม*) | การร่วงหลุดของ อิเล็กโทรไลต์ |
| ควบคุม 0 mM NaCl | 222.83±10.62 ^{AB} | 31.27±4.36 | 75.44±5.60 ^{AB} | 21.93±1.68 ^B | 78.65±1.43% ^B |
| ไอโซเลท RD12 0 mM NaCl | 298.74±33.80 ^A | 33.50±6.98 | 95.23±12.20 ^A | 22.34±3.51 ^B | 57.58±3.64% ^C |
| ไอโซเลท RD28 0 mM NaCl | 297.54±31.27 ^A | 33.00±12.66 | 97.46±9.80 ^A | 30.53±5.50 ^B | 69.40±3.3% ^{BC} |
| ควบคุม 100 mM NaCl | 165.01±20.52 ^B | 20.71±1.98 | 51.76±9.07 ^B | 31.83±2.94 ^B | 93.41±0.96% ^A |
| ไอโซเลท RD12 100 mM NaCl | 253.83±18.49 ^A | 22.46±5.10 | 86.05±6.65 ^{AB} | 168.73±33.70 ^A | 70.30±5.71% ^{BC} |
| ไอโซเลท RD28 100 mM NaCl | 248.61±24.61 ^A | 21.56±1.10 | 86.00±7.39 ^{AB} | 186.40±15.71 ^A | 70.76±2.61% ^{BC} |

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่า Mean±SE ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) *คือ หน่วย ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักสดของใบพืช

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล

การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากข้าวหอมมะลิที่ฟอกฆ่าเชื้อจำนวน 73 ไอโซเลท โดยการจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและข้อมูลของยีน 16S rRNA จำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 5 สกุล ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (91%) รองลงมาคือ *Microbispora* (4%), *Micromonospora* (3%), *Actinoplanes* (1%), และ *Quadrisphaera* (1%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Mingma and Duangmal (2018) ศึกษาแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างข้าวหอมมะลิ 9 จังหวัดในประเทศไทย ได้จำนวน 191 ไอโซเลท โดยคัดแยกจากรากและลำต้นข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอก จากการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า 96 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ 95 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม Non-*Streptomyces* มีจำนวน 10 สกุล โดยสกุลที่พบมากในกลุ่มนี้คือสกุล *Microbispora* และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wei et al. (2010) คัดแยกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชของเขตอนุรักษ์ป่าชายเลนที่เมือง Shankou ประเทศจีน ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* spp. รองลงมาคือ *Micromonospora* spp. และสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งคัดแยก *Streptomyces* จากเนื้อเยื่อพืชได้เป็นสกุลหลัก (Coombs et al., 2003; Taechowisan et al., 2003; Tian et al., 2004; Tian et al., 2007; Inderiati & Franco, 2008; Gangwar et al., 2012)

5.2 การจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์

จากการจำแนกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ของสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T และ MK7 สกุล *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T และสกุล *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy มีการใช้ข้อมูลทางด้านจีโนมไทป์ ฟิโนไทป์ และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็นข้อมูลประกอบเพื่อยืนยันว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลของจีโนมไทป์ไอโซเลท MK5^T และ MK7 เป็นสายพันธุ์เดียวกัน จึงใช้สายพันธุ์ MK5^T เป็นตัวแทนในการศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีคำอธิบายสายพันธุ์ดังนี้

5.2.1 *Streptomyces mahasarakhamensis* sp. nov.

ตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่ ตามจังหวัดมหาสารคาม “mahasarakhamensis” บริเวณที่เก็บตัวอย่างข้าวที่จังหวัดมหาสารคาม

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีการเรียงตัวของสปอร์ลักษณะสายโซ่สปอร์ที่เรียงตัวแบบเกลียวปิด (close spiral) เจริญที่อุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเกลือที่ 0-10 เปอร์เซ็นต์ และช่วงพีเอชที่เจริญคือ 5 - 10 มีความสามารถย่อย อะดีนีน ไฮโปแซนทีน ไทโรซีน แซนทีน หางนมและยูเรีย สามารถใช้สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก 3 ชนิด คือ ไพรีดีน โทลูอิน และเบนซีน สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง 14 ชนิดในการผลิตกรด อีกทั้งยังสามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ 5 ชนิด คือ อะซิเตท ซิเตรท แลคเตท มาเลต และโพรไพโอเนต

การตรวจสอบจีโนมของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T โดยการศึกษาในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารชีวสังเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล “antiSMASH” ประกอบไปด้วยกลุ่มยีน 7 ชนิด ประกอบไปด้วยกลุ่ม Ectoine ซึ่งเป็น compatible solute พบมากในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทนเค็ม เพื่อลดสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก ความร้อน และความเค็ม ซึ่งเป็นสารประกอบที่กักเก็บน้ำได้สูง ทำให้สารชีวโมเลกุลในเซลล์คงตัว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางวิทยาศาสตร์ เครื่องสำอาง และยา (Reshetnikov et al., 2011) กลุ่ม Terpene ได้แก่ Albaflavenone, Geosmin และ Hopene ซึ่งสาร Albaflavenone จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่ม tricyclic sesquiterpene มีกลิ่นหอมคล้ายกับสาร geosmin และมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย (Cihak et al., 2017) กลุ่ม RiPPs คือสาร Informatipeptin กลุ่ม NI-siderophore คือสาร Desferrioxamin B (DFOB) เป็นสารที่ค้นพบในแบคทีเรียที่พบในดิน คือ *Streptomyces pilosus* และยังพบการผลิตในแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มอื่น มีการนำไปใช้เป็นยาในการรักษาพิษจากธาตุเหล็กเฉียบพลันและภาวะธาตุเหล็กเกินเรื้อรัง เช่น ธาลัสซีเมีย (thalassemia) และภาวะเหล็กเกิน (hemochromatosis) โดยทำหน้าที่เป็นสารคีเลตจับกับธาตุเหล็กส่วนเกินในร่างกาย และขับออกผ่านทางปัสสาวะ (Bellotti & Remelli, 2021) กลุ่ม Type I polyketide synthases (T1PKS) คือสาร Neocarzilin A/Neocarzilin B กลุ่ม Type II polyketide synthases (T2PKS) คือ สาร Spore pigment และกลุ่ม Type III polyketide synthases (T3PKS) คือ สาร Gemicidin และ Flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxy naphthalene จากงานวิจัยของ Rao et al. (2022) flaviolin เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติโดยพบใน *Aspergillus fumigatus* และ *Streptomyces albidoflavus* และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ปัจจุบันมีการศึกษาการจำลองการจับเชิงโมเลกุลและพลวัตเชิงโมเลกุลของสาร flaviolin ที่ผลิตจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่ 3-chymotrypsin-like protease (3CL^{Pro}) ของไวรัสโคโรนา (SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019; COVID-19)

จากการศึกษาของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T โดยใช้วิธี *in silico* พบยื่นที่ส่งเสริมการเจริญของพืชที่หลากหลาย เช่น ความต้านทานความเครียด การละลายฟอสเฟต การผลิตออกซิน การผลิตไกลซีนบีเทน และโพรลีน ซึ่งช่วยให้พืชทนต่อความเค็มได้ดี รวมทั้งมียื่นที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ที่จุลินทรีย์จะสร้างขึ้นในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เพื่อช่วยให้พืชทนทานได้มากขึ้น จากงานวิจัยของ Clendennen et al. (2019) ระบุว่าไกลซีนบีเทนและโพรลีน เป็นสารออสโมไลต์หรือ compatible solutes ที่มีการสะสมในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก เช่น สภาวะขาดน้ำ และเครียดเกลือ โดยการรักษาโครงสร้างของเซลล์และเอนไซม์ให้ทำงานคงที่ในสภาวะเครียด อีกทั้งยังพบยื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์สำคัญชนิดต่าง ๆ เช่น โปรตีเอส ไคติเนส อาร์จีนินดีอะมิเนส อะไมเลส ไลเปส และย่อยสลายไซแลน จากรายงานของ Berger and Reynold (1958) ทำการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces griseus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินกลายเป็น N-acetylglucosamine และ N, N-diacetylchitobiose อีกทั้งยังพบว่าไคติเนสสามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช และจากรายงานของ Park et al. (2003) ทำการศึกษาเอนไซม์อาร์จีนินดีอะมิเนส (Arginine deiminase; ADI) ผลิตจาก *Mycoplasma arginine* มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อย L-arginine ไปเป็น L-citrulline และแอมโมเนีย สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายชนิดของมนุษย์ นอกจากนี้ ADI ยังมีฤทธิ์ต้านเนื้องอก โดยมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์น้อยมาก

5.2.2 *Actinoplanes oryza* sp. nov.

ตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่ “*o’ry’zae*” ตามชื่อสกุลของพืชที่คัดแยก *Oryza sativa*

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีการสร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มที่มีรูปร่างเป็นท่อยาว (tubular sporangia) เจริญที่อุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเกลือที่ 0-2 เปอร์เซ็นต์ และช่วงพีเอชที่เจริญคือ 6-10 สามารถย่อยแป้ง หางนม ไทโรซีน และยูเรีย สามารถผลิตกรดได้ในน้ำตาล 15 ชนิด และสามารถใช้คาร์บอนได้ 4 ชนิด คือ อะราบิโนส อินซิทอล แรมโนส และราฟฟิโนส สามารถใช้สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด อีกทั้งยังสามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ 2 ชนิด คือ อะซิเตท และแลคเตท

การศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารชีวสังเคราะห์ พบสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aromatic polyketide มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดีดหลายชนิด ประกอบไปด้วยกลุ่ม T2PKS คือ lysolipin I กลุ่ม T3PKS คือสาร loseolamycin A1/loseolamycin A2 และ endophenazine A/endophenazine B กลุ่ม RiPPs คือ สาร SapB กลุ่ม Non-alpha poly-

amino acids like e-Polylysine (NAPAA) คือสาร ϵ -Poly-L-lysine และกลุ่ม NRP-metallophore คือ สาร myxochelin B/myxochelin A จากรายงานของ Wu et al. (2015) ระบุว่า endophenazine มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* และยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* อีกทั้งยังเป็นสารที่ช่วยให้แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสม และเป็นสารที่พบในกลุ่มของไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช อีกทั้งยังมีรายงานว่าสาร ϵ -Poly-L-lysine (100%) เป็น homopoly amino acid มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้กว้างขวาง และมีการนำสารชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา ซึ่งไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม (Wang et al., 2021)

จากการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ และการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม พบว่า *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช เช่น การทนต่อความสภาวะเครียดโดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไกลซีนบีเทน โพรลีน ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ที่จุลินทรีย์จะสร้างขึ้นในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น heat shock protein, cold shock protein และ chaperone protein ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ คือ Phytoene synthase และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟอสเฟตที่สามารถนำไปย่อยฟอสเฟตให้กับพืชในดินได้ อีกทั้งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรม เช่น อาร์จินีนดีอะมิเนส โปรตีเอส ไลเปส อะไมเลส อะราบินอฟูราโนซิเดส และไซแลนเนส

5.2.3 *Quadrisphaera endophytica* sp. nov.

ตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่ “en’do’phy’ti’ca” ตามแหล่งที่มาคือของเนื้อเยื่อพืช endophyte ลักษณะสัณฐานวิทยา *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เซลล์มีรูปร่างแบบกลม สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบ 4 เซลล์ (tetrad) เจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเกลือที่ 0-7 เปอร์เซ็นต์ และช่วงพีเอชที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วง 4-10 สามารถย่อยแป้ง หางนม ไทโรซีน เอสคูลิน อีปูปูเรท และยูเรีย มีการใช้น้ำตาลในการผลิตกรดเพียง 1 ชนิด คือ แรมโนสสามารถใช้กรดอินทรีย์ได้เพียง 1 ชนิด คือ อะซิเตท และสามารถใช้อาหารประกอบฟีนอลิก 2 ชนิด คือ ไพรดีน และโทลูอิน เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ

จากการตรวจสอบจีโนมของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 พบกลุ่มยีน 1 กลุ่ม คือ T3PKS คือสาร Alkylresorcinol (66%) จากรายงานของ Zabolotneva et al. (2022) ระบุว่า alkylresorcinol เป็นสารประกอบเคมีที่พบในธรรมชาติที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย เชื้อรา ฟองน้ำ และพืช เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชในสภาวะความเครียด เช่น Trehalose

synthase, Phosphatase, Superoxide dismutase และอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลาย และอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น Asparaginase, 2,3-Butanediol dehydrogenase (BDH), alpha-L-arabinofuranosidase และ Riboflavin biosynthesis protein นอกจากนี้ยังมีอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาต่าง ๆ ซึ่งกระตุ้นปฏิกิริยาได้หลากหลาย จากการรายงานของ Ebrahiminezhad et al. (2011) ระบุว่า *L*-Asparaginase เป็นสารต้านมะเร็ง ปัจจุบันถูกใช้ในการบำบัดมะเร็งต่อมน้ำเหลืองและมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิดในสัตว์ทดลองและมนุษย์ และมีการใช้ร่วมกับสารอื่นในการทำเคมีบำบัดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟบลาสต์ *L*-Asparaginase เป็น amidohydrolase ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิส asparagine กลายเป็น aspartic acid และ ammonia ส่งผลให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถสังเคราะห์ *L*-asparagine ได้ เนื่องจากไม่มี *L*-asparagine synthetase เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์

5.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคข้าว และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง

การทดสอบความสามารถเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใหม่ในเชื้อรา *Pyricularia grisea* 21009 และแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว *X. oryzae* PXO71 โดยใช้เทคนิค dual culture ผลการทดสอบพบว่าการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในระดับดีและปานกลาง มีจำนวน 2 (2.7%) และ 1 (1.4%) ไอโซเลท ตามลำดับ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคข้าวยับยั้งในระดับดี และปานกลาง มีจำนวน 13 ไอโซเลท (17.8%) และ 5 (6.8%) ไอโซเลทตามลำดับ ซึ่งเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* มีเพียงจำนวน 2 ไอโซเลทที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kampapongsa and Kaewkla (2016) ซึ่งทำการศึกษาเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L. KDML 105) จำนวน 116 ไอโซเลท ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคราในข้าว *X. oryzae* KHWK 4.1_UBN_06, *Pyricularia grisea* 61119, *Helminthosporium oryzae* DOAC 1570 และ *Curvularia lunata* BCC 15558 โดยใช้เทคนิค dual culture ผลการศึกษาพบว่าสามารถยับยั้ง *X. oryzae* KHWK 4.1_UBN_06 และ *P. grisea* 61119 มีจำนวน 22 ไอโซเลท (18.8%) และ 4 ไอโซเลท (3.4 %) ตามลำดับ ซึ่งแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Van Hop et al. (2014) ศึกษาแอกติโนแบคทีเรีย 167 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากใบและดินรอบรากข้าว พบว่ามีจำนวน 17 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ในงานทดสอบ และเมื่อมีการทดสอบการยับยั้งการร่อยเกิดโรคราในใบข้าวพบว่า

Streptomyces toxytricini VN08-A-12 สามารถลดการเกิดรอยโรคได้มากที่สุดที่ 38.3 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Punngam et al. (2011) คัดแยกแอกติโนแบคทีเรียในนาข้าว จาก 16 จังหวัดในประเทศไทย มีจำนวน 247 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 198 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ 49 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม Non-*Streptomyces* เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าว 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* บนจานทดสอบ พบว่าไอโซเลท RF16-12 มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าวทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces yogyakartensis* NBRC 100779 ที่ความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่ 99.86 เปอร์เซ็นต์

จากผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว คัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง พบว่ามีจำนวน 15, 11 และ 6 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต การย่อยเซลลูโลส และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ตามลำดับ และพบว่าทุกไอโซเลทมีความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งไอโซเลทที่มีความสามารถที่ผลิต IAA ได้ดีที่สุดคือ RD28 เท่ากับ 271.17 ± 5.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl และ PEG ที่แตกต่างกัน พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบว่าทุกไอโซเลทสามารถเจริญที่ความเข้มข้นของ PEG ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดสอบการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลองนี้ ได้คัดเลือกเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Streptomyces* RD12 และ RD28 ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคข้าวในงานทดสอบ การผลิต IAA ในปริมาณสูง และสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น PEG 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไอโซเลท RD12 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ย่อยเซลลูโลส การผลิต ACC deaminase เพื่อนำไปทำการทดสอบการส่งเสริมการเจริญให้กับข้าวในสภาวะเครียดเกลือ กลไกที่สำคัญในการช่วยให้พืชทนเค็มคือ การผลิตฮอร์โมนพืชในรูป IAA โดยจะช่วยให้กระตุ้นการยึดตัวของเซลล์ในส่วนจากรากและยอด ส่งผลให้มีพื้นที่มากขึ้นในการดูดซึมน้ำและลำเลียงอาหารของพืช อีกทั้งยังมีการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กับแบคทีเรียที่เกิดประโยชน์ และมีการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ในสภาวะเครียด (Sing, 2018) และการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งจะช่วยให้พืชทนต่อสภาวะเครียดในสภาพแวดล้อม จากรายงานของ Boukhatem et al. (2022) ระบุว่าแอกติโนแบคทีเรียสามารถผลิต ACC deaminase มาย่อยสลาย ACC (aminocyclopropane-1-carboxylate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเอทิลีนที่มีการผลิตในสภาวะเครียด เปลี่ยนไปเป็น alpha ketobutyrate เมทไทโอนีน และแอมโมเนีย ส่งผลให้ระดับเอทิลีนลดลง ช่วยให้สามารถลดความเครียดในพืชได้

จากรายงานวิจัยของ Nozari et al. (2021) ที่ทำการศึกษา *Streptomyces* จำนวน 10 ไอโซเลท ในการส่งเสริมข้าวโพดในสภาวะเครียดเกลือ โดยมีการทดสอบการผลิต siderophores, ACC deaminase และ phenazines ภายใต้ความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้น NaCl (50–300 mM) พบว่ามีการผลิต ACC deaminase จำนวน 6 ไอโซเลท และมีจำนวน 4 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชและทนทานต่อความเค็มที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งไอโซเลท CLV178 มีความสามารถในการผลิต IAA และ siderophores ได้ดีที่สุด และการผลิต phenazines มีจำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทดังกล่าวสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 300 มิลลิโมลาร์ และจากรายงานของ Lasudee et al. (2018) ศึกษาแอคติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวและข้าวหอมมะลิ พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ 1 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Pseudonocardia* มีการทดสอบการผลิต IAA การละลายฟอสเฟต และการผลิตไซเดอโรฟออร์ พบว่า *Streptomyces* ทุกไอโซเลทสามารถผลิต IAA ได้ในช่วง 0.74 – 11.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ *Pseudonocardia* ไม่มีการผลิต IAA ซึ่ง *Streptomyces thermocarboxyidus* S3 สามารถผลิต IAA ละลายฟอสเฟต และการผลิตไซเดอโรฟออร์ได้ดีที่สุด

5.4 ความสามารถของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าว และการส่งเสริมการเจริญของข้าว และผลต่อทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะเครียดเกลือ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* PXO71 ในระยะต้นกล้าของไอโซเลท RD12 และ RD28 พบว่าทั้งสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง โดยส่งผลให้ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในใบข้าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ($p < 0.05$) จากการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของทั้งสองไอโซเลทจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hata et al. (2021) พบว่า *Streptomyces shenzhenensis* สองสายพันธุ์คือ TKSC3 และ SS8 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าว และมีประสิทธิภาพในการควบคุมทางชีวภาพ โดยการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (Induced systemic resistance; ISR) ในควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ช่วยเพิ่มความงอกและความแข็งแรงของข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่มีการเคลือบเมล็ดข้าวด้วยเชื้อผสม TKSC3 และ SS8 ส่งผลให้มีการเพิ่มการงอกของเมล็ด ความยาวราก และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเท่ากับ 20, 23 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรรมวิธีแบบใช้เชื้อเดี่ยวและใช้เชื้อร่วมกันสามารถยับยั้งการก่อโรค Xoc ได้ดี โดยที่กรรมวิธีที่ใช้เชื้อร่วมกัน TKSC3 + SS8 สามารถควบคุมโรคได้สูงสุดที่ 81.02 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับรายงาน Ji et al. (2008) มีการใช้แบคทีเรีย

Lysobacter antibioticus คัดแยกได้จากดินรอบรากข้าวในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน สามารถยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ได้สูงสุดที่ 69.7 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะเครียดเกลือ พบว่าภายใต้สภาวะเครียดเกลือส่งผลให้การเจริญของข้าวลดลง ซึ่งไอโซเลทที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือได้มากที่สุดคือ RD12 รองลงมาคือ RD28 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Djebaili et al. (2021) พบว่าแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาาลีในสภาวะเครียด โดยมีการเพิ่มความยาวรากและลำต้น และน้ำหนักแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชนิษฐา สมตระกูล และคณะ (2563) ทำการศึกษา *Streptomyces* sp. SEF 11 มีความสามารถในการผลิต IAA ทั้งในรูปของสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียหรือน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ส่งผลต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าข้าวเหนียว ในสภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเค็มน้อยและปานกลาง พบว่าการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้การงอกของเมล็ด ความยาวยอดและความยาวรากของข้าวเหนียวเพิ่มขึ้น และจากรายงานของ Chinachanta et al. (2023) ศึกษาแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินรอบรากข้าวหอมมะลิ คือ *Sinomonas* sp. ORF15-23 มีความสามารถในการทนต่อเกลือและสามารถผลิต IAA ได้มากที่สุด พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวหอมมะลิที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 50 มิลลิโมลาร์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการเจริญของข้าวที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

การศึกษามลต่อทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะเครียดเกลือ ซึ่งประกอบไปด้วย ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ และโพรทีน และการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ พบว่าเมื่อได้รับสภาวะเครียดเกลือจะส่งผลให้มีการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่เครียดเกลือ จากรายงานของ ชีระรัตน์ อุบลรัตน์ (2561) ศึกษาสภาวะเครียดเกลือต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญ และสรีรวิทยาของต้นกล้าข้าว ระบุว่าภายใต้สภาวะเครียดเกลือส่งผลให้รงควัตถุในกระบวนการสังเคราะห์แสงมีปริมาณลดลง เนื่องจากการเกิดออกซิเดชันส่งผลให้เซลล์พืชมีการเกิดการเปลี่ยนแปลงในไซโตพลาสซึม โดยมีการเร่งเอนไซม์คลอโรฟิลเลส (chlorophyllase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ ได้เป็นหมู่ไพทอลและคลอโรฟิลไลด์ ส่งผลให้มีปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง อีกทั้งข้าวจัดเป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม เมื่อได้รับสภาวะเครียดเกลือ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลแสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีที่มีเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรีย มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดเกลือ ซึ่งในสภาวะเครียดเกลือไอโซเลท RD12 จะให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด รองลงมาคือไอโซเลท RD28 มีปริมาณของสารดังกล่าวได้ใกล้เคียงกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Djebaili et al. (2021) พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินชายฝั่งทะเลของภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศแอลจีเรีย เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีในสภาวะเครียดเกลือ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์และการสะสมของโพรลีนสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสอดคล้องกับรายงานของ Gupta et al. (2022) ศึกษาแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากข้าว คือ *Brevibacterium frigoritolerans* W19 และเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อข้าว คือ *Bacillus safensis* BTL5 พบว่ากรรมวิธีที่มีแบคทีเรียส่งผลให้มีความยาวราก และน้ำหนักแห้งราก และมีการกระตุ้นให้มีการผลิตคลอโรฟิลล์ โพรลีน ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนีย ไลเอส และคาตาเลสในข้าวภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย

ในส่วนของ การสะสมปริมาณโพรลีนในพืช เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการทนเค็มของพืช จากการทดลองพบว่าข้าวมีปริมาณของโพรลีนสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดเกลือ ซึ่งชุดการทดลองที่มีไอโซเลท RD28 กระตุ้นให้ข้าวมีการผลิตโพรลีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลท RD12 ซึ่งทั้งสองไอโซเลทมีปริมาณของโพรลีนมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Djebaili et al. (2021) ศึกษาแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีในสภาวะเครียดเกลือ พบว่าข้าวสาลีมีการสะสมของโพรลีนสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสอดคล้องกับรายงานของ Gonzalez et al. (2023) ใช้แอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces niveoruber* ATMLC132021 และ *Streptomyces lienomycini* ATMLC122021 ที่คัดแยกจากพืช *Metharme lanata* ในทะเลทรายอาตากามา สามารถส่งเสริมการเจริญของผักกาดหอมให้มีความทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือที่ความเข้มข้น 100 mM อีกทั้งยังพบว่าผักกาดหอมที่มีแอคติโนแบคทีเรียจะมีปริมาณของโพรลีน แคลโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และค่าเปิดปากใบ (stomatal conductance) ที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อ

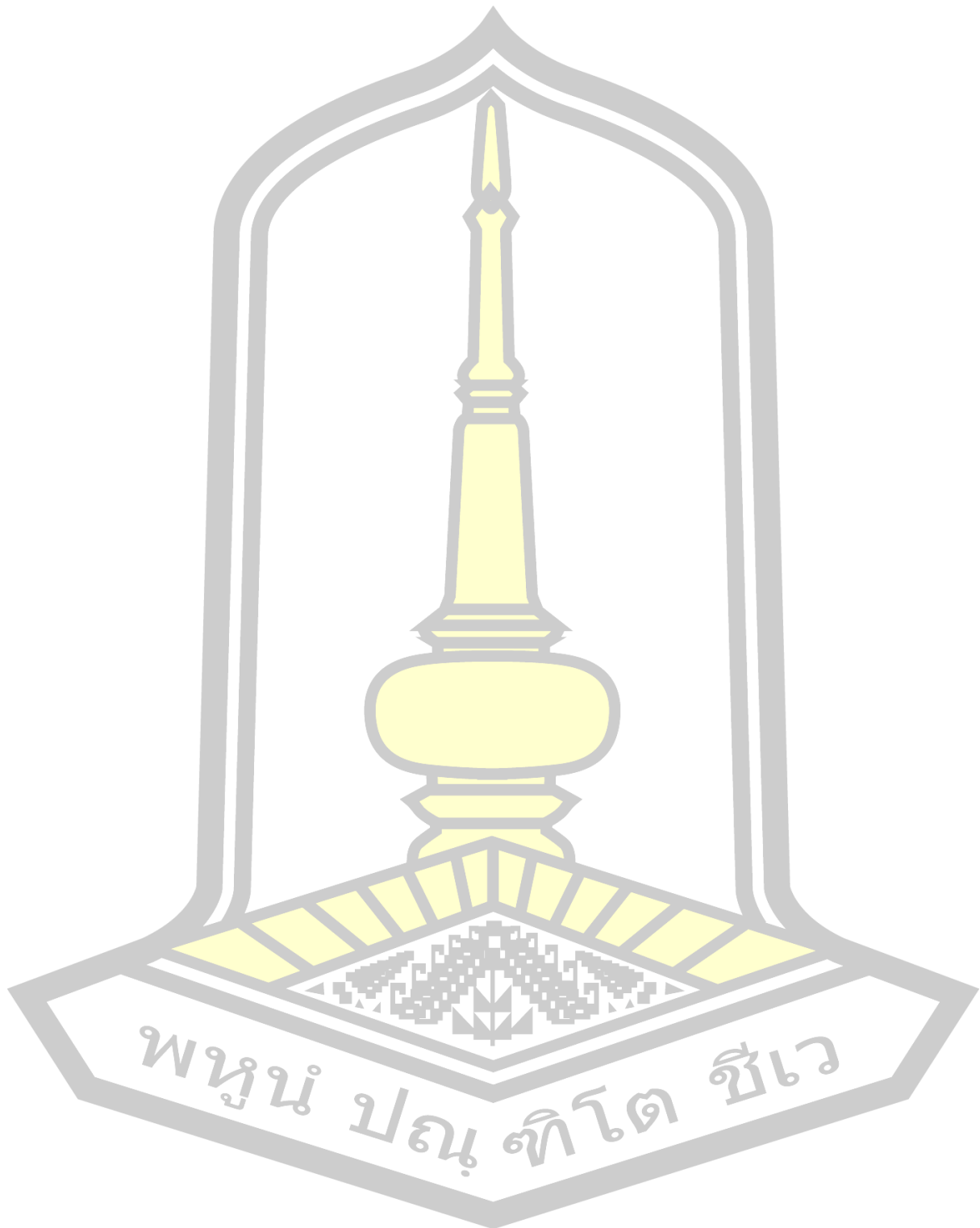
จากการทดสอบการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายใต้สภาวะเครียดเกลือในใบข้าว พบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อมีการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ที่สูงกว่ากรรมวิธีที่มีเชื้อแบคทีเรีย และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งปริมาณการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์แสดงถึงสภาพความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ในพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ พบว่าไอโซเลท RD12 มีส่วนช่วยในการลดระดับการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ในใบข้าวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ RD28 ส่งผลให้เกิดความเสียหายของข้าวภายใต้สภาวะเครียดเกลือลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ El-Esawi et al. (2019) ที่ใช้แบคทีเรีย *Azospirillum lipoferum* FK1 ในการส่งเสริมการเจริญให้กับถั่วลูกไก่ในสภาวะเครียดเกลือที่เข้มข้น 150 mM พบว่ากรรมวิธีที่มีแบคทีเรียมีการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมาลอนไดแอลดีไฮด์ ที่ต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม อีกทั้งยังพบว่ากรรมวิธีที่มีแบคทีเรียมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระและยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อความเค็ม

จึงสรุปได้ว่าเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท RD12 และ RD28 มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการของข้าวให้มีความทนต่อสภาวะเครียดเกลือ ทั้งนี้จากการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของทั้งสองไอโซเลท พบว่าไอโซเลท RD12 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces xylanilyticus* SR2-123^T เท่ากับ 99.3 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท RD28 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T เท่ากับ 99.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ *Streptomyces rochei* IDWR19 ที่คัดแยกจากดินรอบรากของข้าวสาลี พบว่ามีสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โปรตีเอส และเซลลูเลส อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลี สามารถกระตุ้นให้มีความยาวลำต้นเพิ่มขึ้น 12.2 เปอร์เซ็นต์ และมีการเพิ่มขึ้นของชีวมวล 1.8 เท่า (Jog et al., 2012)

โดยสรุป เนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิเป็นแหล่งของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารปฏิชีวนะในการต้านทานเชื้อก่อโรคข้าว และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชในหลอดทดลอง ในสภาวะเครียดเกลือ และแรงดันออสโมติก และจากการทดสอบเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ 2 สายพันธุ์ ในการส่งเสริมการเจริญให้กับข้าวในต้นพืช พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง และสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะเครียดเกลือ โดยเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ และมีการสะสมโพรลีนที่เพิ่มขึ้น แต่ช่วยลดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในพืช ซึ่งในอนาคตสามารถที่จะพัฒนาเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในรูปหัวเชื้อเพื่อเพิ่มผลผลิตในข้าวหอมมะลิในสภาวะเครียดเกลือ นำไปสู่การผลิตข้าวอย่างยั่งยืนได้ในอนาคต และจากงานวิจัยนี้พบว่า เนื้อเยื่อข้าวเป็นแหล่งของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียชนิดใหม่ ซึ่ง *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T คือ *Streptomyces mahasarakhamensis* sp. nov. และจากการศึกษายีนชีวสังเคราะห์ และการทำนายยีนของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชในสภาวะเครียดเกลือ และแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์ คือ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1 และ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29 อยู่ระหว่างการพิจารณาในการตีพิมพ์เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ของโลกในวารสารชั้นนำระดับนานาชาติ

พจนานุกรมพืชโต ชีวะ

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- ชนิษฐา สมตระกูล, สุदारัตน์ เทียงสันเทียะ, สุทธาสินี ไชยวงศา, อภิเดช แสงดี, และวราภรณ์ ฉวยฉาย. (2020). ผลของ *Streptomyces* sp. Strain SEF11 ต่อการงอกและการเติบโตของต้นกล้าของข้าวเหนียว พันธุ์ ก ข 6 และถั่วลิสง พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ภายใต้สภาวะละลายเกลือ. *วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร*, 37(2), 36-46.
- ธนากร แสงสง่า. (2557). พีจีพีอาร์: บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22(4), 553-570.
- ณภาพ แก้วกันทา และ เกวลิน คุณาศักดากุล. (2560). ศักยภาพการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกจากข้าวในการควบคุมโรคไหม้ของต้นกล้าข้าว. *วารสารเกษตร*, 33(2), 203 – 213.
- ดารา เจตนะจิต, นงรัตน์ นิลพานิชย์, พากเพียร อรัญนารถ, วิจิต ศิริสันธนะ, วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ลูติเกียรติพงศ์, วันชัย โรจนหัสติน, และธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. (2550). *โรคข้าวและการป้องกันกำจัด*. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าวเขตจตุจักร. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริจังหวัดสกลนคร. (2555). *การปลูกข้าว พันธุ์ กข ๑๐๕* (พิมพ์ครั้งที่ 2). สำนักคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงานกปร.).
- ธีระรัตน์ อุบลรัตน์. *ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเติบโต และสรีรวิทยา ของต้นกล้าข้าว (Oryza sativa L.)*. [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต]. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. <https://buiir.buu.ac.th/xmlui/handle/1234567890/7579>
- นิตาเหล็ก สูงเนิน. (2558). *โครงการการศึกษานิเวศวิทยาของพืชท้องถิ่นที่เติบโตในพื้นที่ดินเค็ม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย*. สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม.
- พัชรี สินธุนาวา และ ชุติมา แก้วกระจ่าง. (2562). การยับยั้งรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ข้าวด้วยราเอนโดไฟต์. *วารสารการเกษตรราชภัฏ*, 18(2), 12-20.
- บุญดิษฐ์ วรินทร์รักษ์ และยงยุทธ โอสถสภา. (2558). ประวัติการปลูกข้าวและข้าวกับสภาพแวดล้อม. ใน ยงยุทธ โอสถสภา (บ.ก.), *ดิน ธาตุอาหารและปุ๋ยข้าว* (น. 28-60). สมาคมดินและปุ๋ยแห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร.

- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และชนิดาภา นวะพิฒ. (2555). การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อแอกติโนมัยซีท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 14, 10-22.
- ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์ และอนันต์ อธิพรชัย. (2561). รายงานวิจัยการศึกษาทางเคมีและความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู (เอกสารทางวิชาการหมายเลข 138). ชลบุรี: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มนตรี ผลสินธุ์, ปิยากร ดาคุ่ม, มนัสชยา เนื่องจัญ, และ เพ็ญรดี จันทร์ภักษ์วัฒน์. (2565). ผลกระทบของการรुक้า่าน้ำเค็มต่อพื้นที่เกษตรกรรม. วารสารสิ่งแวดล้อม, 26(2), 1-9.
- สุจรรยา ฉายแสง. (2556). การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากข้าวและกระชาย สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านเซลล์มะเร็ง (วิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย). มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สุจิตกัลยา มฤคธรรณินแปลง. (2560). ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของวัชราชบูรณะจังหวัดพระนครศรีอยุธยา. วารสารวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, 16(2), 300-311
- วิญญา ดุงแก้ว. (2562). รายงานการวิจัยการศึกษาพฤติกรรมและการเคลื่อนที่ของเกลือในพื้นที่ดินเค็ม. โครงการการศึกษาศักยภาพการผลิตพืชเศรษฐกิจในพื้นที่ดินเค็มน้อยถึงปานกลาง (เขต N zone) เพื่อการจัดการปัญหาดินเค็มอย่างยั่งยืน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- อรอุมา แก้วกล้า. (2563). เอกสารประกอบการสอนวิชาแอกติโนมัยซีท [เอกสารที่ไม่ได้ตีพิมพ์]. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- อภาพร โพธิยอด. (2557). การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรครากเน่าไฟทอปธอราในสตรอเบอร์รี่ (CMU122008) [วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่]. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Hashem, A., Radhakrishnan, R., Al-Huqail, A. A., & Al-Otibi, F. A. (2017). Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, 3, 37-44.

- Akbari, A., Gharanjik, S., Koobaz, P., & Heliyon, A. S. (2020). Plant growth promoting *Streptomyces* strains are selectively interacting with the wheat cultivars especially in saline conditions. *Heliyon*, 6, 03445.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160–167.
- Anbumalarmathi, J., & Mehta, P. (2013). Effect of salt stress on germination of indica rice varieties. *European Journal of Biological Sciences*, 6, 1-6.
- Ansari, F. A., Ahmad, I., & Pichtel, J. (2019). Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10. *Applied Soil Ecology*, 3, 45–54.
- Arora, N.K., Fatima, T., Mishra, J, Mishra, I., Verma, S., Verma, R., Verma, M., Bhattacharya, A., Verma, P., Mishra, P.& Bharti, P. (2020). Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*, 26, 69–82.
- Atouei, M. T., Pourbabae, A. A., and Shorafa, M. (2019). Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria. *Iranian Journal of Science and Technology. Transaction A, Science*, 43, 2725-2733.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., and Dobereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen nov, sp nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 4, 86-93.
- Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., & Adhya, T. K. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil*, 366, 93–105.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1-43.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207.

- Bellotti, D., & Remelli, M. (2021). Deferoxamine B: a natural, excellent and versatile metal chelator. *Molecules*, *26*(11), 3255.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, *58*, 1-26.
- Berger, L. R., & Reynold, D. M. (1958). The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochimica et biophysica acta*, *29*(3), 522-534.
- Brunner, F. & Petrini, O. (1992). Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycological Research*, *96*, 723-723.
- Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 497-503.
- Boukaew, S., Chuenchit, S., & Petcharat, V. (2011). Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *Biocontrol Science and Technology*, *56*(1), 365- 374.
- Boukhatem, Z. F., Merabet, C., & Tsaki, H. (2022). Plant growth promoting actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants?. *Frontiers in Agronomy*, *4*, 849911.
- Bacon, C. W. & White, J. F. (2000). *Microbial Endophyte*. Marcel Dekker New York.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, *51*(1), 46-50.
- Cao, D. T., Nguyen, T. L., Tran, V. H., Doan-Thi-Mai, H., Vu-Thi, Q., Nguyen, M. A., Le-Thi, H. M., Chau, V. M., & Pham, V. C. (2019). Synthesis, structure and antimicrobial activity of novel metabolites from a marine actinomycete in Vietnam's East Sea. *Natural Product Communications*, *14*(1), 1934578X1901400132.

- Castillo, U., Harper, J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J. B., Porter, H., Robison, R., Millar, D., Hess, W. M., Condrón, M. & Teplow, D. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*, *224*, 183-190.
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology*, *110*, 1151-65.
- Centore, P. (2016) *Centroids for the ISCC-NBS colour system 2 colour specification*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53470874>
- Chinachanta, K., Shutsrirung, A., Santasup, C., Pathom-Aree, W., Luu, D. T., Herrmann, L., Lesueur, D., & Prom-U-Thai, C. (2023). Rhizoactinobacteria enhance growth and antioxidant activity in Thai Jasmine rice (*Oryza sativa*) KDML105 seedlings under salt stress. *Plants*, *12*(19), 3441.
- Chance, B., & Maehly A. C. (1955). Assay catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. *Academic Press*, *2*, 764-775.
- Cihak, M., Kamenik, Z., Smidova, K., Bergman, N., Benada, O., Kofronova, O., Petrickova, K., & Bobek, J. (2017). Secondary metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2495.
- Clendennen, S. K., & Boaz, N. W. (2019). Betaine amphoteric surfactants—Synthesis, properties, and applications. In *Biobased surfactants* (pp. 447-469). AOCS Press.
- Clermont-Dauphin, C., Suwannang, N., Grünberger, O., Hammecker, C., & Maeght, J. L. (2010). Yield of rice under water and soil salinity risks in farmers' fields in northeast Thailand. *Field Crops Research*, *118*(3), 289-296.
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 5603-5608.

- Conn, V. M., Walker, A. R., & Franco, C. M. M. (2008). Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*, 208-218.
- Demain, A.L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*, *62*, 5-16.
- Dhakal, D., Lim, S. K., Kim, D. H., Kim, B. G., & Yamaguchi, T. (2018). Complete genome sequence of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952, the producer of anticancer anthracyclines and diverse secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*, *267*(1), 50–54.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Rossi, M., Forni, C., Smati, M., Del Gallo, M., & Kitouni, M. (2021). Characterization of plant growth-promoting traits and inoculation effects on *Triticum durum* of actinomycetes isolates under salt stress conditions. *Soil systems*, *5*(2), 26.
- Drutz, H., Keller-Schierlein, W., & Zähler, H. (1975). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. *Archives of Microbiology*, *106*(3), 175-190.
- Duan, J. L., Li, X. J., Gao, J. M., Wang, D. S., Yan, Y., & Xue, Q. H. (2013). Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities, *Annals of Microbiology*, *63*, 1501–1512.
- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., & Ghasemi, Y. (2011). l-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian journal of microbiology*, *51*, 307-311.
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., and Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, *10*, 1–9.
- Egamberdieva, D. (2011). Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions. *Plant, Soil and Environment*, *57*, 122–127.

- Egamberdieva, D., Wirth, S., Shurigin, V., Hashem, A., & AbdAllah, E. F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, *28*,1887.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2791.
- El-Esawi, M. A., Al-Ghamdi, A. A., Ali, H. M., & Alayafi, A. A. (2019). *Azospirillum lipoferum* FK1 confers improved salt tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by modulating osmolytes, antioxidant machinery and stress related genes expression. *Environmental and Experimental Botany*, *159*, 55–65.
- Filippi, M. C. C., Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Cortes, M. C. C.B., Moraes, A. J. G. & Prabhu, A. S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological pest control*, *58*, 160-166.
- Gangwar, M., Rani, S., & Sharma, N. (2012). Diversity of Endophytic Actinomycetes from Wheat and its Potential as Plant Growth Promoting and Biocontrol Agents Department of Microbiology, *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, India*, *3*, 13–19.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plantgrowth promoting rhizobacteria and selected mutants. *The Canadian Journal of Microbiology*, *47*, 404–411.
- Gleissner, C. M. L., Pyka, C. L., Heydenreuter, W., Gronauer, T. F., Atzberger, C., Korotkov, V. S., Cheng, W., Hacker, S. M., Vollmar A. M., Braig, S., & Sieber, S. A. (2019). Neocarzilin A is a potent inhibitor of cancer cell motility targeting VAT-1 controlled pathways. *ACS Central Science*, *5*(7), 1170-1178.
- Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *26*, 227–242.

- Gonzalez, F., Santander, C., Ruiz, A., Pérez, R., Moreira, J., Vidal, G., Aroca, R., Santos, C., & Cornejo, P. (2023). inoculation with Actinobacteria spp. isolated from a hyper-arid environment enhances tolerance to salinity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Plants*, *12*(10), 2018.
- Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1985). *In Chemical Methods in Bacterial Systematics* (2nd ed.). London: Academic Press.
- Goodfellow, M., Sutcliffe, I., & Chun, J. (2014). *New approaches to prokaryotic systematics*. Academic Press.
- Gupta, A., Tiwari, R. K., Shukla, R., Singh, A. N., & Sahu, P. K. (2023). Salinity alleviator bacteria in rice (*Oryza sativa* L.), their colonization efficacy, and synergism with melatonin. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1060287.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, *65*, 501-509.
- Hayakawa, M., Kenya, I., & Hideo, N. (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *Journal of Fermentation Technology*, *66*(4), 367-373.
- Hastuti, R. D., Lestari, Y., Suwanto, A., & SARASWATI, R. (2012). Endophytic *Streptomyces* spp. as biocontrol agents of rice bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), *HAYATI Journal of Biosciences*, *19*(4), 155-162.
- Hata, E. M., Yusof, M. T., & Zulperi, D. (2021). Induction of systemic resistance against bacterial leaf streak disease and growth promotion in rice plant by *Streptomyces shenzhenesis* TKSC3 and *Streptomyces* sp. SS8. *The plant pathology journal*, *37*(2), 173.
- Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. & Thamchaipenet, A. (2010). *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from root of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*, 1141-1146.

- Inderiati, S., & Franco, C. M. (2008). Isolation and identification of endophytic actinomycetes and their antifungal activity. *Tropical Biotechnology*, 1, 1-6.
- Jantaravikorn, Y., & Ongsomwang, S. (2022). Soil Salinity Prediction and Its Severity Mapping Using a Suitable Interpolation Method on Data Collected by Electromagnetic Induction Method. *Applied Sciences*, 12(20), 10550.
- Jauri, P. V., Beracochea, M., Fernández, B., & Battistoni, F. (2021). Whole-genome sequencing of *streptomyces* sp. strain uyfa156, a cultivar-specific plant growth-promoting endophyte of *Festuca arundinacea*. *Microbiology Resource Announcement*. 8(38), 1-2.
- Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2013). Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline condition. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73, 213–219.
- Ji, G. H., Wei, L. F., He, Y. Q., Wu, Y. P., & Bai, X. H. (2008). Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biological control*, 45(3), 288-296.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H. L., Zheng, C.J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L.P. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review, *Frontiers in Microbiology*, 7, 906.
- Jizba, J., Sedmera, P., Zima, J., Beran, M., Blumauerová, M., Kandybin, N. V., & Samoukina, G. V. (1991). Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. *Folia microbiologica*, 36, 437-443.
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2012). Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1154-1164.
- Kaewkla O. & Franco C. M. M. (2013). Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from australian native trees. *Microecosystem*, 65, 384-393.
- Kampapongsa, D., & Kaewkla, O. (2016). Biodiversity of endophytic actinobacteria from jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) grown in Roi-Et Province, Thailand and their antimicrobial activity against rice pathogens. *Annals of microbiology*, 66, 587-595.

- Karadeniz, A., Topcuoglu, S. F., & Inan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*, 1061–1064.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547-1549.
- Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Hofle, G., & Reichenbach, H. (1989). Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (*Myxobacterales*) production, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics*, *42*(1), 14-17.
- Kushwaha, B., Jadhav, I., Verma, H. N., Geethadevi, A., Parashar, D., and Jadhav, K. (2019). Betaine accumulation suppresses the de-novo synthesis of ectoine at a low osmotic concentration in *Halomonas* sp. SBS 10, a bacterium with broad salinity tolerance. *Molecular Biology Reports*, *46*, 4779–4786.
- Khan, N., & Bano, A. (2019). Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. *PLOS One* *14*:e0222302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222302>
- Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiology Letters*, *319*(10), 1-10.
- Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R., & Willey, J. M. (2004). The *SapB* morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(31), 11448-11453.
- Lasudee, K., Tokuyama, S., Lumyong, S., & Pathom-Aree, W. (2018). Actinobacteria associated with arbuscular mycorrhizal *Funneliformis mosseae* spores, taxonomic characterization and their beneficial traits to plants: Evidence obtained from mung bean (*Vigna radiata*) and Thai jasmine rice (*Oryza sativa*). *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1247.

- Luo, A., & Fan, Y. (2011). Antioxidant activities of berberine hydrochloride. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3702-3707.
- Lechevalier, R. Acker, F., Corke, C. T., Haenseler, C. M., & Waksman, S. A. (1953). Candididin, a new antifungal antibiotic. *Mycologia*, 45, 155-171.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). *A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes*. (4th ed. Vol.20). New Jersey: International Journal of Systematic Bacteriology.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology*. Academic Press, 148, 350-382.
- Lopak, S. S., Meryandini, A., & Sunarti, T. C. (2020). Dietary fibre production from cassava pulp fibre using *Actinomycetes* cellulase. *International Food Research Journal*, 27(4), 702-711.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kampf, P., & Whitman, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York: Springer.
- Martinez- Klimova, E. , Rodríguez- Peña, K. & Sanchez, S. (2017). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 134, 1-17.
- Meena, K. K., Utkarsh, M. B., Ajay, M. S., Dhananjaya, P. S., Vijai, K. G., Wakchaure, G. C., & Satish, K. (2020). Mitigation of Salinity Stress in Wheat Seedlings Due to the Application of Phytohormone-Rich Culture Filtrate Extract of Methylophilic Actinobacterium *Nocardioides* sp. NIMMe6. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2091.
- Meier-Kolthoff, J., & Goker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10, 2182.
- Mingma, R., Duangmal, K., Trakulnaleamsai, S., & Thamchaipenet, A. (2013). *Diversity of Endophytic Actinomycetes from Rice Plants (Oryza Sativa L.) and their Antimicrobial Activities Against Rice Fungal Pathogens*.
[https://file:///C:/Users/acer/Downloads/TNAR02026c%20\(4\).pdf](https://file:///C:/Users/acer/Downloads/TNAR02026c%20(4).pdf)

- Mingma, R., Duangmal, K., & Mai Sci, C. J. (2018). Characterization, antifungal activity and plant growth promoting potential of endophytic actinomycetes isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Chiang Mai Journal of Science*, 45(7), 2652-2665.
- Misra, S., Dixit, V. K., Khan, M. H., Kumar Mishra, S., Dviwedi, G., Yadav, S., Lehri, A., Chauhan, P. S.(2017). Exploitation of agro-climatic environment for selection of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing salt tolerant indigenous plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 205, 25–34.
- Mousa, W. K. & Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti- microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective, *Frontiers in Microbiology*, 4, 65.
- Moody, S. C., Zhao, B., Lei, L., Nelson, D. R., Mullins, J. G., Waterman, M. R., Kelly, S. L., & Lamb, D. C. (2012). Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in *streptomyces*. *The FEBS Journal*, 279(9), 1640-1649.
- Muller, H. (1981). Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. *Archives of Microbiology*, 130, 195-197.
- Muller, H. R., Furtur, H. Z., & RAST,D. M. (1981). Effect of ikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. *Archives of Microbiology*, 130(1), 195-197.
- Naik, B. S., J Shashikala, J., & Krishnamurthy, Y. L. (2009). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza Sativa* L.) and their Antagonistic Activities in Vitro. *Microbiological Research*, 164, 290-296.
- Nakbanpote, W., Panitlurtumpai, N., Sangdee, A., Sakulpone, N., Sirisom, P., & Pimthong, A. (2014). Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 9, 379–387.
- Narawan Punngam. (2011). Actinomycetes from rice field soil and their activities to inhibit rice fungal pathogens. *Kasetsart University, Bangkok*, 234-241.

- Nascimento, F. X., Brígido, C., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2016). The role of rhizobial ACC deaminase in the nodulation process of leguminous plants. *International Journal of Agronomy*, 2016(1), 1369472.
- Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., & Sopory, S. K. (2013). Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 1–9.
- Naz, I., Bano, A., & Ul-Hassan, T. (2009). Isolation of phytohormones producing plant growth promoting rhizobacteria from weeds growing in Khewra salt range, Pakistan and their implication in providing salt tolerance to *Glycine max* L.. *African Journal of Biotechnology*, 8, 5762–5766.
- Nozari, R. M., Ortolan F., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2021). *Streptomyces* spp. enhance vegetative growth of maize plants under saline stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1371–1383.
- Orozco-Mosqueda, M. C., Glick, B. R. & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126429.
- Park, I. S., Kang, S. W., Shin, Y. J., Chae, K. Y., Park, M. O., Kim, M. Y., Wheatley, D. N., & Min, B. H. (2003). Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British journal of cancer*, 89(5), 907-914.
- Patel, D., & Saraf, M. (2013). Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of (*Jatropha curcas* L.) under saline condition. *European Journal of Soil Biology*, 55, 47–54.
- Patel, T., & Saraf, M. (2017). Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions*, 12, 480–487.
- Penrose, D.M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10–15.

- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A 1 and A 3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, *64*, 207–210.
- Porrás-Alfaro, A. and Bayman, P., 2011, Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 291-315.
- Qin, S., Feng, W. W., Zhang, Y. J., Wang, T. T., Xiong, Y. W., & Xing, K. (2018). Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*, 1533-18.
- Rahman, A., Sitepu I. R., Tang S.Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski's Reagent Test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 2202–2208.
- Reshetnikov, A. S., Khmelenina, V. N., Mustakhimov, I. I., & Trotsenko, Y. A. (2011). Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. *Methods in enzymology*, *495*, 15-30.
- Rhoades, J. D., Chanduvi, F., & Lesch, S. M. (1999). *Soil salinity assessment: Methods and interpretation of electrical conductivity measurements* (No. 57). <https://www.fao.org/4/x2002e/x2002e.pdf>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glockner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web-server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, *32*(6), 929-931.
- Rima, F. S., Biswas, S., Sarker, P. K., Islam, M. R., & Seraj, Z. I. (2018). Bacteria endemic to saline coastal belt and their ability to mitigate the effects of salt stress on rice growth and yields. *Annals of Microbiology*, *68*, 525–535.

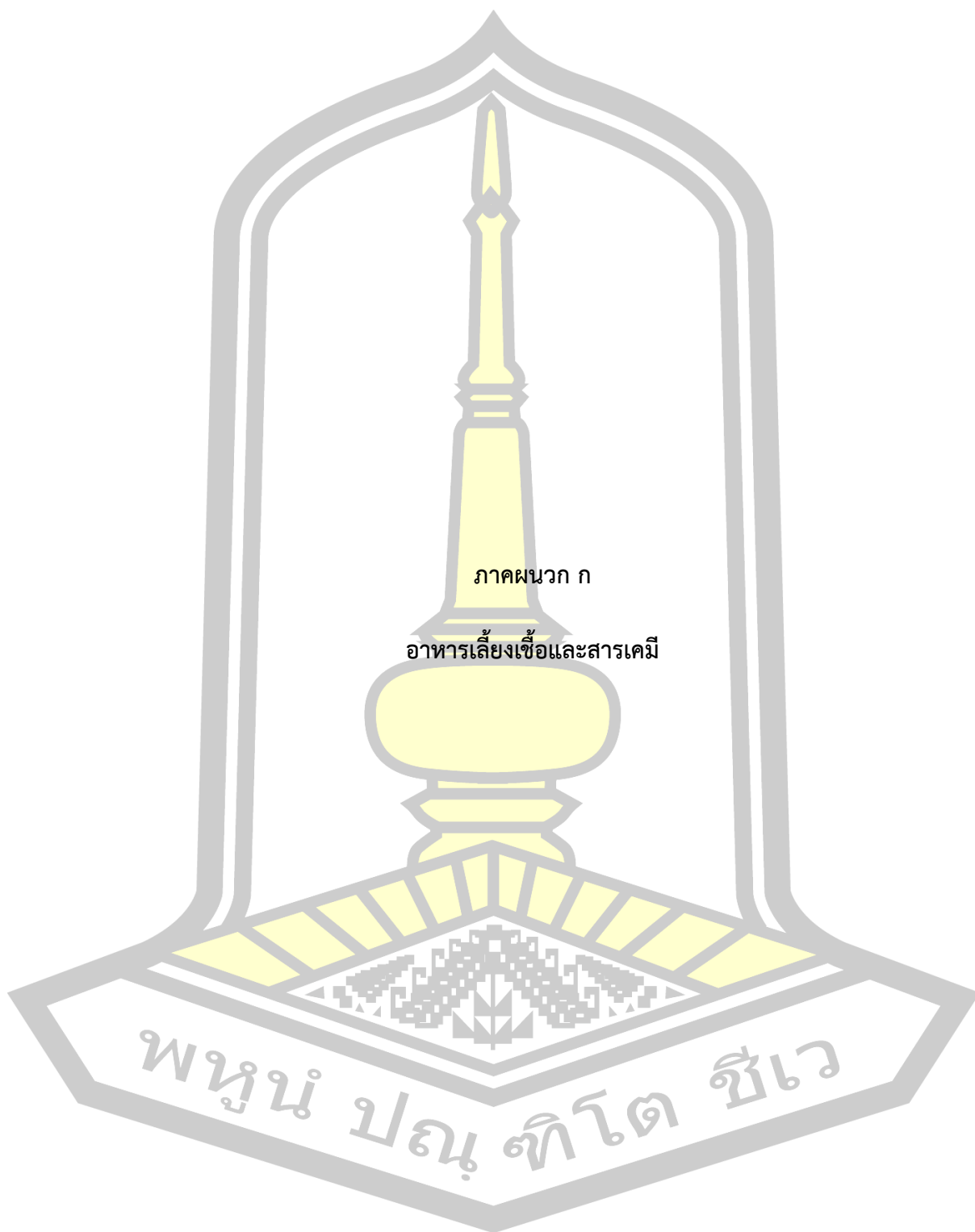
- Rao, P., Shukla, A., Parmar, P., Rawal, R. M., Patel, B. V., Saraf, M., & Goswami, D. (2022). Proposing a fungal metabolite-flaviolin as a potential inhibitor of 3CLpro of novel coronavirus SARS-CoV-2 identified using docking and molecular dynamics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(1), 348-360.
- Rodríguez-Salazar, J., Suárez, R., Caballero-Mellado, J., & Iturriaga, G. (2009). Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters*, 296, 52–59.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1503–1509.
- Sandhya, V. S. K. Z., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation*, 62, 21–30.
- Sarkar, A., Ghosh, P. K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M. H., & Maiti, T. K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Microbiological Research*, 169, 20–32.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Biotechnology*, 7, 102. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0736-3>
- Sato, K. (1983). Biological properties of kasugamycin. *In Natural Products*, 293-299.
- Schutze, E., Ahmed, E., Voit, A., Klose, M., Greyer, M., Svatos, A., Merten, D., Roth, M., Holmstrom, S. J. M., & Kothe, E. (2014). Siderophore production by *Streptomyces* stability and alteration of ferrihydroxamates in heavy metal-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19376–19383.

- Sen, S., & Chandrasekhar, C. N. (2015). Effect of PGPR on enzymatic activities of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5, 44–48.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Shukla, P. S., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of (*Arachis hypogaea* L.) by the interaction of halotolerant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 195–206.
- Silva, G. D. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. D. F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2, 833181.
- Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS ONE*, 11(6), e0155026.
- Singh, R., & Dubey, A. K. (2018). Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1767.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., & Goebel, B. M. (1993). Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7, 232-236.
- Subramaniam, G., Thakur, V., Saxena, R., Vadlamud, S., Purohit, S., Kumar, V., Rathore, A., Chitikineni, A., & Varshney, R. K. (2020). Complete genome sequence of sixteen plant growth promoting *Streptomyces* strains. *Nature research*, 10(1), 10294.
- Sultana, S., Paul, S. C., & Karim, M. M. (2018). Salinity intrusion and coastal agriculture: adaptation strategies using salt-tolerant plant-growth promoting rhizobacteria for sustainable food security. *Registration Problem*, 21, 58–61.
- Sun, K., Liu, J., Gao, Y., Jin, L., Gu, Y., & Wang, W. (2014). Isolation plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. *Scientific Reports*, 4, 5462.

- Szymanska, S., Plociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., Zloch, M., Ruppel, S., & Hryniewicz, K. (2016). Metabolic potential and community structure of endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L.. *Microbiological Research*, *182*, 68–79.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022-3027.
- Taechowisan, T., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*, 381-385.
- The UniProt Consortium. (2023) UniProt the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*, 523-531.
- Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H. M., Zeng, Q. G., Jia, Y.Y., Han, W.Q. & Zhou, S.N. (2004). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*, 303-309.
- Ulloa-Ogaz, A. L., Muñoz-Castellanos, L. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. *technological advances and educational programs*, *1*, 305-309.
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016). PGPR-mediated expression of salt tolerance gene in soybean through volatiles under sodium nitroprusside. *Journal of Basic Microbiology*, *56*, 1274–1288.
- Van Hop, D., Hoa, P. T. P., Quang, N. D., Ton, P. H., Ha, T. H., Van Hung, N., Van, N. T., Hai, T. V., Quy, N. T. K., Dao, N. T. A., & Thom, V. T. (2014). Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, isolated from soil and leaf-litter samples in Vietnam. *Biocontrol Science*, *19*(3), 103-111.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, *60* (2), 407-438.

- Vardharajula, S., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Bandi, V. (2011). Drought tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, *6*, 1–14.
- Vimal, S. R., Patel, V. K. & Singh, J. S. (2019). Plant growth promoting *Curtobacterium albidum* strain SRV4: An agriculturally important microbe to alleviate salinity stress in paddy plants. *Ecological Indicators*, *105*, 553-562.
- Waggoner, B. M. (1994). A fossil actinomycete in Eocene-Oligocene Dominican amber. *Journal of Paleontology*, *68*, 398-401.
- Wang, X. J., Wang, J., Wang, J. D., Zhang, J., Xu, M. D., & Xiang, W.S. (2011). Two new doramectin analogs from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069: fermentation, isolation and structure elucidation. *The Journal of Antibiotics*, *64*, 591–594.
- Wang, L., Zhang, C., Zhang, J., Rao, Z., Xu, X., Mao, Z., & Chen, X. (2021). Epsilon-poly-L-lysine: recent advances in biomanufacturing and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 748976.
- Wei, Y. Z., Zhang, Y. Q., Zhao, L. L., Li, Q. P., Su, J., & Liu, H. Y. (2010). Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at Shankou of Guangxi Province. *Microbiology China*. *37*, 823–828.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, *13*(6), e1005595.
- Wilantho, A., Praditsup, O., Charoenchim, W., Kulawonganchai, S., Assawamakin, A., & Tongsimma, S. (2012). Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. *Genomics and Genetics*, *5*(2), 104-129.
- Williams, S.T. (1989). Genus *Streptomyces* waksman and henrici 1943. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, *4*, 2452-2492.
- Wu, C., Van Wezel, G. P., & Hae Choi, Y. (2015). Identification of novel endophenase antibiotics produced by *Kitasatospora* sp. MBT66. *The Journal of Antibiotics*, *68*(7), 445-452.

- Wu, W., Zhang, Q., Ervin, E. H., Yang, Z., & Zhang, X. (2017). Physiological mechanism of enhancing salt stress tolerance of perennial ryegrass by 24-epibrassinolide. *Frontiers in plant science*, *8*, 1017.
- Yasmin, S., Hafeez, F. Y., Mirza, M. S., Rasul, M., Arshad, H. M., Zubair, M., & Iqbal, M. (2017). Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1895.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(5), 1613-1617.
- YU, Z., Han. C., Yu. B., Zhao. J., Yan. Y., & Huang. S. (2020). Taxonomic characterization, and secondary metabolite analysis of *Streptomyces triticiradicis* sp.nov.: a novel actinomycete with antifungal activity. *microorganisms*, *8*, 77.
- Zabolotneva, A. A., Shatova, O. P., Sadova, A. A., Shestopalov, A. V., & Roumiantsev, S. A. (2022). An overview of alkylresorcinols biological properties and effects. *Journal of nutrition and metabolism*, *12*, 4667607.
- Zarandi, M. E., Bonjar, G. S., Dehkaei, F. P., Moosavi, S. A., Farokhi, P. R., & Aghighi, S. (2009). Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *American Journal of Applied Sciences*, *6*(1), 194-199.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16SrRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*, 589-608.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

พูน พูน ทิโต ชีเว

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ISP 2 (Yeast extract-malt extract agar)

| | | |
|---------------|------|-----------|
| Malt extract | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 4 | กรัม |
| Agar | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |
| พีเอช 7.3 | | |

1.2 ISP 3 (Oatmeal agar)

| | | |
|-----------------------|------|-----------|
| Oatmeal | 20 | กรัม |
| Trace salts solution* | 1 | มิลลิลิตร |
| Agar | 18 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |
| พีเอช 7.4 | | |

*Trace salts solution

| | | |
|--------------------------------------|-----|-----------|
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

เติมข้าวโอ๊ต 20 กรัม ต้มในน้ำประมาณ 700 มิลลิลิตร จับเวลาหลังน้ำเดือด 20 นาที กรองเอาแต่น้ำ โดยใช้ผ้าขาว บางและเติมวุ้นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับพีเอช และปรับปริมาตร ให้ได้ 7.4 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อ

พหุบัน ปณ ทิโต ชีเว

1.3 ISP 4 (Inorganic salts starch agar)

| | | |
|---|----|-----------|
| Agar | 18 | กรัม |
| Soluble starch | 10 | กรัม |
| CaCO ₃ | 2 | กรัม |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2 | กรัม |
| K ₂ HPO ₄ | 1 | กรัม |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 | กรัม |
| NaCl | 1 | กรัม |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 1 | มิลลิกรัม |
| MnCl ₂ ·7H ₂ O | 1 | มิลลิกรัม |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1 | มิลลิกรัม |

1.4 ISP 5 (Glycerol Asparagine agar)

| | | |
|--|-----|-----------|
| Agar | 20 | กรัม |
| Glycerol | 10 | กรัม |
| L-asparagine | 1 | กรัม |
| K ₂ HPO ₄ | 1 | กรัม |
| Trace salt solution† | 1 | มิลลิลิตร |
| พีเอช 7.4 | | |
| Trace salts solution (filter sterilised) | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

1.5 ISP 7 (Tyrosin Agar)

| | | |
|-------------------------------|------|-----------|
| Glycerol | 15 | กรัม |
| L-tyrosine | 0.5 | กรัม |
| L-Asparagine | 1.0 | กรัม |
| K_2HPO_4 | 0.5 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| Trace elements solution HO-LE | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Agar | 20 | กรัม |

พีเอช 7.3

*Trace elements solution HO-LE(filter sterilised)

| | | |
|-------------------------|-------|-----------|
| H_3BO_3 | 2.85 | กรัม |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 1.8 | กรัม |
| Sodium tartrate | 1.77 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.36 | กรัม |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.04 | กรัม |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.027 | กรัม |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.025 | กรัม |
| ZnCl | 0.020 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

1.6 Bennett's medium

| | | |
|-----------------------------|------|-----------|
| Agar | 15 | กรัม |
| Glucose | 10 | กรัม |
| Pancreatic digest of casein | 2 | กรัม |
| Yeast extract | 1 | กรัม |
| Beef extract | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |
| พีเอช 7.4 | | |

1.7 Half strength Potato Dextrose agar

| | | |
|----------------|------|-----------|
| Potato | 100 | กรัม |
| Sugar dextrose | 10 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |
| พีเอช 7.4 | | |

1.8 Basal media

| | | |
|---|------|-----------|
| MgSO ₄ | 0.2 | กรัม |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.0 | กรัม |
| NaCl | 0.1 | กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 1.76 | กรัม |
| CaCl ₂ | 0.1 | กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ | 2.88 | กรัม |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.02 | กรัม |
| Agar | 18 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ทำการปรับพีเอชเท่ากับ 7.4 ก่อน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของ สารดังกล่าวแต่ละชนิดลงในอาหาร ผสมให้เข้ากันและพาสเจอร์ (ทำใน fume hood เท่านั้นเนื่องจากสารเหล่านี้อันตรายมาก) ชีดเชื้อลงบน จานอาหารโดยชีดเป็นเส้นตรง 3 ชีดต่อจานและทำเชื้อละ 2 ขี้บ่มใน fume hood 14 วัน และ ตรวจสอบการเจริญ และทำงานควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกใดๆ เพื่อเปรียบเทียบการ เจริญ

1.9 Nutrient agar

| | | |
|-------------------------|-----|------|
| Peptone | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 5 | กรัม |
| HM peptone Beef extract | 1.5 | กรัม |
| Yeast extract | 1.5 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับพีเอช ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 -7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

1.10 Tryptic Soybean Broth (TSB)

| | | |
|--------------------------------|-----|------|
| Pancreatic digest of casein | 17 | กรัม |
| Papaic digest of soyabean meal | 3 | กรัม |
| Sodium chloride | 5 | กรัม |
| Dextrose | 2.5 | กรัม |
| Dibasic potassium phosphate | 2.5 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับพีเอช ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 -7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

พหุ ประถมศึกษา

1.11 Starch agar

| | | |
|----------------|----|------|
| Soluble starch | 2 | กรัม |
| Extract | 5 | กรัม |
| Peptone | 5 | กรัม |
| Beef extract | 5 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ของอาหารให้เป็น 7.4 ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

1.12 esculin broth

ทดสอบการย่อย esculin ตามวิธีของ Kurup and Schmitt (1973)

| | | |
|----------|------|-----------|
| Esculin | 1 | กรัม |
| Peptone | 10 | กรัม |
| NaCl | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ปลูกเชื้อ 1 ลูบ แล้วบ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 14-28 วัน จากนั้นปิเปตส่วนใส และหยด 1% ferric citrate อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ คือมี fluorescence แสดงว่ามีการย่อย esculin

1.13 hippurate broth

ทดสอบการย่อย hippurate ตามวิธีของ Gordon et al. (1974) เตรียมอาหารhippurate

| | | | |
|-------|------------------------------------|------|-----------|
| broth | Tryptone | 10 | กรัม |
| | Beef extract | 3 | กรัม |
| | Yeast extract | 1 | กรัม |
| | Glucose | 1 | กรัม |
| | Na ₂ HPO ₄ 5 | 5 | กรัม |
| | น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

Sodium hippurate 10 กรัมต่อลิตร แล้วบ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 14-28 วัน จากนั้นใช้ส่วนใสทดสอบการเกิด benzoic acid โดยการผสม 1 ml ของส่วนน้ำใสด้วย 1.5 มิลลิลิตรของ 50% H₂SO₄ หลังจากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลบวก คือ มีตะกอนผลึก (crystals) สีขาวเกิดขึ้น

1.14 Urea broth

การย่อยยูเรียทำตามวิธีของ Gordon et al. (1974)

| | | |
|---------------------------|------|-----------|
| KH_2PO_4 | 10 | กรัม |
| Na_2HPO_4 | 9.5 | กรัม |
| yeast extract | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

สารละลาย phenol red ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 ลิตร และปรับพีเอชเท่ากับ 7.4 เตรียมสารละลายยูเรีย 15 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (กรองโดยการทำให้ filter sterile) เติมลงไปในการอาหาร urease broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันและปิเปตลงในหลอดทดลองเปล่าฝาเกลียวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 2.5 มิลลิลิตรแล้วใส่เชื้อ 1 ลูบ ปิดเชื้อไอโซเลทละ 2 ข้ำ เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าเป็นเวลา 14 วัน ผลบวกคืออาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู

1.15 basal inorganic nitrogen

| | | |
|---|------|-----------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 1 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | กรัม |
| Agar | 8 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 ก่อนที่จะเติม 0.04 เปอร์เซ็นต์ ของ bromcresol purple 15 มิลลิลิตร (ต่ออาหาร 1 ลิตร) หลังจากนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ให้ใส่ 0.5 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลที่ทำกรฆ่าเชื้อด้วยการ filter sterile (ยกเว้น cellulose) ให้นึ่งฆ่าเชื้อรวมกับอาหาร และนึ่งฆ่าเชื้อหลอดทดลองเปล่าฝาเกลียวแยกต่างหาก และกรอกอาหารที่ปลอดเชื้อลงในหลอดฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วเอียงหลอดทดลองในรูปวงเอียง ปิดเชื้อไอโซเลทละ 2 ข้ำ บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ถ้าเกิดกรดอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

1.16 Skim miik

ทำการทดลองตามวิธีของ Gordon et al. (1974) โดยใช้ skim milk medium

| | | |
|-----------|---|----------------------|
| Skim milk | 5 | กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร |
| Agar | 1 | กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อแยกขวด จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 ขวดผสมให้เข้ากัน และเทลงบนจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ ปิดเชื้อจำนวน 1 ลูบ โดยขีดซิกแซกบนจานอาหาร ปิดเชื้อไอโซเลทละ 2 ข้ำ บ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ 7-14 วัน เชื้อที่สร้างเอนไซม์จะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลน

1.17 N-free medium (Ranganayaki & Mohan., 1981)

| | | |
|---|--------|------|
| Glucose | 10 | กรัม |
| KH_2PO_4 | 0.41 | กรัม |
| K_2HPO_4 | 0.52 | กรัม |
| Na_2SO_4 | 0.05 | กรัม |
| CaCl_2 | 0.2 | กรัม |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.1 | กรัม |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.005 | กรัม |
| $\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.0025 | กรัม |
| Agar | 9 | กรัม |

พีเอช 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปริมาณอาหาร 50 มิลลิลิตร/ขวด
เตรียม 0.5% bromothymol blue ละลายใน 100 % alcohol ใส่ 2 ml ใน อาหาร 1 ลิตร

1.18 Pikovskaya medium (Sundara & Subba., 2015)

| | | |
|------------------------------|-------|-----------|
| Yeast extract | 0.50 | กรัม |
| Dextrose | 10.00 | กรัม |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 5.00 | กรัม |
| KCl | 0.50 | กรัม |
| MgCl_2 | 0.20 | กรัม |
| FeSO_4 | 0.10 | กรัม |
| Agar | 18 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

พีเอช 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.19 Carboxymethyl cellulose (CMC) agar

| | | |
|---------------|------|-----------|
| Malt extract | 5 | กรัม |
| Yeast extract | 2 | กรัม |
| Glucose | 2 | กรัม |
| L-tryptophan | 9 | กรัม |
| RO water | 1000 | มิลลิลิตร |

พีเอช 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติม CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (%w/v)

1.20 DF salt (Husen et al. 2009)

| | | |
|---|-----|-----------|
| KH_2PO_4 | 4.0 | กรัม |
| Na_2SO_4 | 6.0 | กรัม |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | กรัม |
| Glucose | 2.0 | กรัม |
| Gluconic acid | 2.0 | กรัม |
| Citric acid | 2.0 | กรัม |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.0 | กรัม |
| Trace element | 1 | มิลลิลิตร |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Agar | 18 | กรัม |

พีเอช 7.4 ینگฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.21 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Pyricularia grisea* 61119 (RSA)

| | | |
|-----------|-------|-----------|
| รำละเอียด | 20 | กรัม |
| D-Glucose | 20 | กรัม |
| Agar | 18 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ต้มรำละเอียดเดือดในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นาน 20 นาที กรองกากออกแล้วเติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

22. Potato dextrose agar (PDA) (Himedia)

| | | |
|----------------------|-------|-----------|
| Potato Dextrose Agar | 39 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลาย Potato Dextrose Agar ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับพีเอชด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ค่า พีเอช 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 Salkowski reagent (Glickmann & Dessaux, 1995)

ตัวอย่างการเตรียม 50 มิลลิลิตร

1. เตรียม 0.5 M ของสารละลาย 10 มิลลิลิตร ferric chloride ในน้ำกลั่นละลาย 0.8125 กรัม ของ FeCl_3 ละลายในน้ำ DI ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. เตรียม 35 เปอร์เซ็นต์ ของ perchloric acid ปริมาตร 49 มิลลิลิตร (จากขวดเริ่มต้น 70 %) เทกรดเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำ DI (Deionized Water) ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตร รอให้กรดเย็น แล้วเปิดสารละลาย 0.5 M FeCl_3 ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาหรือหุ้มฟรอยด์ห้ามโดนแสง

หมายเหตุ: การทำปฏิกิริยา คือ ส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ : salkowski reagent 1: 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 25 นาที วัดสีภายใน 30 นาที ที่ 530 นาโนเมตร

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

2.2.1 การย้อมสีแกรม

1. สี Crystal violet
2. Safranin O
3. สารละลายไอโอดีน
4. Ethanol 95%

2.2.2 สีย้อมเชื้อรา และย้อมสไลด์แอคติโนแบคทีเรีย

ส่วนประกอบและการเตรียม ละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย lactophenol cotton blue (1 มิลลิกรัม lactophenol cotton blue ในน้ำ 99 มิลลิลิตร) ลงในกรดแลกติก (Lactic acid) 100 กรัม ฟีนอล (Phenol) 100 กรัม กลีเซอริน (Glycerine) 100 มิลลิลิตร ในน้ำ (50 มิลลิลิตร)

พหุ ประ โท ชี เว

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.3.1 1x TE buffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.4

10 mM EDTA, pH 7.4

2.3.2 5x TBE

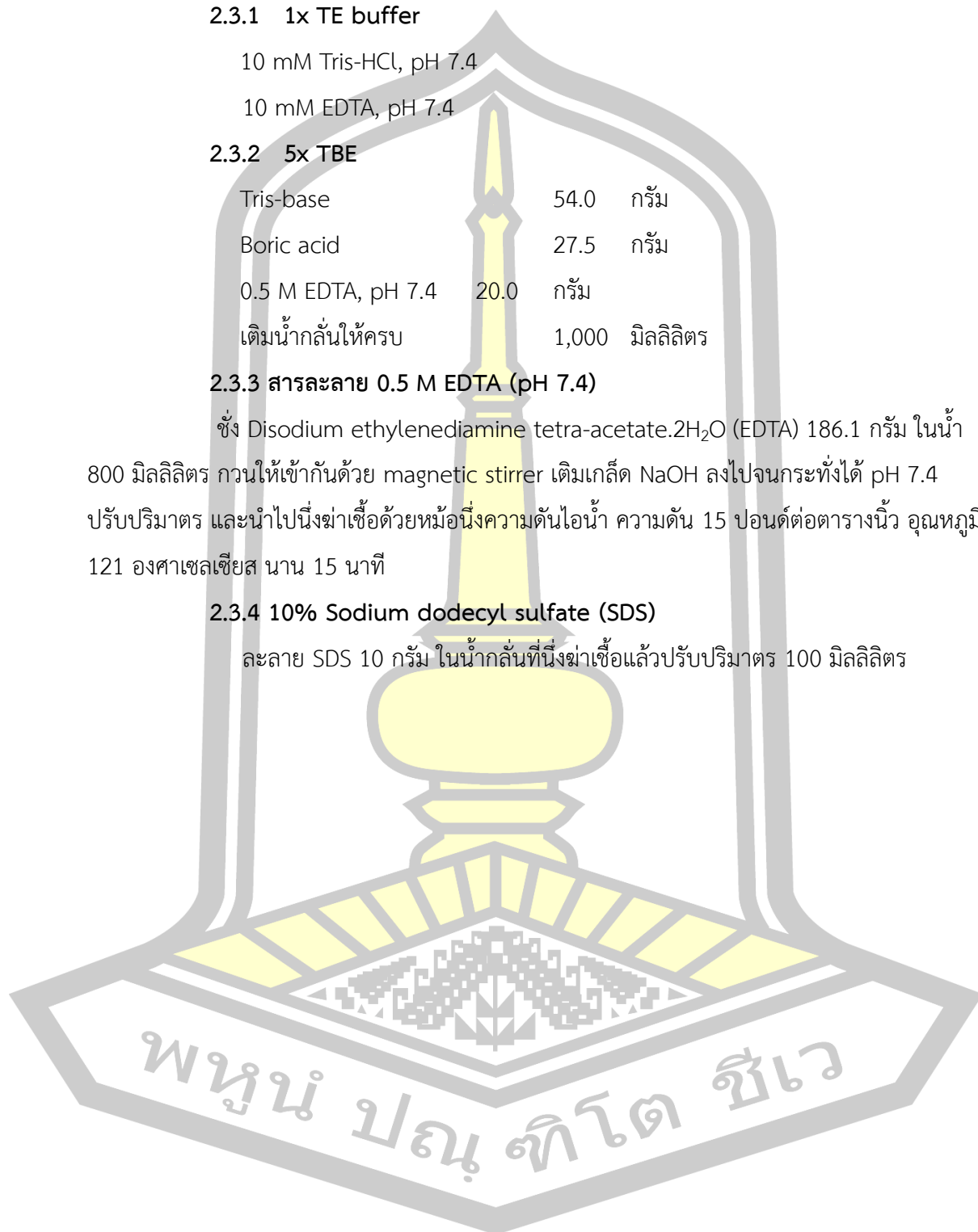
| | | |
|--------------------|-------|-----------|
| Tris-base | 54.0 | กรัม |
| Boric acid | 27.5 | กรัม |
| 0.5 M EDTA, pH 7.4 | 20.0 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

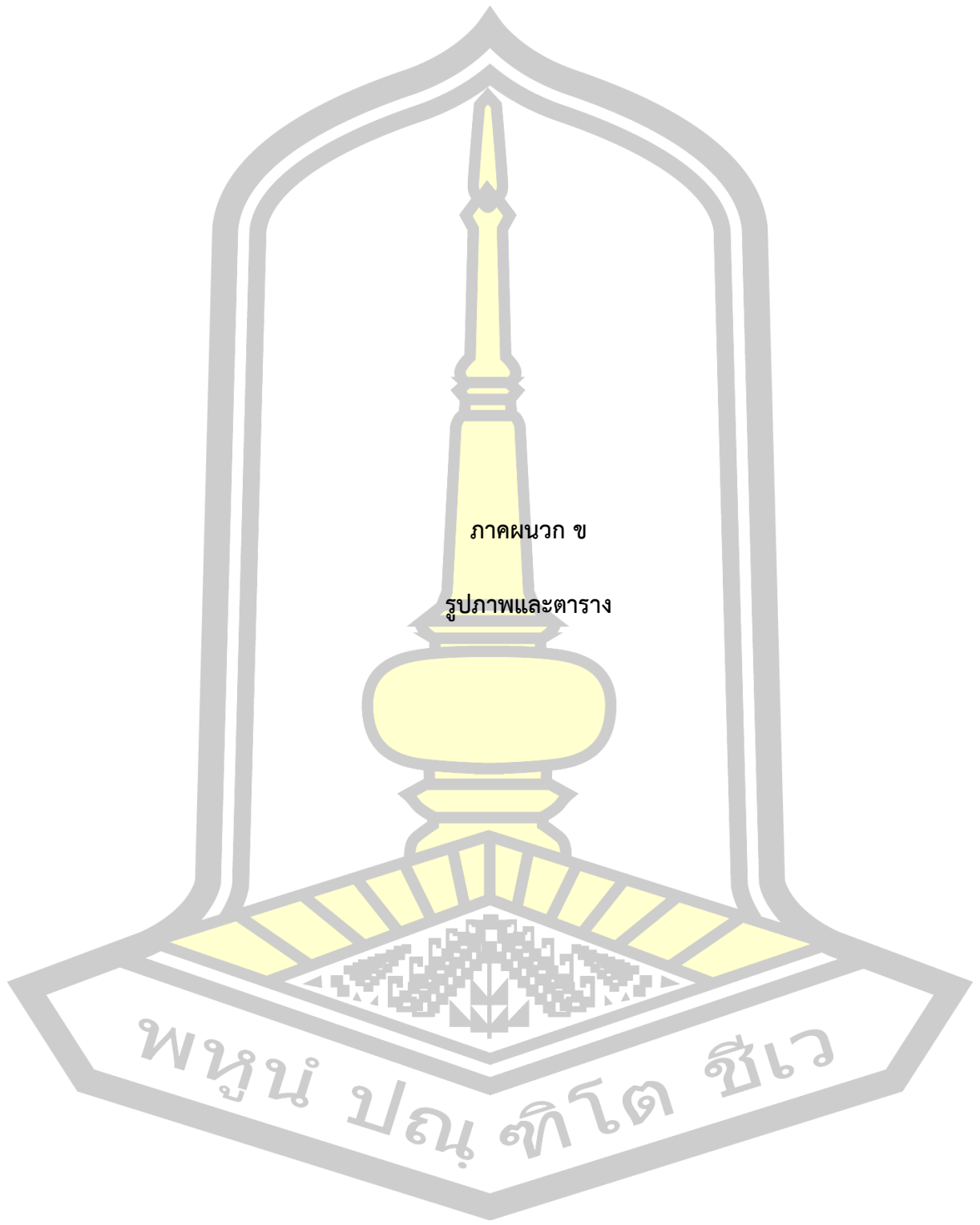
2.3.3 สารละลาย 0.5 M EDTA (pH 7.4)

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetra-acetate.2H₂O (EDTA) 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนกระทั่งได้ pH 7.4 ปรับปริมาตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

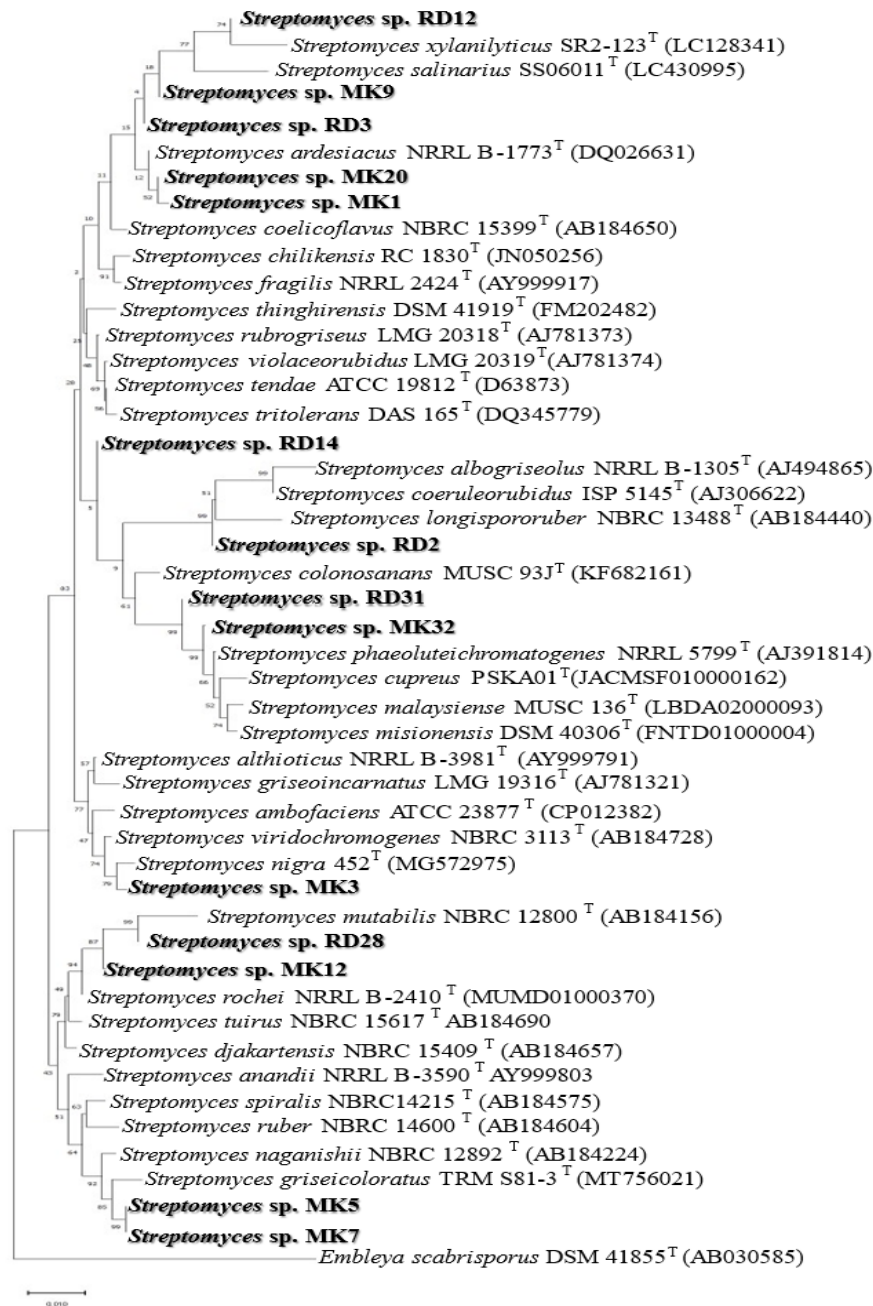




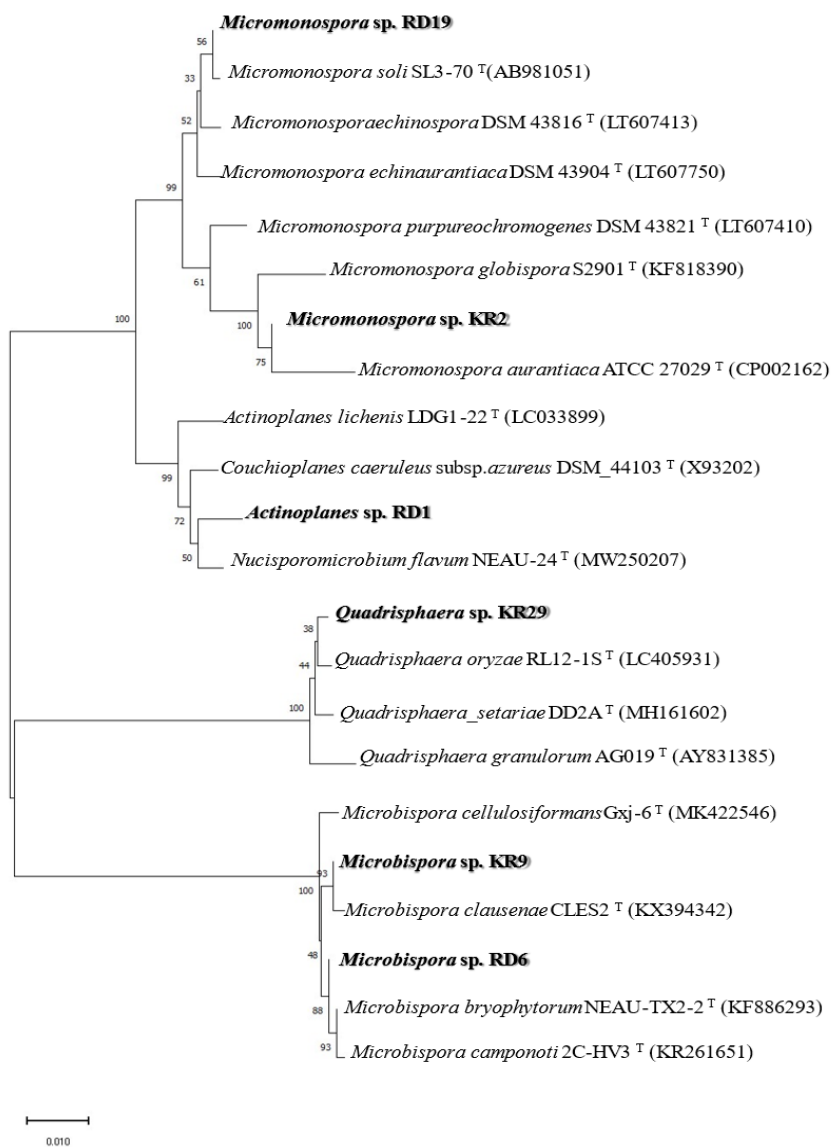
ภาคผนวก ข

รูปภาพและตาราง

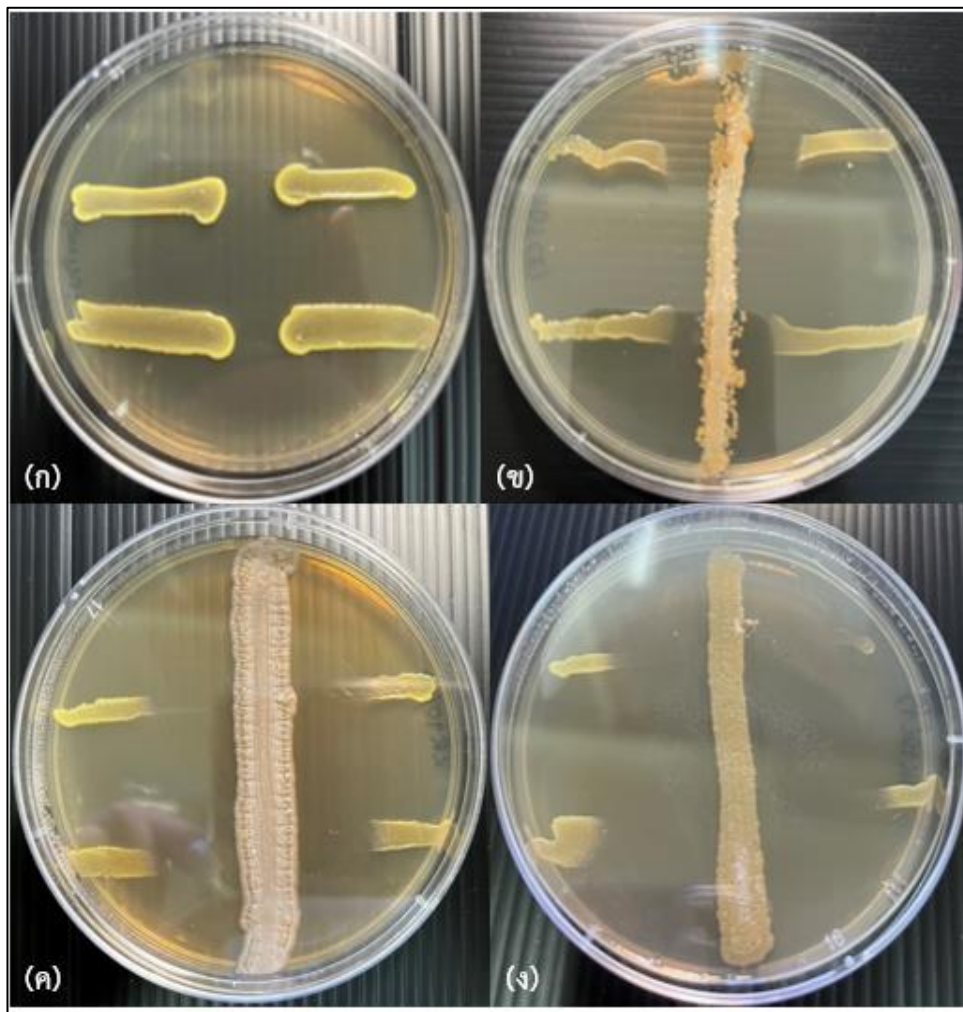
พหุจน์ ปณฺ ทิโต ชีเว



ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี NJ แสดงตำแหน่งของ *Streptomyces* จำนวน 14 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันโดยมี *Embleya scabrisporus* DSM 41855^T เป็นกลุ่มอื่น เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี NJ แสดงตำแหน่งของ Non-*Streptomyces* จำนวน 6 ไอโซเลท และสปีชีส์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อเปรียบเทียบ ค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ

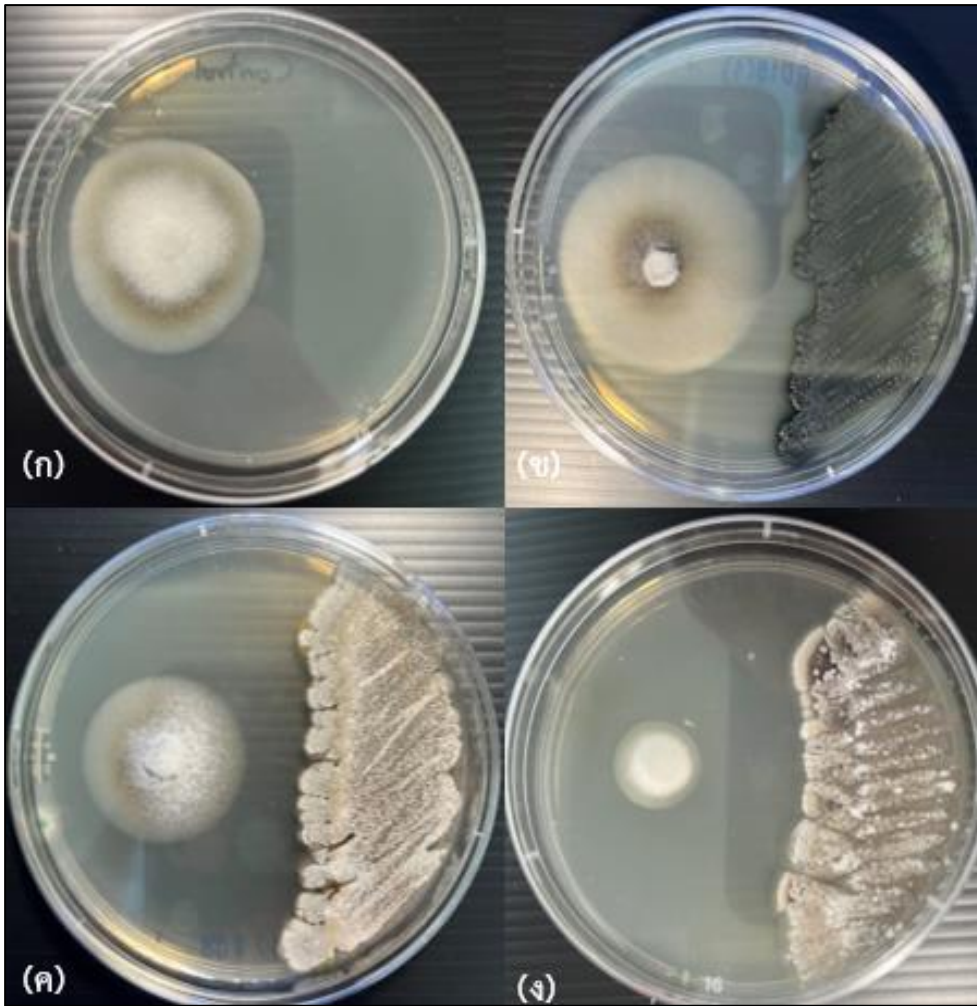


ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคข้าว *Xanthomonas oryzae* PXO71

(ก) การทดลองควบคุม (ข) การยับยั้งระดับน้อยของไอโซเลท RD1

(ค) การยับยั้งระดับปานกลางของไอโซเลท KR10 (ง) การยับยั้งระดับดีของไอโซเลท RD12

พหุ ประเด็น โท ชีวะ



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว

Pyricularia grisea 21009

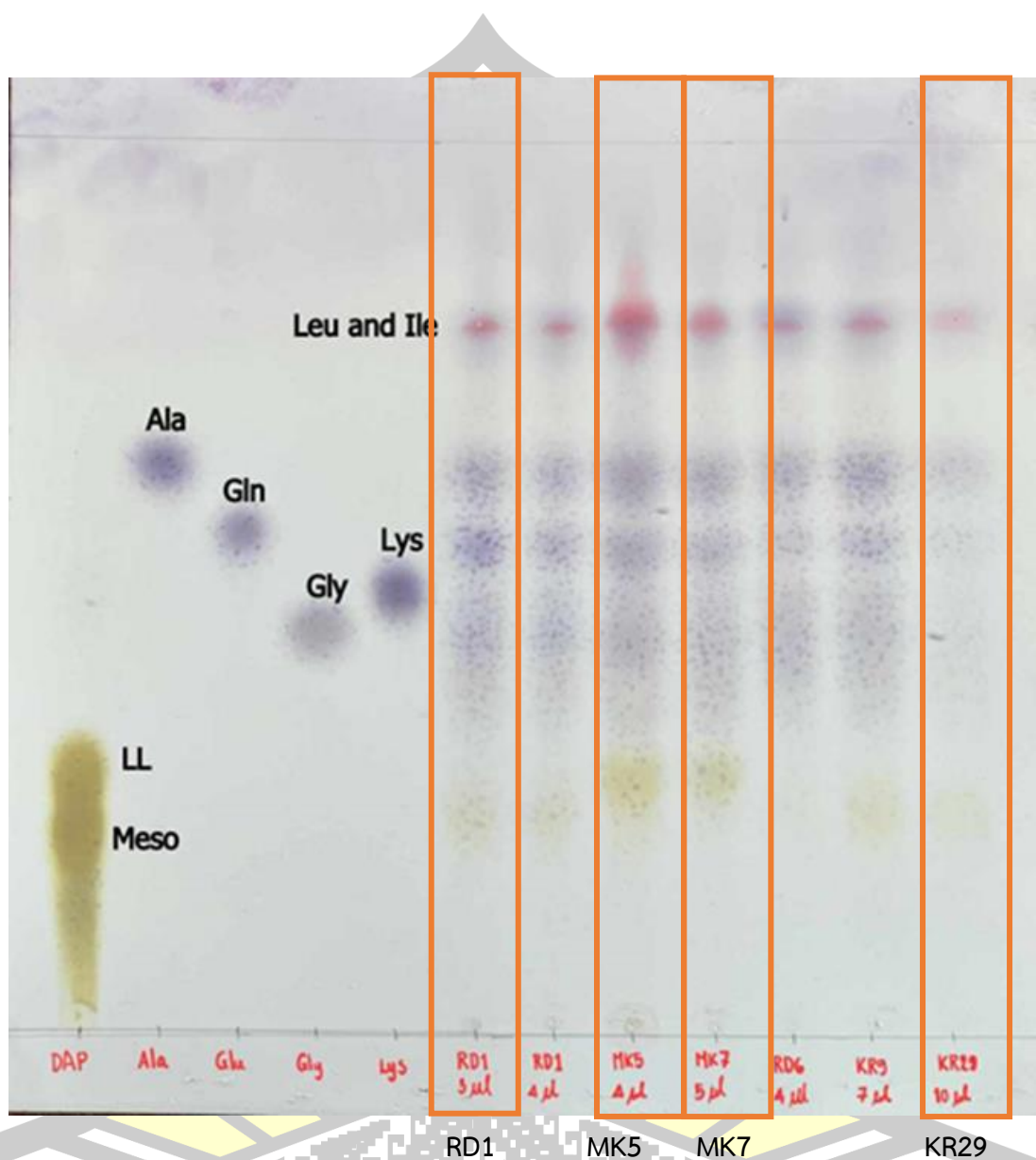
(ก) การทดลองควบคุม

(ข) ไม่เกิดการยับยั้งของไอโซเลท RD19

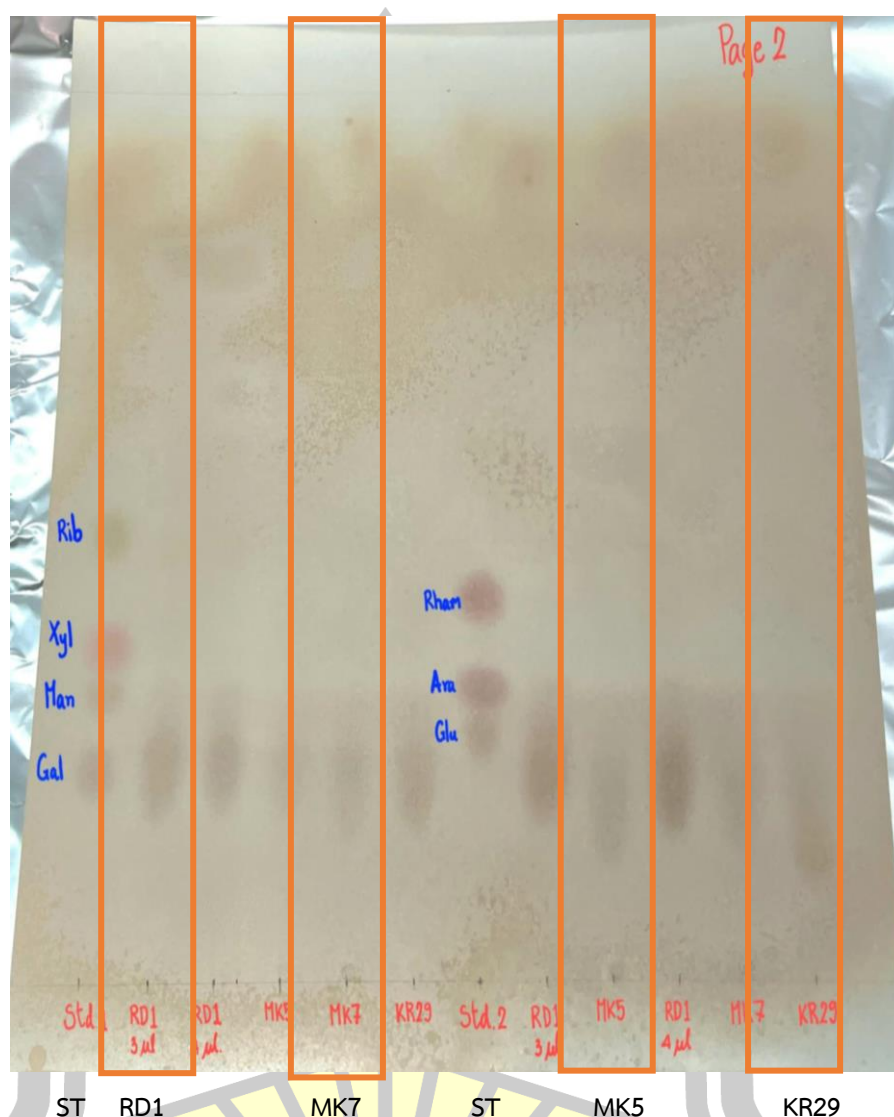
(ค) การยับยั้งระดับน้อยของไอโซเลท RD9

(ง) การยับยั้งระดับดีของไอโซเลท MK32

พหุ ประเด็น ทิศ ชีวะ



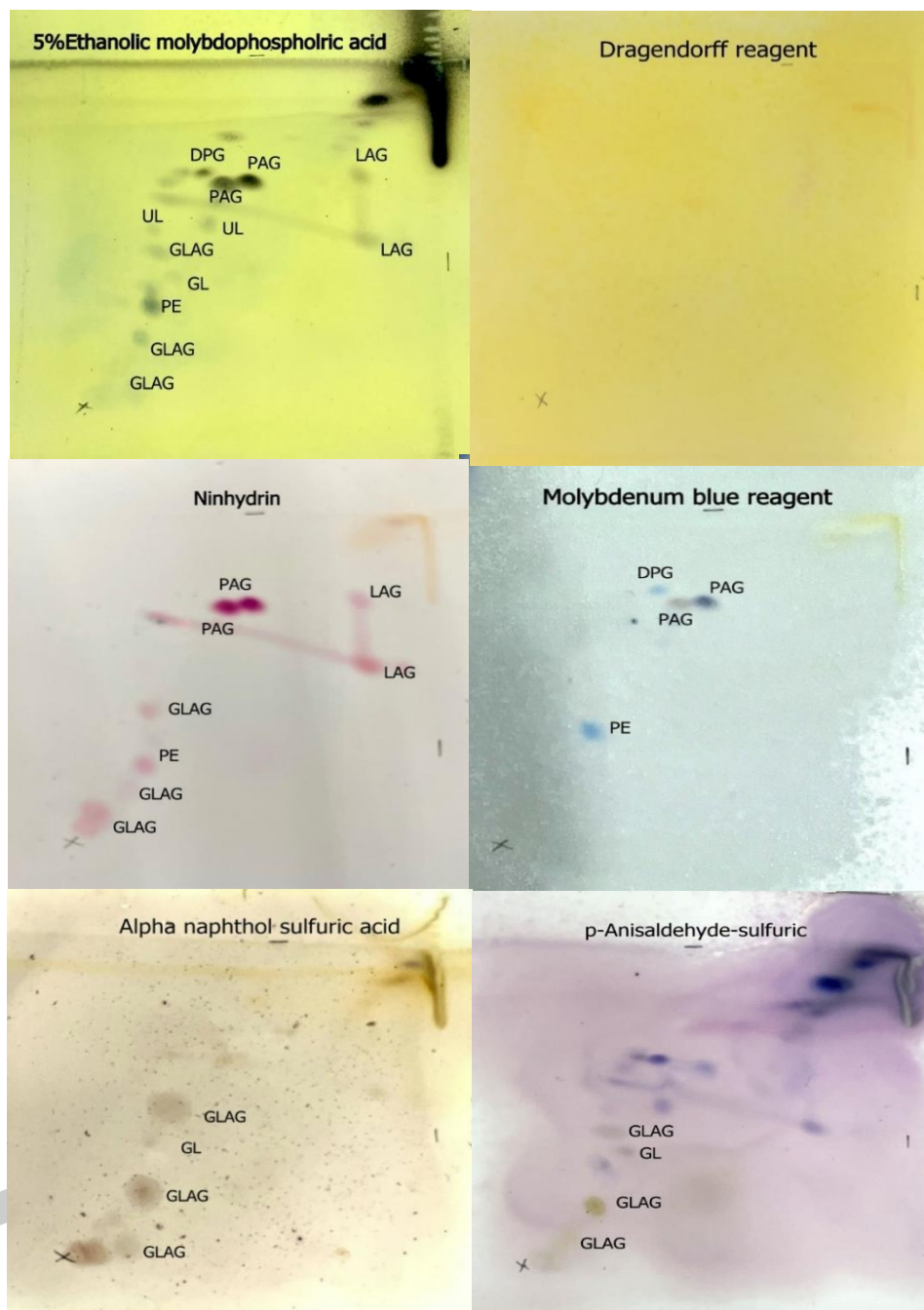
ภาพที่ 6 รูปแบบของ DAP ในเซลล์ของเอนโดไฟติกแอคทีโนแบคทีเรียสายพันธุ์ MK5^T, MK7, RD1^T, และ KR29^T โดยมีสารละลายมาตรฐาน D,L-2,6 Diaminopimelic acid เพื่อเปรียบเทียบบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) Meso: meso-diaminopimelic acid, LL: LL-2,6-Diaminopimelic acid, Ala: Alanine, Gln: Glutamic, Gly: Glycine, Lys: Lysine



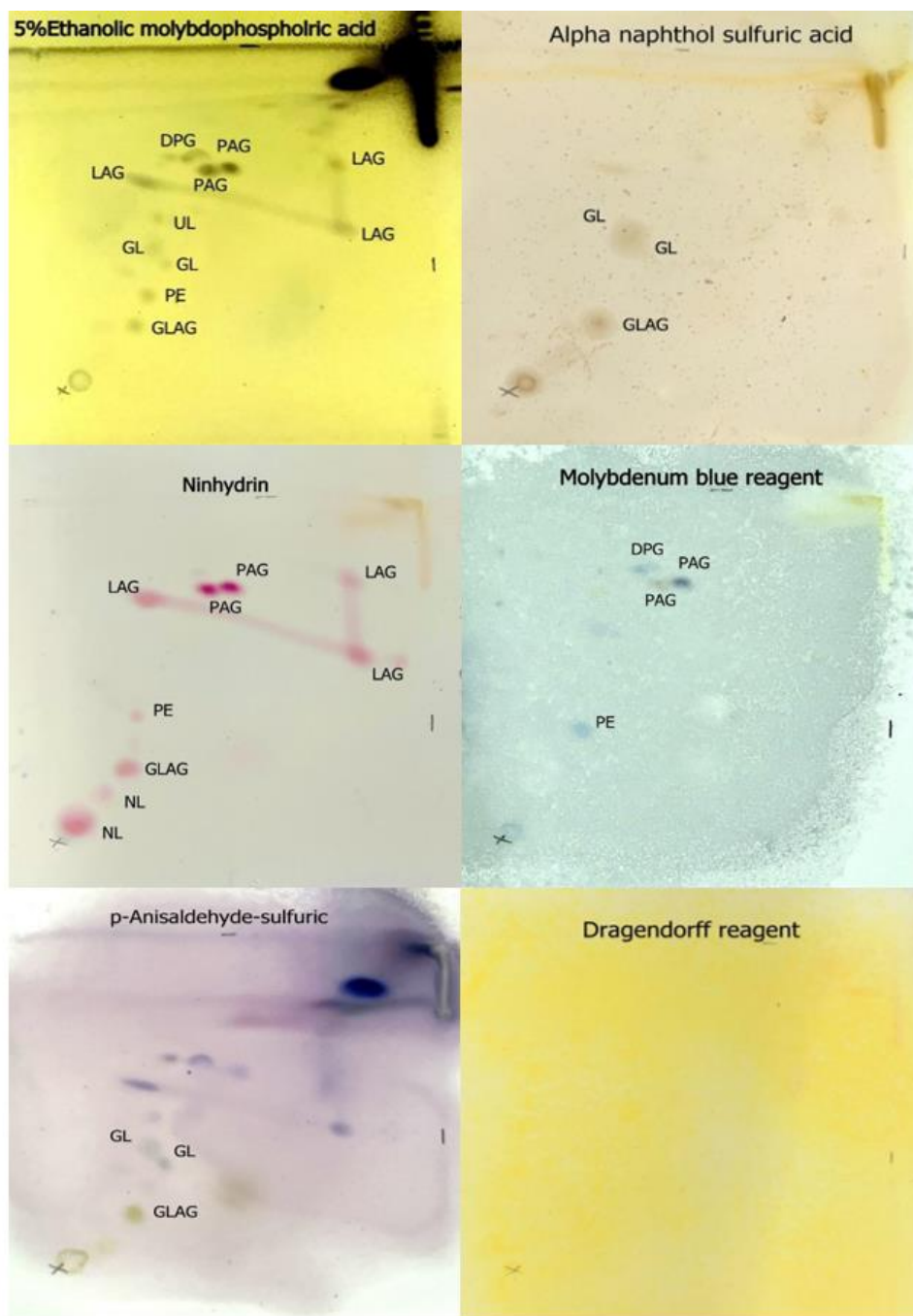
ภาพที่ 7 น้ำตาลในเซลล์ของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ MK5^T, MK7, RD1^T, และ KR29^T เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน (ST) บนแผ่น Thin layer chromatography (TLC)

Gal: น้ำตาลกาแลคโตส Rham: น้ำตาลแรมโนส Ara: น้ำตาลอะราบิโนส Man:

น้ำตาลแมนโนส Xyl: น้ำตาลไซโลส Glu: น้ำตาลกลูโคส Rib: น้ำตาลไรโบส

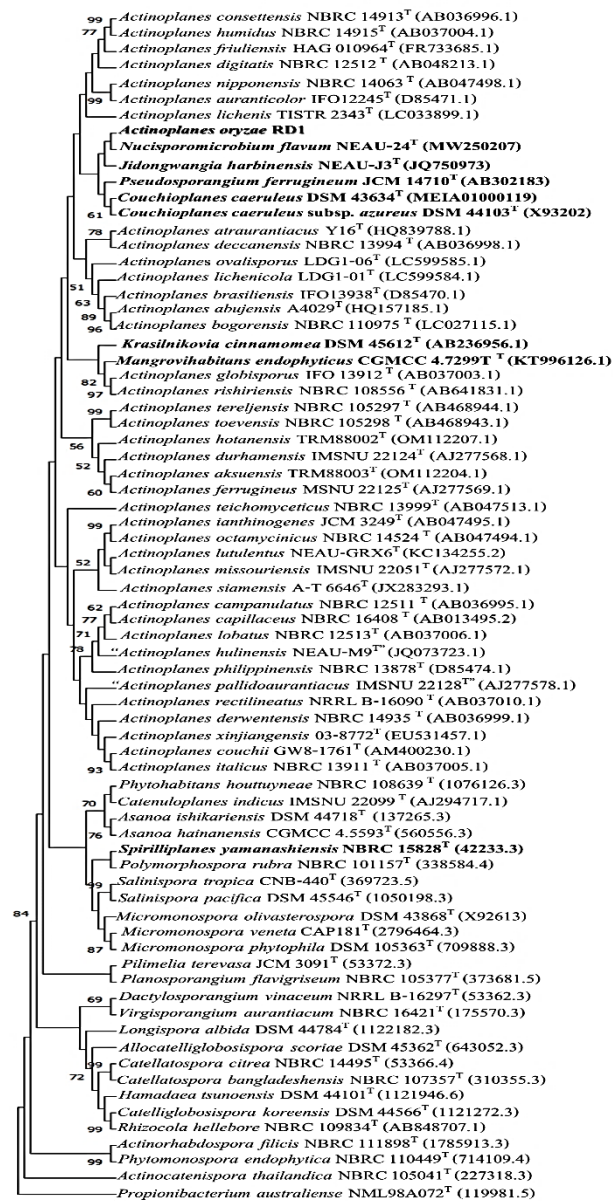


ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ Phospholipid ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T
 DPG; Diphosphatidylglycerol, PE; phosphatidylethanolamine, PG;
 phosphatidylglycerol; LAG, glycolipid with amino group; LG, glycolipid NL; not lipids,
 UL; unknown lipid, X; starting point.

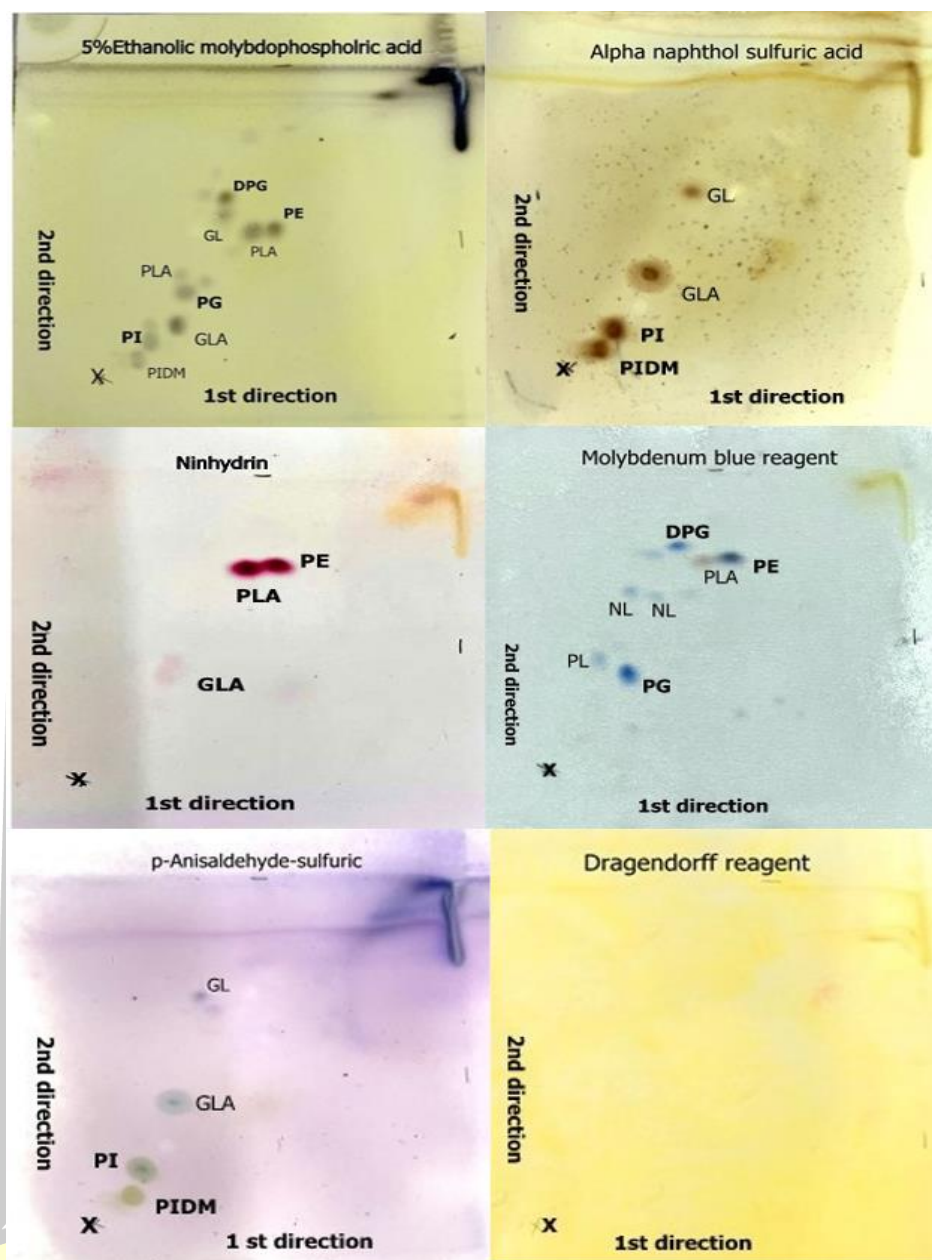


ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ Phospholipid ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK7

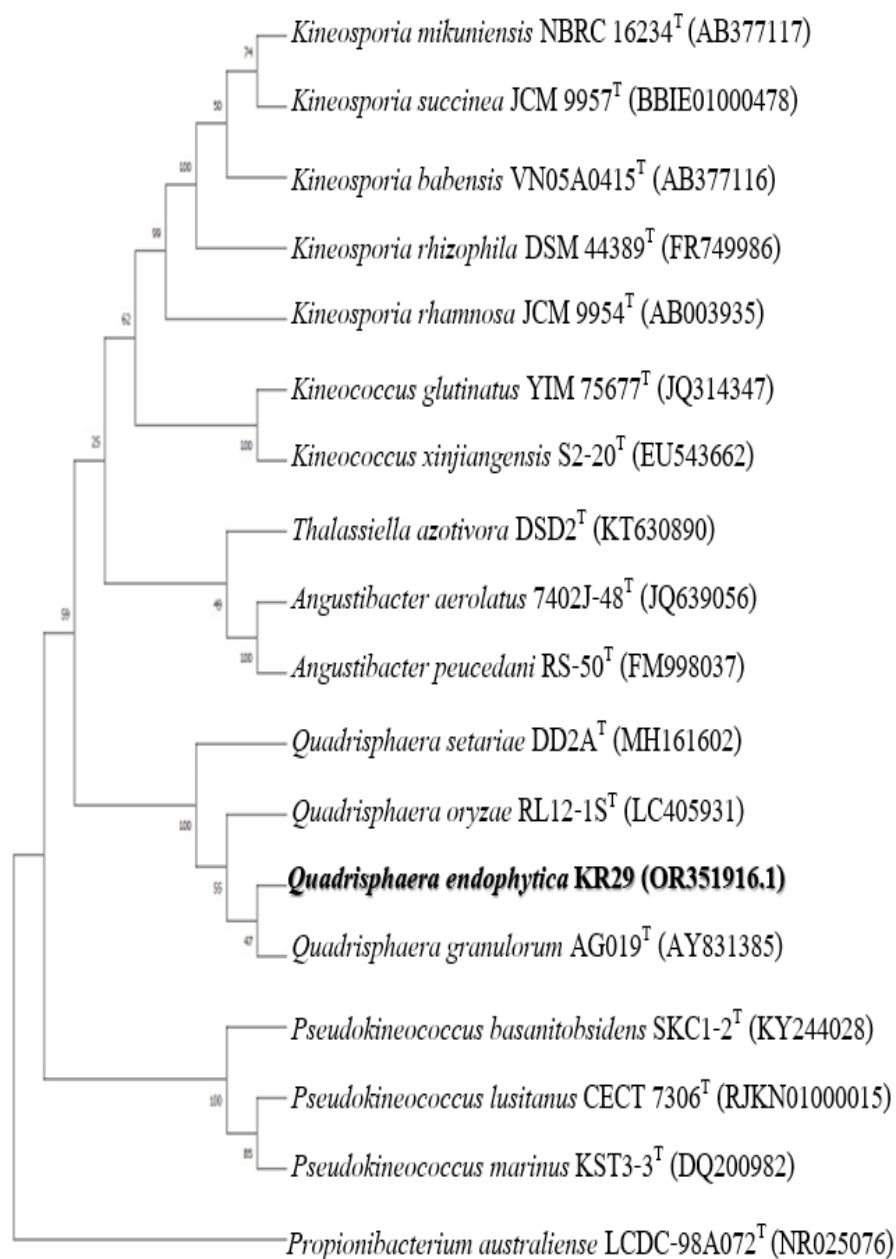
DPG; Diphosphatidylglycerol, PE; phosphatidylethanolamine, PG; phosphatidylglycerol; LAG, glycolipid with amino group; LG, glycolipid NL; not lipids, UL; unknown lipid, X; starting point.



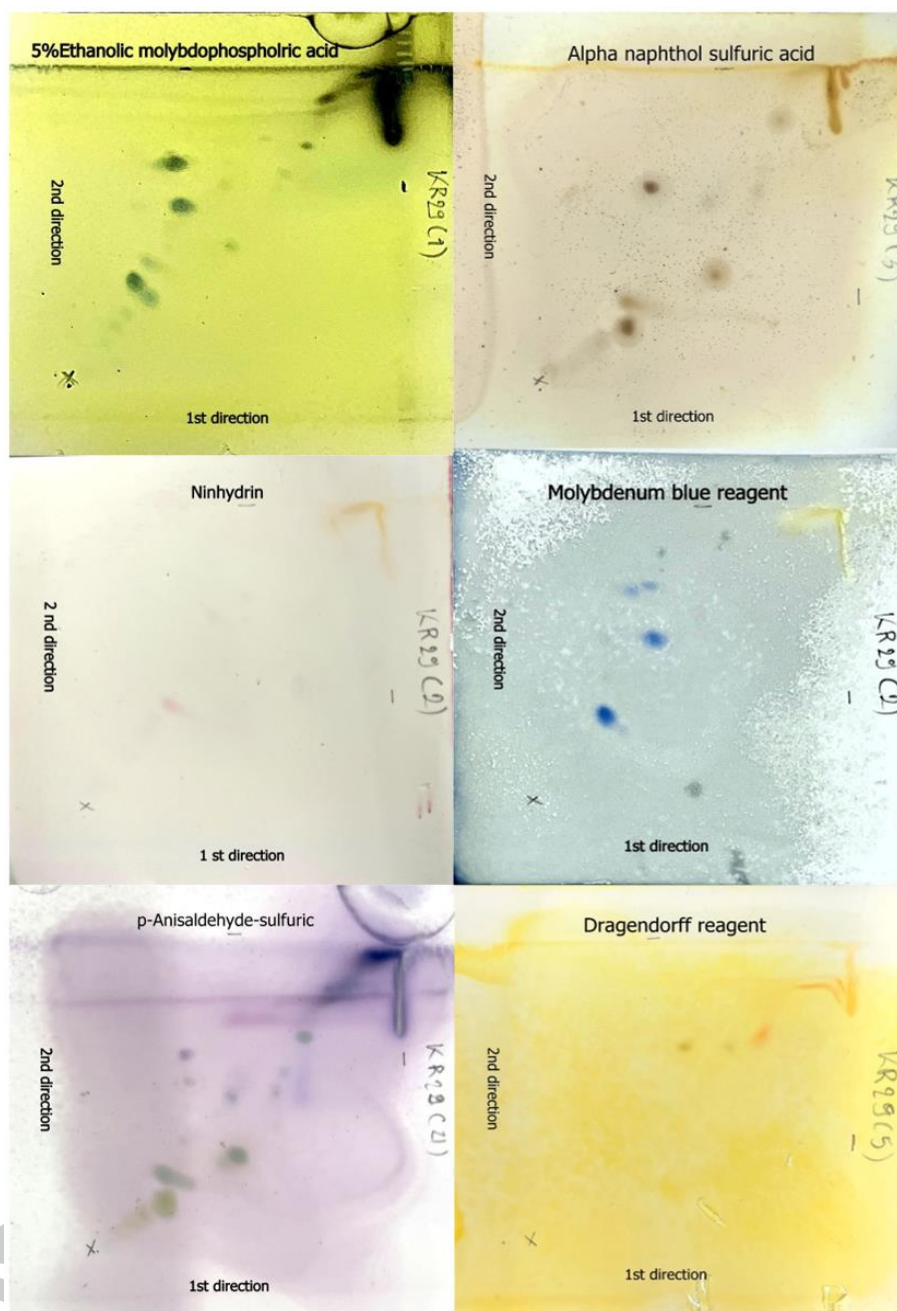
ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี Neighbour joining (1396 bp) แสดงตำแหน่งของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้ชิดกันในสกุล *Actinoplanes* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* โดย *Propionibacterium australiense* NML98A072^T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ



ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ Phospholipid ของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T
 DPG; diphosphatidylglycerol , PE; phosphatidylethanolamine, PG;
 phosphatidylglycerol PI; phosphatidylinositol, PIDM; phosphatidylinositol
 dimannoside, PLA; phospholipid with an amino group, GLA; glycolipid with an amino
 group one, GL; glycolipid NL; not lipids, X; starting point



ภาพที่ 12 แผนภูมิต้นไม้ของยีน 16S rRNA ที่สร้างด้วยวิธี NJ (1474 bp) แสดงตำแหน่งของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T และสายพันธุ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Quadrisphaera* และสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในวงศ์ *Kineosporaceae* โดยมี *Propionibacterium australiense* LCDC-98A072^T เป็น out group แสดงค่า bootstrap (>50 %) จากการคำนวณ 1000 ซ้ำ



ภาพที่ 13 การวิเคราะห์ Phospholipid ของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T
 DPG; Diphosphatidylglycerol, PE; phosphatidylethanolamine,
 PG; phosphatidylglycerol; LAG; glycolipid with amino group;
 LG; glycolipid NL; not lipids, UL; unknown lipid, X; starting point

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|---------------|-------|--------------------|---------------------------------|
| Salt stress related protein | | | | |
| Proline racemase | 49527-50528 | 1868 | 96.1 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Proline-tRNA ligase | 142223-143923 | 2868 | 99.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| proline dehydrogenase | 115929-116855 | 1532 | 97.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Betaine-aldehyde dehydrogenase | 36053-37522 | 2256 | 99.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein | 37543-38631 | 1834 | 98.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Putative Betaine aldehyde dehydrogenase | 110425-111951 | 2387 | 92.9 | <i>Streptomyces</i> sp. F-3 |
| Glycine/betaine ABC transporter permease | 19591-20262 | 1097 | 97.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Proline iminopeptidase | 15600-16598 | 1686 | 94 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Indole acetic acid production | | | | |
| Indole-3-glycerol phosphate synthase (trypc1) | 78167-78976 | 1303 | 98.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Tryptophan synthase beta chain | 75743-76561 | 1357 | 98.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Protease | | | | |
| Hydrogenase maturation protease | 31669-32142 | 580 | 76.5 | <i>Streptomyces monashensis</i> |
| ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH | 9052-11169 | 3554 | 99.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Serine protease | 45145-46344 | 2016 | 98.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Membrane protein | 364789-365679 | 1283 | 84.3 | <i>Streptomyces</i> sp. e14 |
| Tricorn protease homolog | 311956-315171 | 5641 | 98.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Neutral metalloproteinase | 336138-337208 | 1841 | 97.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Neutral metalloproteinase | 380093-381736 | 2791 | 96.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|---------------|-------|--------------------|------------------------------|
| Tetratricopeptide repeat protein | 19909-20289 | 638 | 99.2 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Lon N-terminal domain-containing protein | 95990-96730 | 1216 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Serine protease | 242897-244066 | 1859 | 95.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Protease HtpX homolog | 271325-272248 | 1491 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Subtilisin inhibitor domain-containing protein | 178097-178540 | 716 | 90.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Tetratricopeptide repeat protein | 209274-209621 | 561 | 95.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Zinc metalloprotease | 135733-137037 | 2217 | 98.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Zinc protease | 194767-196146 | 2338 | 99.1 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Serine protease | 84417-85271 | 1444 | 97.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Peptidase S53 domain-containing protein | 2252-3490 | 2077 | 95.4 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Serine protease | 413628-414707 | 1769 | 96.4 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Serine protease | 318683-320623 | 3276 | 97.1 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chitinase | | | | |
| Chitinase | 353978-355048 | 1709 | 90.4 | <i>Streptomyces curacoii</i> |
| Chitinase | 280002-281720 | 2838 | 97.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chitinase | 67628-69457 | 3116 | 96.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chitinase | 11204-12418 | 2120 | 96.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chitinase | 12897-14729 | 3058 | 91.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chitinase | 353978-355048 | 1709 | 90.4 | <i>Streptomyces curacoii</i> |
| Arginine deiminase | | | | |
| Arginine deiminase | 67055-68281 | 2125 | 99.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Arginine dihydrolase | | | | |

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|---------------|-------|--------------------|--------------------------------------|
| Amylase | | | | |
| Alpha-amylase, 3.2.1.1 | 294156-295538 | 2353 | 94.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Oligo-1,6-glucosidase | 1656-3314 | 2725 | 91.3 | <i>Streptomyces sp. AS58</i> |
| Lipase | | | | |
| Lipase 1 | 390045-390851 | 1336 | 95.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D | 108901-110571 | 2870 | 98.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Esterase | 174786-175670 | 1507 | 98.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Lipase 1 | 28591-29385 | 1358 | 97 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| phospholipase C | 13156-15198 | 3497 | 94 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Lysophospholipase | 12781-13602 | 1354 | 93.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Xylan degradation | | | | |
| Putative Beta-D-xylosidase 3 | 103727-106594 | 2011 | 85.4 | <i>Streptomyces afghaniensis</i> 772 |
| Beta-xylanase, 3.2.1.8 | 4058-5458 | 2373 | 97 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Polysaccharide deacetylase family protein | 78180-79169 | 1485 | 86.1 | <i>Streptomyces mexicanus</i> |
| Endo-1,4-beta-xylanase, 3.2.1.8 | 79207-80205 | 1286 | 89.9 | <i>Streptomyces sp. SID625</i> |
| Beta-xylanase, 3.2.1.8 | 29201-30670 | 2509 | 96.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Ricin-type beta-trefoil lectin protein | 32262-32645 | 656 | 93.7 | <i>Streptomyces sp. TLI_185</i> |
| Beta-xylanase | 31856-32908 | 1811 | 96.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | | | | |
| acylphosphatase, 3.6.1.7 | 192116-192397 | 496 | 100 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| histidine kinase, 2.7.13.3 | 97442-98434 | 1547 | 93.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Protein-tyrosine-phosphatase | 41373-41837 | 691 | 96.3 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| PHP domain-containing protein | 158381-159418 | 1749 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Trehalose 6-phosphate phosphatase, | 81971-82843 | 1393 | 94.1 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| phosphoserine phosphatase, | 17271-18479 | 1972 | 100 | <i>Streptomyces spiralis</i> |

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

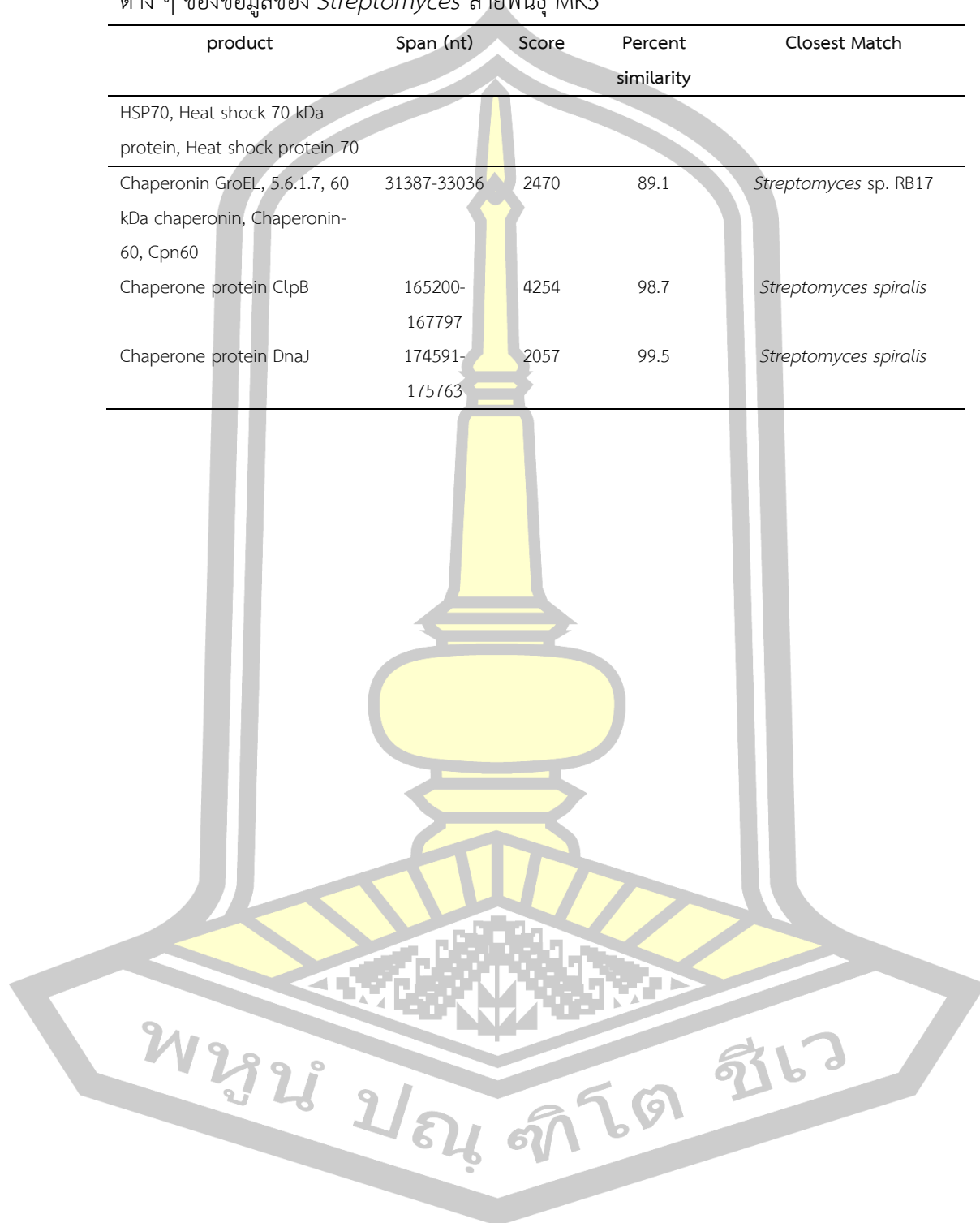
| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|---------------|-------|--------------------|------------------------------|
| histidinol-phosphatase | 99369-100169 | 1385 | 98.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Acid sugar phosphatase | 28230-29009 | 1315 | 98.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| dITP/XTP pyrophosphatase | 86935-87537 | 1007 | 98.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Inorganic pyrophosphatase, 3.6.1.1 | 99215-99703 | 95.7 | 845 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | 981-1274 | 445 | 86.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | 74376-75074 | 1121 | 95.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Sulfatase | 28237-29733 | 2661 | 97.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| DNA mismatch repair protein MutT | 21233-21664 | 752 | 98.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Histidine kinase | 26362-27846 | 2412 | 98.2 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Inorganic pyrophosphatase | 16546-17037 | 870 | 100 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| PPM-type phosphatase domain-containing protein | 13902-14687 | 1312 | 97.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Ppx/GppA phosphatase domain-containing protein | 11914-12963 | 1642 | 98.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Morphological differentiation-associated protein | 31812-32645 | 1406 | 98.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase PAP2 family protein | 250173-250802 | 1034 | 96.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | 323667-324353 | 1171 | 98.2 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Haloacid dehalogenase | 460813-461841 | 1711 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | 43180-43980 | 1389 | 99.2 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| DNA mismatch repair protein MutT | 370689-371105 | 713 | 97.8 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Phosphatase | 436792-437649 | 1447 | 98.9 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Acid phosphatase | 308527-309417 | 538 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Heat | | | | |
| Heat-shock protein Hsp20 | 71360-71779 | 666 | 93.5 | <i>Streptomyces</i> sp. SAT1 |
| Heat-inducible transcription repressor HrcA | 174136-174585 | 1684 | 99.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|---------------|-------|--------------------|-------------------------------------|
| Chaperone | | | | |
| Chaperone protein DnaJ | 174591-175763 | 2057 | 99.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chaperone protein DnaK, HSP70, Heat shock 70 kDa protein, Heat shock protein 70 | 176549-178411 | 3051 | 98.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Heme chaperone HemW | 302315-303547 | 2112 | 97.6 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chaperone protein DnaJ | 307119-308255 | 1979 | 99.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Co-chaperonin GroES, 10 kDa chaperonin, Chaperonin-10, Cpn10 | 26140-26448 | 507 | 100 | <i>Streptomyces echinoruber</i> |
| Chaperonin GroEL, 5.6.1.7, 60 kDa chaperonin, Chaperonin-60, Cpn60 | 26562-28187 | 2599 | 97.4 | <i>Streptomyces</i> sp. e14 |
| Molecular chaperone HtpG | 177246-178286 | 1732 | 98 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Molecular chaperone HtpG | 178232-179152 | 1352 | 93 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| HSP90 family protein | 47196-49052 | 2258 | 96.9 | <i>Streptomyces spongiae</i> |
| Chaperonin GroEL, 5.6.1.7, 60 kDa chaperonin, Chaperonin-60, Cpn60 | 89402-91024 | 2617 | 99.4 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| 10 kDa chaperonin | 85451-85807 | 604 | 100 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Cobalamin biosynthesis protein CobW | 2958-4076 | 1713 | 95.1 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Heat-shock protein | 31246-31701 | 653 | 83.4 | <i>Streptomyces caeruleatus</i> |
| Chaperone protein ClpB | 6572-9211 | 4316 | 99 | <i>Streptomyces filipinensis</i> |
| MerR family transcriptional regulator | 9202-9609 | 653 | 97 | <i>Streptomyces actinomycinicus</i> |
| Chaperone protein DnaK, HSP70, Heat shock 70 kDa protein, Heat shock protein 70 | 11183-13081 | 3086 | 98.7 | <i>Streptomyces</i> sp. FXJ1.172 |
| Chaperone protein DnaK, | 93559-95430 | 3068 | 98.2 | <i>Streptomyces spiralis</i> |

ตารางที่ 1 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MK5^T

| product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|---------------|-------|--------------------|------------------------------|
| HSP70, Heat shock 70 kDa protein, Heat shock protein 70 | | | | |
| Chaperonin GroEL, 5.6.1.7, 60 kDa chaperonin, Chaperonin-60, Cpn60 | 31387-33036 | 2470 | 89.1 | <i>Streptomyces</i> sp. RB17 |
| Chaperone protein ClpB | 165200-167797 | 4254 | 98.7 | <i>Streptomyces spiralis</i> |
| Chaperone protein DnaJ | 174591-175763 | 2057 | 99.5 | <i>Streptomyces spiralis</i> |



ตารางที่ 2 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|---------------|-------|--------------------|-------------------------------------|
| Salt stress response | | | | |
| Glycine betaine/proline transport system ATP-binding protein | 42655-43146 | 588 | 74.2 | <i>Actinoplanes italicus</i> |
| Glycine/betaine ABC transporter permease | 13154-13813 | 976 | 89.9 | <i>Actinoplanes cyaneus</i> |
| Choline ABC transporter, ATP-binding protein | 43104-43688 | 776 | 85.8 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Proline/glycine betaine ABC transporter ATP-binding protein | 14671-15660 | 1405 | 86 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Glycine/betaine ABC transporter permease | 15663-16385 | 1120 | 90.8 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Lipase | | | | |
| Lipase class 2 | 8526-9200 | 990 | 84.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Protease | | | | |
| Trypsinogen | 105951-106721 | 798 | 68.3 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Roadblock/LAMTOR2 domain-containing protein | 31500-31904 | 660 | 100 | <i>Actinoplanes teichomyceticus</i> |
| Zinc metalloprotease | 4428-5531 | 1478 | 80.9 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Peptidase M16 | 9115-10422 | 2118 | 93.8 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Peptidase M16 domain-containing protein | 42576-43910 | 1869 | 83.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Streptogrisin C | 51404-52723 | 1764 | 80.2 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Peptidase M50 | 45632-46450 | 1246 | 80.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Peptidase S1 and S6 chymotrypsin/Hap | 20045-21217 | 1725 | 85.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| RIP metalloprotease RseP | 5127-6368 | 1798 | 81.7 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Lon protease | 20868-23177 | 3633 | 93.8 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Trypsin | 22663-23460 | 1219 | 87.5 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |

ตารางที่ 2 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|-------------|-------|--------------------|--|
| Peptidase S16 | 154-864 | | 82.2 | <i>Couchioplanes caeruleus</i> subsp. <i>caeruleus</i> |
| Protease HtpX homolog | 10553-11437 | 1376 | 92.9 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Peptidase S1 | 7126-8073 | 1399 | 88.2 | <i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 53533 |
| Subtilisin family serine protease | 34847-36034 | 1644 | 82.2 | <i>Actinoplanes teichomyceticus</i> |
| Subtilisin family serine protease | 32446-33708 | 1013 | 65.1 | <i>Micromonospora polyrhachis</i> |
| Peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin | 12214-13344 | 1234 | 66.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Chitinase | | | | |
| Chitinase | 10059-11321 | 1845 | 82.2 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Chitinase | 35552-36748 | 1580 | 71.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Amylase | | | | |
| Glucan 1,4-alpha-glucosidase | 97-2214 | 2590 | 71.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Alpha-amylase, 3.2.1.1 | 16348-18258 | 2676 | 85.3 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Xylan degradation /xylose isomerase | | | | |
| Glycoside hydrolase family 3 protein | 52980-55385 | 2819 | 68.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Beta-xylanase | 37946-39085 | 1739 | 87.3 | <i>Actinoplanes auranticolor</i> |
| Family 3 glycoside hydrolase domain-containing protein | 7734-10667 | 3949 | 77 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Beta-xylanase | 18197-19213 | 1389 | 85.3 | <i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358 |
| Endo-1,4-beta-xylanase | 9227-10246 | 1546 | 83.3 | <i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358 |
| Beta-xylanase | 17208-18656 | 2241 | 88.7 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Beta-xylanase | 5589-6938 | 1749 | 73.9 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase | 20898-22367 | 2207 | 85 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Glycoside hydrolase family 127 protein | 72109-73974 | 2194 | 68.5 | <i>Actinotalea fermentans</i> |

ตารางที่ 2 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|-------------|-------|--------------------|---|
| Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase | 18031-19002 | 1434 | 80.4 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Xylose isomerase | 622-1806 | 1970 | 94.2 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Phosphatase | | | | |
| Inorganic pyrophosphatase | 11876-12388 | 845 | 94 | <i>Actinoplanes missouriensis</i> ATCC 14538 |
| Alkaline phosphatase | 10855-12156 | 2057 | 91.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D | 1015-1944 | 1406 | 84.8 | <i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358 |
| Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D | 1941-2627 | 499 | 83.8 | <i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358 |
| Alkaline phosphatase D | 27-1313 | 2046 | 87.1 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Alkaline phosphatase | 2825-3316 | 680 | 72.1 | <i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 53533 |
| Arginine deiminase | | | | |
| Arginine deiminase | 32001-33215 | 1889 | 92.4 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Ornithine carbamoyltransferase | 38597-39526 | 1356 | 87.8 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Heat shock protein | | | | |
| Heat shock protein 20 | 60521-60919 | 514 | 81.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Putative heat shock protein | 42291-42764 | 602 | 82.8 | <i>Actinoplanes missouriensis</i> |
| Heat shock protein | 30031-30471 | 651 | 89 | <i>Actinoplanes nipponensis</i> |
| Cold shock protein | | | | |
| Cold-shock protein | 2809-3012 | 378 | 98.5 | <i>Actinoplanes rishiriensis</i> |
| Cold-shock protein | 36441-36644 | 381 | 100 | <i>Micromonospora deserti</i> |
| Putative cold-shock DNA-binding protein | 1974-2177 | 349 | 89.6 | <i>Actinoplanes teichomyceticus</i> |
| Cold-shock protein | 5004-5207 | 364 | 97 | <i>Actinoplanes rishiriensis</i> |
| Chaperone protein | | | | |
| Chaperone protein DnaK | 26042-27937 | 3022 | 94.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Chaperone protein DnaJ | 28806-30005 | 1936 | 93 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Chaperone protein ClpB | 35791-38379 | 4111 | 95.2 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Cobalamin biosynthesis protein CobW | 14188-15405 | 1373 | 68.3 | <i>Actinoplanes</i> sp. TBRC 11911 |

ตารางที่ 2 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|-------------|-------|--------------------|--|
| Chaperonin GroEL | 1439-3082 | 2633 | 96.4 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Co-chaperonin GroES | 3153-3461 | 505 | 100 | <i>Couchioplanes caeruleus</i> subsp. <i>caeruleus</i> |
| Chaperone protein HtpG | 2008-3879 | 2804 | 88.3 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Chaperone protein DnaJ | 660-1826 | 1995 | 97.6 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Chaperonin GroEL | 90814-92436 | 2629 | 99.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Phytoene production | | | | |
| Phytoene dehydrogenase-like protein | 8805-10373 | 2279 | 80.8 | <i>Pseudosporangium ferrugineum</i> |
| Phytoene desaturase | 7266-8780 | 2261 | 87.1 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Phytoene synthase | 4999-5907 | 1176 | 87.9 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Bioremediation/ detoxification | | | | |
| Heavy metal transport/detoxification protein | 7042-7254 | 332 | 90 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Haloacetate dehalogenase | 2274-3179 | 1213 | 79.2 | <i>Plantactinospora soyae</i> |
| Alkanesulfonate monooxygenase | 2449-2997 | 760 | 81.9 | <i>Catellatospora</i> sp. IY07-71 |
| Motility | | | | |
| Flagellar protein FlIS | 24514-24906 | 540 | 84.3 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Flagellar hook-associated protein 3 | 18534-19421 | 1263 | 85.1 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Flagellar hook-associated protein 1 | 19433-20914 | 2120 | 83.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Flagellin | 21637-22848 | 1798 | 91.6 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |
| Flagellar hook-associated protein 2 | 22973-24355 | 1653 | 75 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Flagellar basal body rod protein FlgB | 25432-25779 | 540 | 94.8 | <i>Actinoplanes nipponensis</i> |
| Flagellar basal-body rod protein FlgC | 25779-26174 | 628 | 94.6 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |
| Flagellar M-ring protein | 26514-28115 | 2348 | 87.1 | <i>Actinoplanes</i> sp. N902-109 |

ตารางที่ 2 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Actinoplanes* สายพันธุ์ RD1^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|-------------------------------------|-------------|-------|--------------------|--|
| Flagellar motor switch protein FliG | 28153-29178 | 1578 | 94.4 | <i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358 |
| Others | | | | |
| Halogenase | 5011-6648 | 2471 | 85.3 | <i>Actinoplanes consettensis</i> |

ตารางที่ 3 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|-------------------|-------|--------------------|-------------------------------|
| Salt/ drought stress | | | | |
| ABC transporter substrate-binding protein | 147,604 – 148,593 | 1277 | 79.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Alpha/beta fold hydrolase | 187,841 – 188,632 | 1101 | 84 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Alpha/beta hydrolase | 121,572 – 122,483 | 1299 | 83.4 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Selenide, water dikinase | 168,702 – 169,769 | 1562 | 88.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Voltage-gated potassium channel | 7,770 – 8,858 | 1473 | 87.5 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| ABC transporter permease | 145,910 – 146,668 | 1060 | 92.2 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Phosphoribosylamine-glycine ligase | 4,600 – 5,895 | 1955 | 89.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| BCCT family transporter | 244,046 – 245,755 | 2476 | 89.7 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Glycine dehydrogenase | 53,343 – 56,252 | 4525 | 91 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Phosphatase | | | | |
| PHP domain-containing protein | 14,601 – 15,656 | 1624 | 90.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |

ตารางที่ 3 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ ของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|-----------------|-------|--------------------|---------------------------------|
| Ppx/GppA family phosphatase | 47,967 - 48,995 | 1321 | 82.8 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Cold shock protein | | | | |
| Putative cold-shock DNA-binding protein | 42,151 - 42,357 | 377 | 100 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Chaperon protein | | | | |
| Chaperone protein DnaJ | 28,919 - 30,055 | 1907 | 96.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Heme chaperone HemW | 24545..25882 | 2136 | 92.6 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Chaperone protein DnaK | 36,103 - 37,974 | 2954 | 95.1 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Chaperone protein ClpB | 23,170 - 25,884 | 4223 | 94.6 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Antioxidant enzymes | | | | |
| N-acetylglutaminyl glutamine synthetase | 19,826 - 21,577 | 2595 | 86.5 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Superoxide dismutase | 60,696 - 61,322 | 1043 | 92.3 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Superoxide dismutase | 24,256 - 24,897 | 1031 | 91.8 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Superoxide dismutase | 60,696 - 61,322 | 1043 | 92.3 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Flagellar protein | | | | |
| Flagellar biosynthetic protein FliR | 97,375 - 98,226 | 793 | 60.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Flagellar biosynthetic protein | 98,512 - 99,258 | 877 | 74.6 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |

ตารางที่ 3 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ ของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T

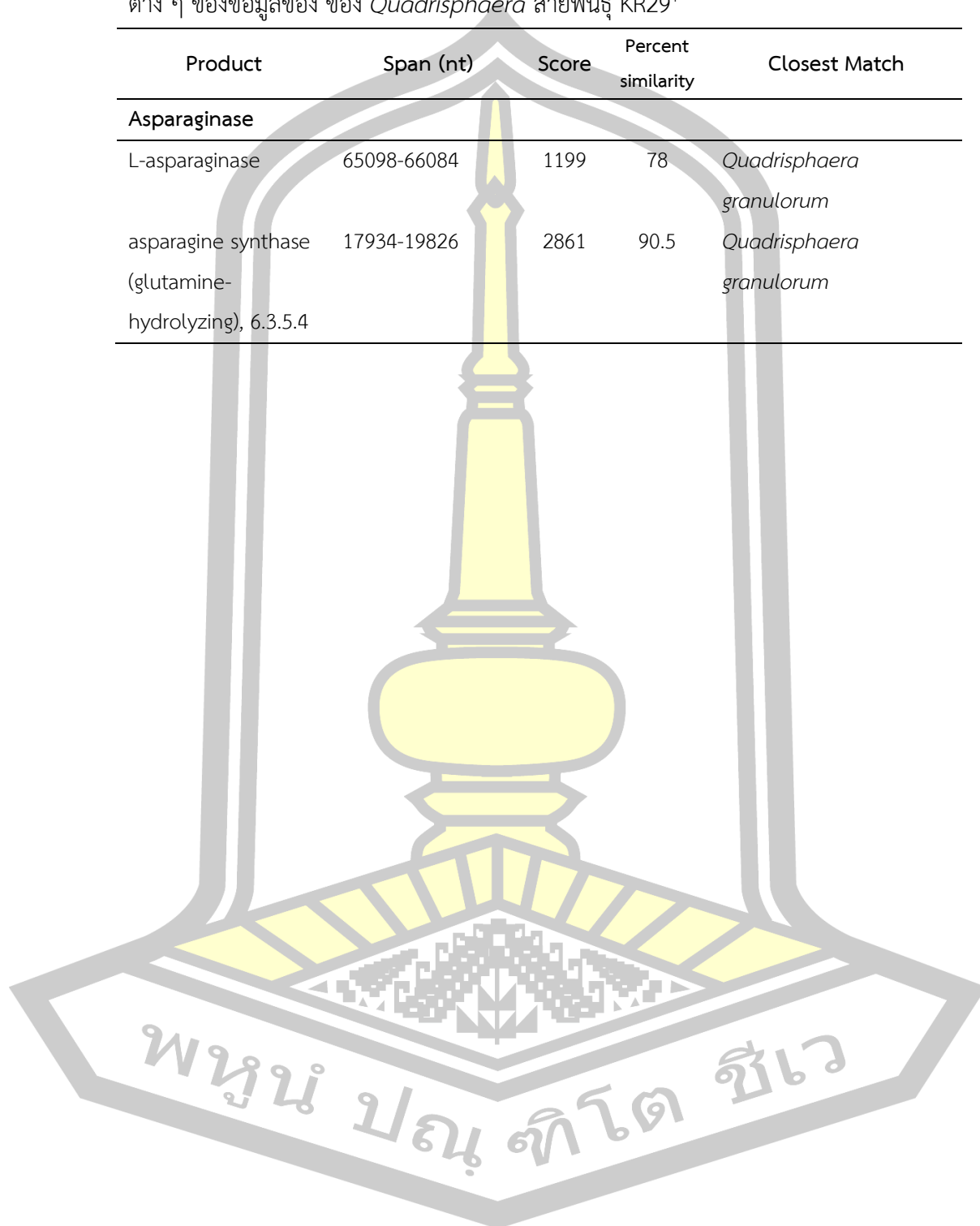
| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|---|-------------------|-------|--------------------|--------------------------------------|
| FliP | | | | |
| Flagellar motor switch protein FliM | 100,542 – 10,1441 | 857 | 58.2 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Flagellar hook protein FlgE | 104,306 - 105622 | 945 | 49.1 | <i>Sanguibacter gelidistatuariae</i> |
| Flagellar basal-body rod protein FlgC | 114,726 – 11,5145 | 473 | 68.7 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Flagellar basal body rod protein FlgB | 115,154 – 115,498 | 426 | 76.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Flagellar protein FliS | 117,270 - 117,686 | 348 | 56.8 | <i>Quadrisphaera sp. DSM 44207</i> |
| Flagellin | 119,151 – 119,978 | 887 | 68.4 | <i>Georgenia satyanarayanai</i> |
| Heat shock proteins | | | | |
| Hsp20/alpha crystallin family protein | 184,350 - 184,826 | 748 | 93.5 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Heat-inducible transcription repressor HrcA | 27,781 – 28,830 | 1593 | 95.1 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Helix-turn-helix transcriptional regulator | 33,872 - 34,339 | 658 | 88.6 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Protease | | | | |
| MarP family serine protease | 89,056 - 90,240 | 1803 | 90.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| M48 family metalloprotease | 12,698 – 13,696 | 1320 | 81 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| TldD/PmbA family protein | 6,869 – 8,437 | 2612 | 94.8 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Type 1 glutamine | 87,607 - 88,191 | 877 | 89.6 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |

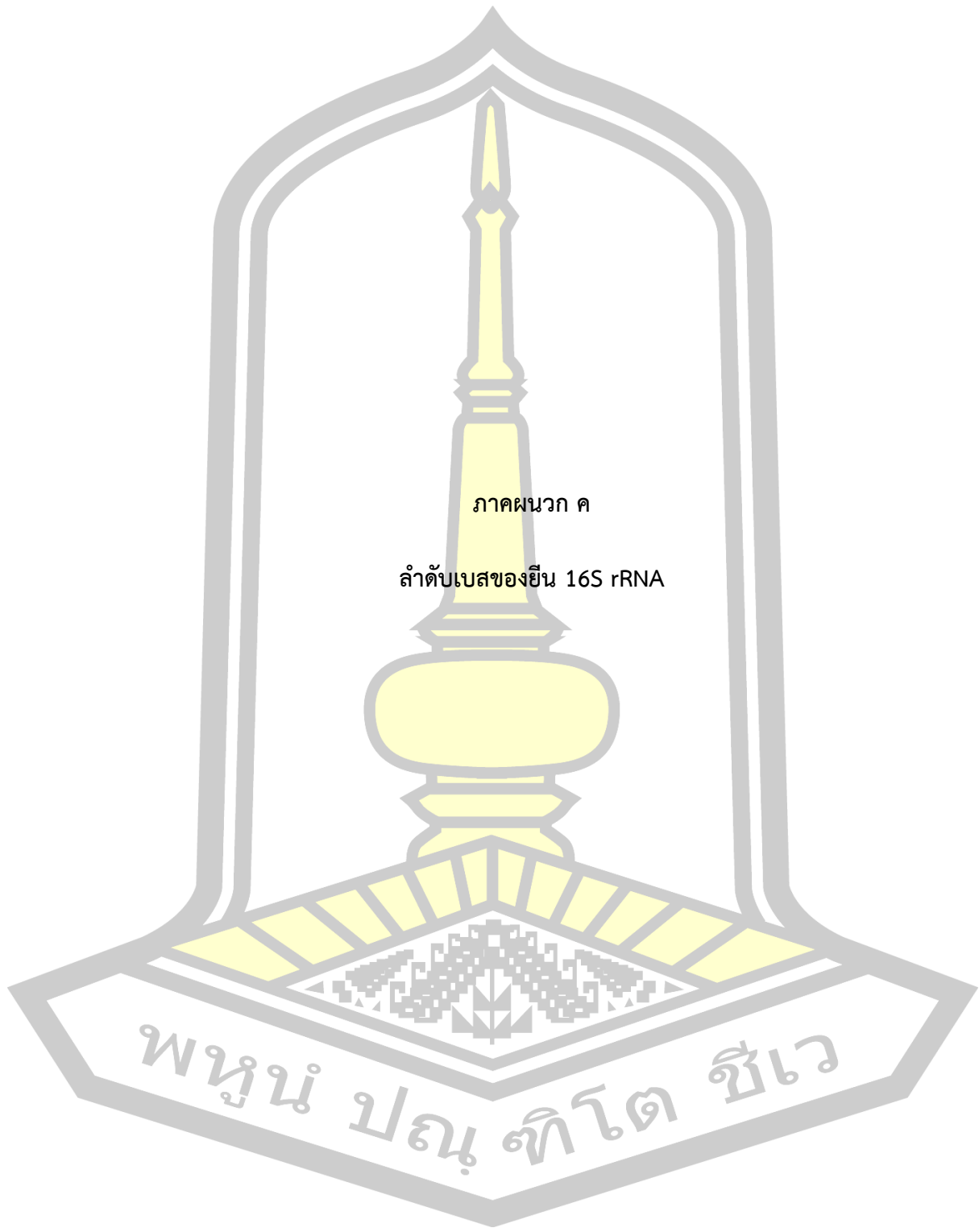
ตารางที่ 3 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ ของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|-------------------|-------|--------------------|---------------------------------|
| amidotransferase | | | | |
| Neutral metalloproteinase | 71,402 – 72,460 | 1657 | 91.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Rhomboid family intramembrane serine protease | 140,582 – 141,442 | 1301 | 84.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| M48 family metalloprotease | 220,909 – 221,922 | 1363 | 86.3 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Peptidase S16 | 202,705 – 203391 | 1082 | 91.7 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Amylase | | | | |
| Trehalose synthase | 18,156 – 19,811 | 2719 | 92.2 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Arabinose | | | | |
| Alpha-L-arabinofuranosidase | 110,448 – 112,031 | 2636 | 95.4 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| L-arabinose isomerase | 173,423 – 174,952 | 2565 | 96.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| Alpha-L-arabinofuranosidase | 110,448 – 112,031 | 2636 | 95.4 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| L-arabinose isomerase | 173,423 – 174,952 | 2565 | 96.9 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |
| EmbC-like arabinotransferase in arabinogalactan biosynthesis | 293,390 – 296,848 | 4371 | 76 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Riblofavin production | | | | |
| Riboflavin biosynthesis protein | 115,488 – 116,504 | 1531 | 87.8 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| Bioremediation | | | | |
| 2,3-butanediol dehydrogenase | 11,944 – 13,005 | 1769 | 95.8 | <i>Quadrisphaera setariae</i> |

ตารางที่ 3 การทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญให้กับพืช การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของข้อมูลของ ของ *Quadrisphaera* สายพันธุ์ KR29^T

| Product | Span (nt) | Score | Percent similarity | Closest Match |
|--|-------------|-------|--------------------|---------------------------------|
| Asparaginase | | | | |
| L-asparaginase | 65098-66084 | 1199 | 78 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |
| asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing), 6.3.5.4 | 17934-19826 | 2861 | 90.5 | <i>Quadrisphaera granulorum</i> |





ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว

1. กลุ่ม *Streptomyces*

1.1 ไอโซเลต MK1

AGTCGAACGATGAACCAGCCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
 ATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCGA
 GGCATCTCGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGG
 TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
 AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGG
 GAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTC
 GCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTT
 CGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG
 TGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
 GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTT
 GTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTG
 TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTTGCCCGTGTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACCGCCG
 GGGTCAACTCGGAAGAAGGTGGGGACAACGTCAAGTCATCATGCCCTT

1.2 ไอโซเลต MK3

TCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGTATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT
 GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGAGCTACTTGGGCA
 TCCAAGTGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAG
 GTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCC
 TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAG
 AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGT
 CGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGT
 AGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC

GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCC
 GTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACCTTCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACA
 GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGG
 TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCC

1.3 ไอโซเลท MK9

CCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
 GACAAGCCCTGGAAACGGGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCGAGGCATCTCGGCGGGTTCGA
 AAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCA
 AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGC
 CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACG
 GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCGGTTGTGAAAGCC
 CGGGGCTTAACCCCGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAA
 TTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCT
 GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAAC
 GCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGA
 CATAACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGT
 TTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG
 GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTT

1.4 ไอโซเลท MK12

TCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG
 CCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATAACCGGATACTGATCCTCGCAGGCAT
 CTGCGAGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT
 GATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTC
 GGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA
 GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG
 AAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCG
 TGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCTGGAGACAGGTCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGG
 TGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAAC
 CCTTGTCCCCTGTTGCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGACTCACGGGA

1.5 ไอโซเลท MK20

CCTTCGGGTGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGG
 GACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATAACCGGATACTGACCTGCCGAGGCATCTCGGCGGGTTCGA
 AAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCA
 AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGC
 CGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACG
 GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTTCGGTTGTGAAAGCC
 CGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAA
 TTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCT
 GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAAC

GCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
 CATAACCCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTCTGTA

1.6 ไอโซเลท MK32

GCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 TCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCATCTTGGG
 CATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG
 CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA
 AGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCG
 GTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCG
 GTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
 TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGT
 CCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
 AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAAGGCTTGACATAACCCGAAAGCATTAGAGATAGTGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGG
 GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTT

1.7 ไอโซเลท RD2

ATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCGCTTG
 GGCATCCAAGCGGTTGAAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGG
 TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAA
 AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGG
 GAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGT

CACGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGT
 TCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
 GTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACG
 TCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTGC
 GTGTACAGGTGGGTGCATGGCCTGTCGTCAGCTCGTGTTTCGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCC
 GCAACG

1.8 ไอโซเลท RD3

CGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGA
 CCTGCCGAGGCATCTCGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCA
 GCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
 TTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
 CGGCTTGTGCGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAG
 GCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAG
 GAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
 AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAAC
 ATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GCTAAAACTCAGAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGAC
 GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAAGCATCAAAGATGGTGCCCCCT
 TGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACGG
 GAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGCCCTTATGTC
 TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAAT
 CTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCT
 AGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTAC
 GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC

1.9 ไอโซเลท RD12

GAACCGCTTTCGGGCGGGATTAGTGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCA
 CTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTCACTGCCTTGGGCATCCTTGGT
 GGTGAAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC
 TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGA
 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG
 CGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTG
 AAAGCCCAGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA
 TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
 ATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCACTAGGTGTGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCA
 GCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATACACCGGAAACGGTCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
 CCCGTGTTGCCAGCAAGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTC
 GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTG

1.10 ไอโซเลท RD14

CTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCTCGCAGGCATCTGCGAG
 GTTCGAAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGC
 TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAA
 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG
 CGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTG
 AAAGCCCAGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA
 TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
 ATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT

GGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCA
 GCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATACACCGGAAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
 CCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCG
 GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA
 ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTT
 CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTG
 CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTC

1.11 ไอโซเลท RD28

GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCC
 TCGCAGGCATCTGCGAGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTA
 GTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
 GCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCA
 GCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG
 CTTGTCACGTCCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCT
 AGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
 CACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
 GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATT
 CCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
 AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAA
 CGGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATACACCGGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTG
 GTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGA
 GACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTT
 GGGCTGCACCGTGCTACATGGCCGGTACAATGAGCTGGAAA

1.12 ไอโซเลท RD31

CGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTG
 CACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCATCTTGGGCATCCTTGAT
 GGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGA
 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG
 CGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGTGCGGTCGGTTGTG
 AAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA
 TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
 ATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCA
 GCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCA
 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
 CCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGG
 AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA
 TGCCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTC
 GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGC
 TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACC
 CGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG



2. กลุ่ม Non- *Streptomyces*

2.1 ไอโซเลต KR2

TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGG
 GACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCC
 GGAAACCGGGCTAATACCGGATAGGACTTCTGGCCGCATGGCTGGGGGTGGAAAGTTTTTCG
 GCCTGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACG
 GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGA
 AGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGG
 ATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTGCACCGTGAAAACCTTGGGGCTCAA
 CCCCAGCCTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATAC
 TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
 AACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCGCTCTCCGGTTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCG

2.2 ไอโซเลต KR9

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT
 ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGG
 GAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCG
 TTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGG
 GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAA
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTA
 TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
 GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGG
 TGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACG
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGT
 TGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCG
 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
 AGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACAC

TCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTT
 CGGGGTGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 AAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCG
 ATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGA
 CCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAC
 TTGTGGGGGGGAGCGGTCTGAAGGTGGGGCTGG

2.3 ไอโซเลท RD6

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT
 ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGG
 GAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGG
 TTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGACGACGG
 GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTGAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAA
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTA
 TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
 GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGG
 TGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACG
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGT
 TGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGC
 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
 AGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACAC
 TCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTT
 TGGGGTGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 AAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCG
 ATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGA
 CCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG

CCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAC
TTGTGGGGGGAGCGGTCTGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGG

2.4 ไอโซเลท RD19

AAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGC
TTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCACCGGCCGCATGGCTGGTGG
TGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCG
CGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGTGCAGTGTGAA
AACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACT
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGT
CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGC
TAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGT
TTGACATGGCCGAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCTTCGGGGCGGTACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCG
ATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTAC
AATGGGCTGCGATAACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGT
CTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCG

พูน ปณ ทิโต ชีเว

ประวัติผู้เขียน

| | |
|----------------------|--|
| ชื่อ | สุดารัตน์ สุขพเนา |
| วันเกิด | 3 ธันวาคม พ.ศ.2541 |
| สถานที่เกิด | อ.พิมาย จ.นครราชสีมา |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | 718 หอพักทิพย์รัตน์ หมู่ที่ 1 ต.ท่าขอนยาง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม |
| ตำแหน่งหน้าที่การงาน | - |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| ประวัติการศึกษา | พ.ศ. 2564 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2567 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| ทุนวิจัย | ทุนนักวิจัยหลังปริญญาตรี (Postgraduate) ประจำปี 2565 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| ผลงานวิจัย | Kaewkla, O., Sukpanoa, S., Suriyachadkun, C., Chamroensaksi, N., Chumroenphat, T., & Franco, C. M. M. (2022). <i>Streptomyces spinosus</i> sp. nov. and <i>Streptomyces shenzhenensis</i> subsp. <i>oryzicola</i> subsp. nov. endophytic actinobacteria isolated from Jasmine rice and their genome mining for potential as antibiotic producers and plant growth promoters. <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 115(7), 871-888. Kaewkla, O., Perkins, M., Thamchaipenet, A., Saijuntha, W., Sukpanoa, S., Suriyachadkun, C., ... & Franco, C. M. M. (2024). Description of <i>Streptomyces naphthomycinicus</i> sp. nov., an endophytic actinobacterium producing naphthomycin A and its genome insight for discovering bioactive compounds. <i>Frontiers in Microbiology</i> , 15, 1353511. Sukpanoa, S., Kaewkla, O., Suriyachadkun, C., Papayrata, C., Klankeo, P., & Franco, C. M. M. (2024). <i>Streptomyces mahasarakhamensis</i> sp. nov., an Endophytic Actinobacterium |

Isolated from Jasmine Rice and its Potential as plant Growth Promoter. *Current Microbiology*, 81(8), 223.

