บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมต้นแม่พันธุ์ส้มทรอยเยอร์ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการเพาะเมล็ดส้มทรอยเยอร์ในอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประมาณ 2 สัปดาห์ เมล็ดจะเริ่มงอกเป็นต้นกล้าขนาดเล็ก จำนวน 3-4 ต้นต่อ เมล็ด หลังจากนั้นประมาณ 3 เดือน ต้นกล้าจะมีความสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร มีลำต้นและใบมีสีเขียว เงา เป็นมัน ใบมีใบประกอบ 3 ใบ (trifoliate) มีใบใหญ่ 1 ใบ และใบเล็ก 2 ใบ โดยแต่ละใบจะออกจากจุดเดียวกัน ก้านใบมีปีก (wing) แคบๆ และมีหนามในซอกใบ รากมีสีขาวอมน้ำตาลขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับลำต้น และมีความยาวโผล่พ้นผิวหน้าอาหาร (ภาพ 2) จากการทดลองนี้จึงได้ใช้ส่วนของลำต้นและราก สำหรับการทดลองต่อไปเพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้าให้ได้จำนวนมากขึ้น

ภาพ 3 ลักษณะต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ (Citrange Troyer) ที่ได้จากการเพาะเมล็ด

ก. ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ที่งอกจากเมล็ดมีจำนวน 3-4 ต้น และรากสีขาวอมน้ำตาลขนาดใหญ่ อายุ 3 เดือน

ข. ลักษณะใบสีเขียวเข้ม เงาเป็นมัน ใบมีใบประกอบ 3 ใบ ของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ อายุ 4 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

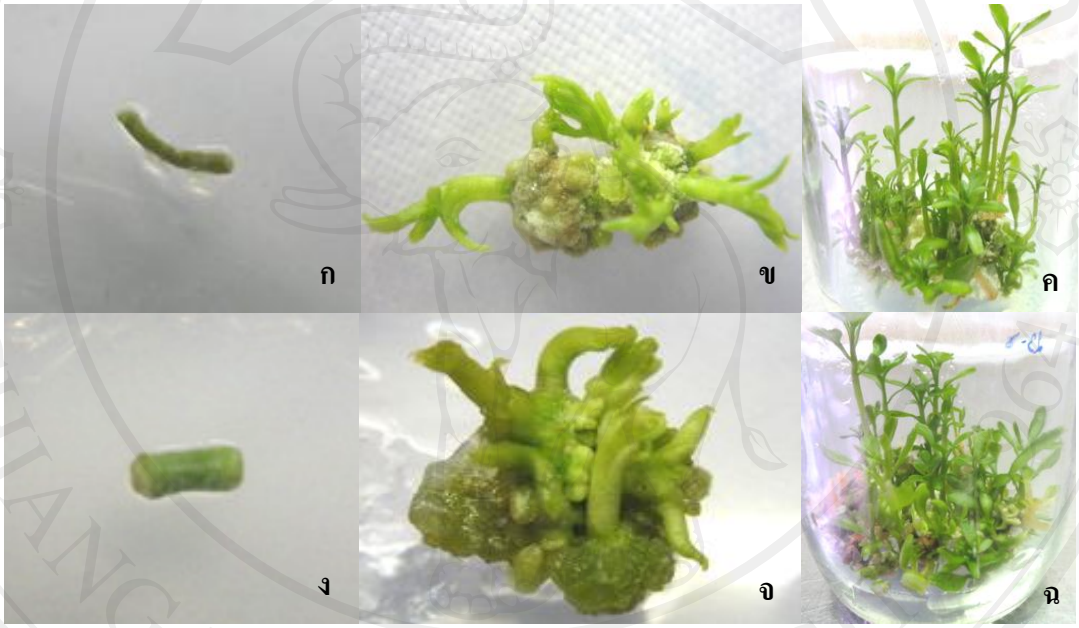
2. การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอด

จากการทดลองเพิ่มปริมาณยอดส้มทรอยเยอร์ในอาหารสังเคราะห์ MS โดยใช้อาหารแข็งดัดแปลงฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 สูตร ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นสีเขียวเข้มและรากที่มีขนาดใหญ่สีขาวอมน้ำตาล ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 1 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนของพืชทั้ง 2 กลุ่มบนผิวหน้าอาหารในแต่ละสูตรเป็นเวลา 30 วัน ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS3 เติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำรากและลำต้นให้เกิดยอดมากที่สุด เฉลี่ย 11.7 และ 7.5 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารสังเคราะห์สูตร MS2 เติม BAP 1 mg/l ร่วมกับ Kinetin 1 mg/l และ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำรากและลำต้นให้เกิดยอดเฉลี่ย 7 และ 5.6 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตาราง1) โดย พบการบวมและขยายขนาดขึ้นของชิ้นพืชที่ใช้ทดสอบ และมีการเกิดยอดสีเขียวอ่อนอมเหลืองขนาดเล็ก 0.1-1 เซนติเมตร อัดตัวกันแน่นบริเวณรอยตัดที่มีสีเขียวปนน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับของ Maria *et al.* (2011) รายงานว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงส่วน epicotyls ของต้นตอส้ม Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. บนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บริเวณที่เป็นรอยตัดบนชิ้นพืชมียอดขนาดเล็กเกิดขึ้น หลังจากนั้น ประมาณ 60 วัน ยอดขนาดเล็กสามารถเจริญเป็นต้นกล้าขนาดเล็กสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบ ประมาณ 5-6 ใบ ลำต้นตั้งตรง ใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มขึ้น (ภาพ 3) จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่า การใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน ที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำสามารถชักนำเนื้อเยื่อส่วนรากและลำต้นให้เกิดยอดจำนวนมากได้ แตกต่างจากรายงานของ Da Silva *et al*. (2010) ซึ่งได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ epicotyls และ internode ของ sour orange (*Citrus auantium* L.) บนอาหาร MT (Murashige and Tucker, 1969) ที่เติม BAP 1 mg/l และ NAA 0.3 mg/l พบว่าสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อ epicotyls และ internode ให้เกิดยอดได้ดีที่สุดเท่ากับ 1.8 และ 2 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และรายงานของ Tallon *et al.* (2012) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นตอส้ม จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ alemow (*Citrus macrophylla*) ส้มซ่า (*Citrus aurantium*) และคลีโอพัตรา (*Citrus reshni*) โดยใช้อาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ adinine (AD) พบว่า ส้มคลีโอพัตรา และส้มซ่า ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 2 mg/l เป็นเวลา 60 วันสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อส่วนยอดเกิดยอดได้ดีที่สุด เท่ากับ 1.76 และ 1.25 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ จากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน และ ออกซิน มีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการ organogenesis และ embryogenesis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่ม มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะส่วนต่างๆ ของเซลล์พืช (Francesco and De Pasquale, 2003) เมื่อสัดส่วนของฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินมีสูงกว่ากลุ่มออกซิน มีผลส่งเสริมให้เซลล์พืชเกิดเป็นตายอดขึ้น (Buchanan *et al.*, 2000)

ดังนั้นสูตรอาหาร MS3 ที่ได้จากการทดลองนี้น่าจะนำมาใช้ในการผลิตและเพิ่มปริมาณต้นตอส้มทรอยเยอร์อย่างรวดเร็วได้ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ต้นตอส้มทรอยเยอร์และยังเป็นการผลิตต้นต้อส้มปลอดโรคได้อีกทางหนึ่งด้วย



ภาพ 4 การพัฒนาของยอดส้มทรอยเยอร์ที่ถูกชักนำด้วยการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นและรากในอาหารสังเคราะห์สูตร MS3

ก. ส่วนรากส้มทรอยเยอร์บนอาหาร MS ในชุดควบคุม
ข. ยอดที่เกิดจากการชักนำส่วนราก บนอาหาร MS อายุ 30 วัน
ค. ต้นกล้าที่เกิดจากการชักนำส่วนราก บนอาหาร MS3 อายุ 60วัน
ง. ส่วนลำต้นบนอาหาร MS ในชุดควบคุม
จ. ยอดที่เกิดจากการชักนำส่วนลำต้น บนอาหาร MS3 อายุ 30 วัน
ฉ. ต้นกล้าที่เกิดจากการชักนำส่วนลำต้น บนอาหาร MS3 อายุ 60 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของส้มทรอยเยอร์ เป็นเวลา 30 วัน

	กรรมวิธี			จำนวนยอดต่อชิ้นพืช[1]	
	NAA (ppm)	BAP (ppm)	Kinetin (ppm)	ลำต้น	ราก
MS (ชุดควบคุม)	-	-	-	0^{c}	0^{c}
MS1	0.1	1.5	1.5	0^{c}	0^{c}
MS2	0.1	1.0	1.0	5.6^{a} [2]	7.0^{b}
MS3	0.1	2.0	-	7.5^{a}	11.7^{a}
MS4	0.1	-	2.0	0^{c}	0^{c}

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง (column) เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาอาการและการแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

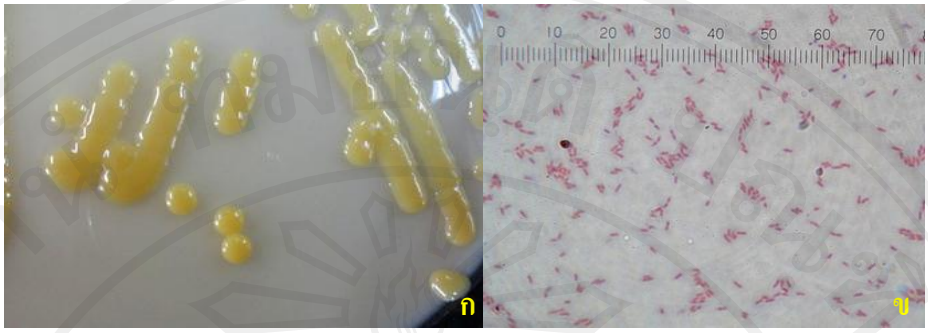
จากการเก็บตัวอย่างใบมะกรูดจากต้นที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์อย่างรุนแรง มาศึกษาลักษณะอาการของโรค โดยสังเกตจาก การเปลี่ยนแปลงของใบ ความผิดปกติ และการเกิดแผล ทั้งบนใบและใต้ใบ พบว่า บริเวณใบมีอาการใบจุดสีน้ำตาลอ่อนอมเหลืองแผลนูน ขอบแผลมีสีเหลือง ฉ่ำน้ำ เมื่อพลิกดูใต้ใบจะพบแผลนูนเป็นสะเก็ดแข็ง มีทั้งสีน้ำตาลอมเหลืองและสีเทาขอบแผลฉ่ำน้ำ เช่นเดียวกับด้านบนใบ (ภาพ 4) สอดคล้องกับรายงานของ Koizumi, 1985 และ Goto, 1992 ซึ่งกล่าวว่า ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์จะเริ่มแสดงให้เห็นเป็นแผลคล้ายกับตุ่มขนาดเล็กบนใบ เมื่อแผลมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นเหลือง สีน้ำตาล ขอบแผลฉ่ำน้ำ ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเป็นสะเก็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 5 ลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ บนใบมะกรูดที่เก็บจากจากอำเภอ ขุนตาล จังหวัดเชียงราย มีอาการใบจุดสีน้ำตาลอมเหลือง แผลเป็นสะเก็ดแห้ง ขอบแผล เหลืองฉ่ำน้ำ

และจากการแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์จากแผลโรคและแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร NA มาขีดลงบนอาหาร YDC ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น selective medium และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า โคโลนีมีสีเหลืองเข้ม เหนียว เป็นเงามัน กลมมน มีขอบเรียบ และเมื่อนำไปตรวจแกรมแบคทีเรียด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) พร้อมทั้งย้อมสีแกรมเพื่อตรวจดูลักษณะและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน (rod shape) หัว-ท้ายมน (ภาพ 5) สอดคล้องกับรายงานของ Chand and Pal, 1982 และ Goto, 1992 ที่รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod-shape) ลักษณะของโคโลนี มักมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีการสร้างรงควัตถุสีเหลือง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส โคโลนีจะมีสีเหลืองเข้ม เป็นมันเงา และเหนียว เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 ลักษณะโคโลนี และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากใบมะกรูด และเลี้ยงบนอาหาร YDC อายุ 7 วัน

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ สีเหลืองเข้ม เหนียว เป็นเงามัน กลมมนขอบเรียบ

ข. ลักษณะเซลล์ของเชื้อเป็นท่อน หัว-ท้ายมน (rod-shape) ติดสีแดง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

4.1 การทดสอบในสภาพปลอดเชื้อ

จากการนำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาล้างอาหารวุ้นออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จำนวน 20 ต้น และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค กลุ่มที่ 1 ทำแผลที่ใบ และกลุ่มที่ 2 ไม่ทำแผล จำนวนกลุ่มละ 10 ต้น ที่ปลูกเชื้อโดยการจุ่มต้นกล้าส้มลงในเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ เป็นเวลา 5 นาที แล้วสังเกตลักษณะของต้นกล้าที่เกิดโรค อาการ ผิดปกติของต้นกล้า ตลอดจนระยะเวลาของการเกิดโรค พบว่า ใบและลำต้นของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ที่นำมาทดสอบ เริ่มแสดงอาการของโรคแคงเกอร์หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยลักษณะของแผลที่เกิดขึ้นกับต้นกล้า กลุ่มที่ 1 นั้นบริเวณใต้ใบที่ทำแผล และลำต้นเริ่มเกิดแผลที่มีสะเก็ดสีเขียวอ่อนนูนขึ้น จากนั้นแผลจะกลายเป็นสีเหลืองมีขนาดของแผลใหญ่ขึ้นและเริ่มแห้ง ขอบแผลมีสีเหลืองอ่อน ฉ่ำน้ำ (ภาพ 6) ส่วนกลุ่มที่ 2 บริเวณใต้ใบและลำต้นเกิดแผลขนาดเล็กเป็นสะเก็ดนูน มีสีเขียวอ่อน เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่อาการของโรคและรอยแผลของกลุ่มที่ 1 จะมีความรุนแรงและมีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มที่ 2 เนื่องจากการทำแผลเป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์สามารถเข้าไปในเซลล์พืชได้ง่ายและมีการเพิ่มปริมาณของเชื้ออย่างรวดเร็ว (อำไพวรรณ และคณะ, 2542; Goto, 1992)

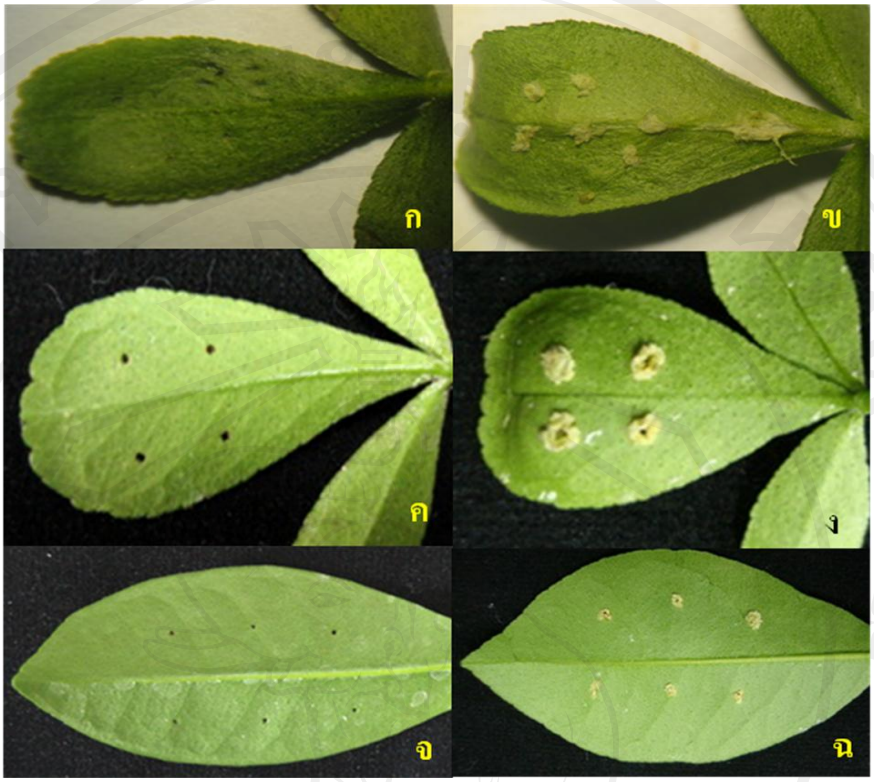
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบในสภาพโรงเรือน

จากการนำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตราอายุประมาณ 6 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน มาทดสอบความสามารถในการก่อโรค โดยปลูกเชื้อด้วยวิธีฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย และจุ่มต้นกล้าลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ พบว่า ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตรา เริ่มแสดงการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ เป็นเวลา 15 วัน โดยลักษณะของแผลที่เกิดขึ้นกับต้นกล้า กลุ่มที่ 1 ทั้งวิธีฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อ และการจุ่มต้นกล้าลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ นั้นมีการเกิดแผลบริเวณใต้ใบที่ทำแผลและลำต้น แผลมีลักษณะเป็นสะเก็ดสีเขียวอ่อน นูนขึ้น จากนั้นแผลเปลี่ยนเป็นสีเหลืองมีขนาดของแผลใหญ่ขึ้นและเริ่มแห้ง ขอบแผลมีสีเหลืองอ่อน ฉ่ำน้ำ (ภาพ 6) ส่วนกลุ่มที่ 2 ที่บริเวณใต้ใบและลำต้นมีการเกิดแผลขนาดเล็กเป็นสะเก็ดนูนสีเขียวอ่อนขึ้นที่บริเวณใต้ใบ และลำต้นเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เกิดแผลและแสดงอาการของโรคน้อยกว่ากลุ่มที่ 1 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Verniere *et al*. (1998) ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคใน Maxican lime โดยการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และพบการแสดงออกของโรค คือ เกิดแผลสีเหลืองนูนขึ้น ลักษณะคล้ายกับแคลลัส มีขอบแผลฉ่ำน้ำเช่นกัน

จากการสังเกตพบว่า ในสภาพปลอดเชื้อ หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตราแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ได้เร็วกว่า ต้นกล้าที่ถูกปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน ทั้งนี้อาจเป็นเพาะว่าภายใต้สภาพปลอดเชื้อมีการควบคุมสภาพแวดล้อม ความชื้น หรืออุณหภูมิเหมาะสมต่อการเกิดโรคและการเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรค (Koizumi, 1985)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 ลักษณะแผลใบจุดเป็นสะเก็ดของส้มทรอยเยอร์ และส้มคลีโอพัตรา หลังจากปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค

ก. ใบส้มทรอยเยอร์ปกติถูกทำแผลที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อในสภาพปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

ข. ใบส้มทรอยเยอร์ถูกทำแผลที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์หลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วันในสภาพปลอดเชื้อ

ค. ใบส้มทรอยเยอร์ปกติถูกทำแผลที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน (ชุดควบคุม)

ง. ใบส้มทรอยเยอร์ถูกทำแผลที่แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 15 วัน ในสภาพโรงเรือน

จ. ใบส้มคลีโอพัตราปกติถูกทำแผลที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน (ชุดควบคุม)

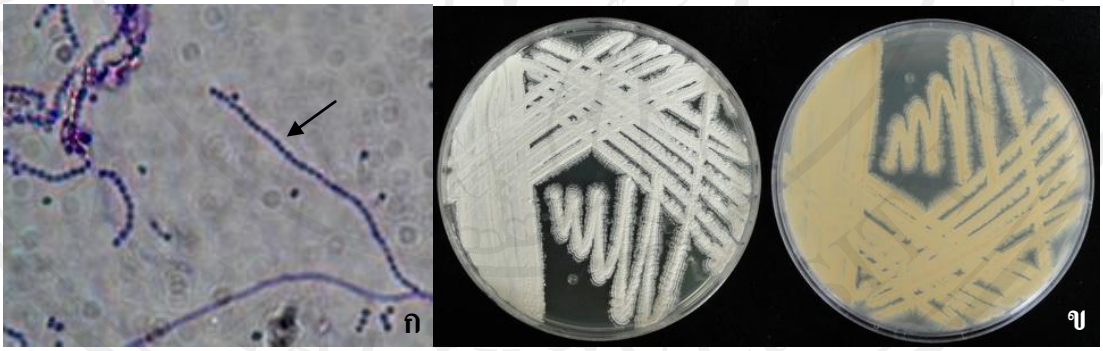
ฉ. ใบส้มคลีโอพัตราถูกทำแผลที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์หลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 15 วันในสภาพโรงเรือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ จากมะขวิด และมะสัง บนอาหาร IMA-2 และบ่มไว้ที่มีดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน พบโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวครีมเจริญออกมาจากบริเวณรอยตัดและผิวหน้าของชิ้นพืช และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยให้เชื้อเจริญผ่านแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter) ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท แยกได้จากมะขวิด 3 ไอโซเลท คือ LIM1, LIM2 และLIM4 แยกได้จากมะสัง 1 ไอโซเลท คือ FER1 ซึ่งแต่ละไอโซเลทมีลักษณะดังนี้

ไอโซเลท LIM1 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ISP-2 มีสี yellowish white (393) เจริญสม่ำเสมอตามแนวขีด (streak) ลักษณะคล้ายผงแป้ง สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สี pale greenish yellow (129) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและโค้งเล็กน้อย ลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นแบบ Rectiflexibiles type (ภาพ7)



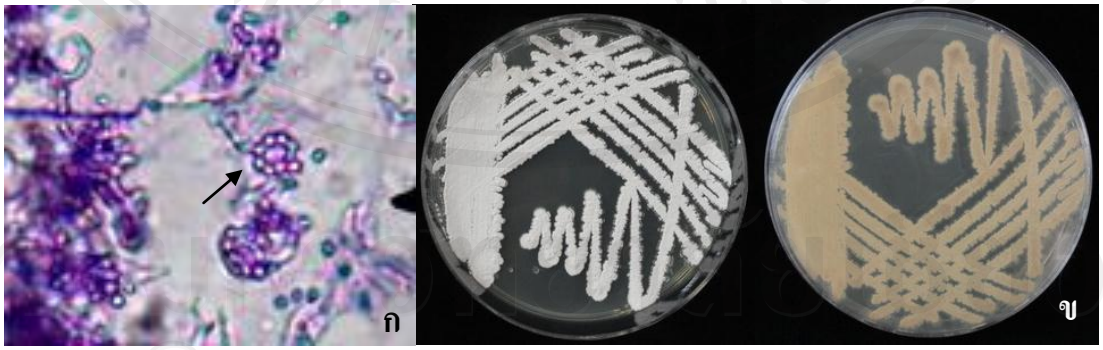
ภาพ 8 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ของเชื้อไอโซเลท LIM1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) และลักษณะด้านหน้า (ข ซ้าย) และด้านหลัง (ข ขวา) ของโคโลนีบนอาหาร ISP-2 อายุ 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอโซเลท LIM2 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ISP-2 มีสี beige white (392) เจริญสม่ำเสมอตามแนวขีด ลักษณะคล้ายผงแป้ง สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สี yellowish brown (101) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่ เส้นสายของสปอร์บิดเป็นเกลียว แบบ Spira type (ภาพ8)

ภาพ 9 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบ Spira type ของเชื้อไอโซเลท LIM2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และลักษณะด้านหน้า (ข ซ้าย) และด้านหลัง (ข ขวา) ของโคโลนีบนอาหาร ISP-2 อายุ 7 วัน

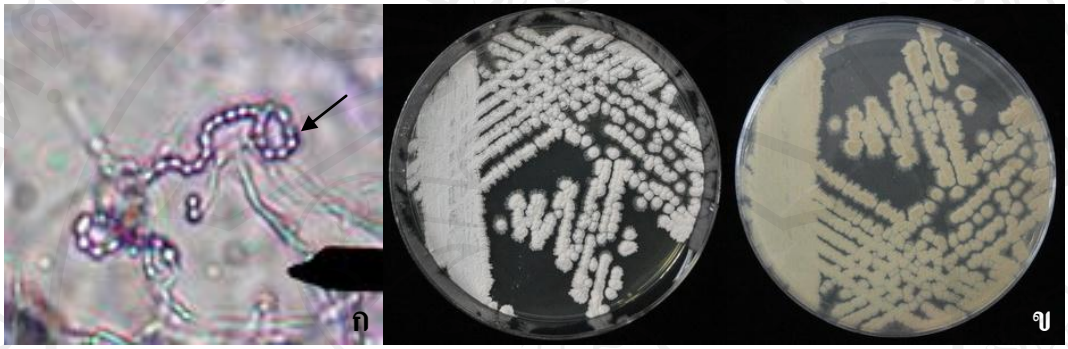
ไอโซเลท LIM4 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ISP-2 มีสี yellowish white (393) เจริญตามแนวขีด (streak) ลักษณะคล้ายผงแป้ง สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สี light reddish yellow (131) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่ เส้นสายของสปอร์บิดเป็นเกลียว แบบ Spira type (ภาพ9)



ภาพ 10 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบ Spira type ของเชื้อไอโซเลท LIM4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และลักษณะด้านหน้า (ข ซ้าย) และด้านหลัง (ข ขวา) ของโคโลนีบนอาหาร ISP-2 อายุ 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอโซเลท FER1 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ISP-2 มีสี yellowish white (393) เจริญสม่ำเสมอตามแนวขีด (streak) ลักษณะคล้ายผงแป้ง สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สี pale yellow (128) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่ เส้นสายของสปอร์บิดเป็นเกลียว แบบ Spira type (ภาพ10)



ภาพ 11 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบ Spira type ของเชื้อไอโซเลท FER1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และลักษณะด้านหน้า (ข ซ้าย) และด้านหลัง (ข ขวา) ของโคโลนีบนอาหาร ISP-2 อายุ 7 วัน

จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนไอโซเลทน้อย ซึ่งจากรายงานของ Sardi *et al.* (1992) และ Okazaki *et al.* (1995) ได้กล่าวว่า ความหลากหลายของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืช ชนิดและปริมาณของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่พบในพืชนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แหล่งที่ปลูกพืช รวมทั้งปัจจัยทางสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศ นอกจากนี้ขั้นตอนและวิธีการแยกเชื้อยังส่งผลต่อ สกุล (genera) และจำนวนของเชื้อที่แยกได้ (Sheng *et al.,* 2011)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

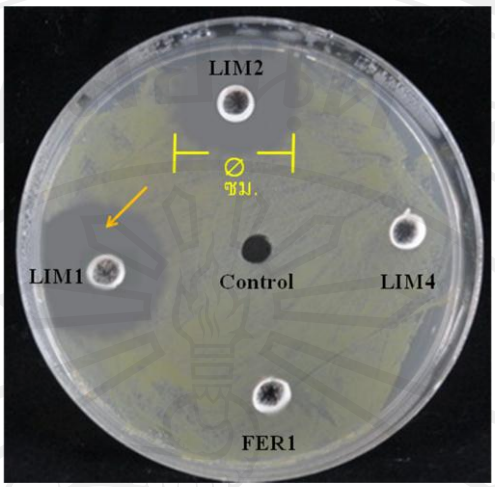
จากการนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้งหมด 4 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยวิธี well diffusion พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ได้ดีที่สุดและให้ผลการวัดบริเวณยับยั้ง (clear zone) มากที่สุด คือ 2.4 เซนติเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท LIM2 โดยให้ผลการวัดบริเวณยับยั้งได้ที่ 1.6 เซนติเมตร ซึ่งทั้งสองไอโซเลทแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIM4 และ FER1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ได้ (ภาพ 11, ตาราง 2) ผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Li *et al.* (2012) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อส่วนใบ ลำต้น และราก ของต้น anthurium โดยแยกได้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้งหมด 7 ไอโซเลท แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของ anthurium ด้วยวิธี paper discs พบว่า เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* B014 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ โดยให้ผลการวัดบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 3.6 เซนติเมตร จากการทดลองครั้งนี้จะสังเกตได้ว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 มีผลต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ซึ่งน่าจะมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ทั้ง 2 ไอโซเลท อาจจะสร้างสารทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะ ตามรายงานของ Jonete *et al.* (2000) ที่แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากใบและรากของข้าวโพด โดยได้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ จากใบจำนวน 31 ไอโซเลท และจากราก 22 ไอโซเลท พบว่า 43.4% ของเชื้อทั้งหมดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต้านทานเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่นำมาทดสอบ นอกจากการควบคุมโรคแคงเกอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพแล้วยังมีการทดสอบสารเคมีเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ซึ่งจากรายงานของ Shahbaz *et al.* (2007) ได้ทดสอบสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ในส้มkinnow *(Citrus reticulate*) จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ Agrimycin-100 Cupravit Bavistin Dithane M-45 Vitavax Daconil Antracol Benlate Nimrod และ Afugan ที่ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1% โดยใช้วิธี filter paper discs พบว่า Agrimycin-100 Cupravit Bavistin Dithane M-45 และ Vitavax สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas camprestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ โดยให้ผลการวัดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.89, 2.46, 2.35, 2.0 และ 1.8 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบในสภาพแปลง พบว่า หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุ 50 วัน แล้วฉีดพ่น Agrimycin-100, Cupravit, Bavistin, Dithane M-45 และ Vitavax สามารถลดอาการและการเกิดโรค โดยมีดัชนีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เท่ากับ 3.03, 3.37, 3.60, 3.87 และ 4.2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีดัชนีการเข้าทำลายเท่ากับ 4.83

จากการทดลองข้างต้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 เพื่อศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ในสภาพปลอดเชื้อ และความสามารถในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ทั้งในสภาพปลอดเชื้อและสภาพโรงเรือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 ลักษณะการเกิดบริเวณ ยับยั้งการเจริญ (clear zone) (ศรชี้) ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* โดยการเลี้ยงร่วมกับน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ด้วยวิธี well diffusion เป็นเวลา 3 วัน

ตาราง 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลท โดยวิธี well diffusion

ไอโซเลท	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (cm)[1]**
LIM1	2.4[a 2]
LIM2	1.6[b]
LIM4	0
FER1	0
$LSD_{0.05}$	0.15
CV (%)	21.11

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง (column) เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคของต้นกล้าส้มในสภาพปลอดเชื้อ

จากการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 ที่มีประสิทธิภาพในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยหยดสารแขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MS ที่เพาะเลี้ยงต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน แล้วปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เพื่อทดสอบต้านทานของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์โดยจุ่มเฉพาะส่วนลำต้นและใบลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค แล้วย้ายต้นกล้าปลูกลงในขวดแก้วที่มี vermiculite ผสมอาหารเหลว MS ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 7 วัน ต้นกล้าส้มแสดงอาการของโรคที่หลายระดับ (ภาพ 13) โดยต้นกล้าส้มในชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว เชื้อสาเหตุโรคสามารถเจริญ และเข้าทำลายต้นกล้า ส่งผลให้ต้นกล้าส้มแสดงระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 4 ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนที่แสดงอาการโรค 66.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นกล้าส้มที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 ก่อน เป็นเวลา 30 วัน แล้วจึงปลูกเชื้อสาเหตุโรค แสดงลักษณะการต้านทานโรคได้ดีที่สุดโดยต้นกล้าแสดงระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 1 ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนที่แสดงอาการโรค 50 และ 38.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 ยังสามารถป้องกันไม่ให้ต้นกล้าส้มเกิดโรคและตายได้ที่ 5.6 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 13 การเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 บนผิวหน้าอาหารMS (ก) หลังการหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อเป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)

จากการทดลอง พบการเจริญของเชื้อมีลักษณะเป็นโคโลนีที่มีผงแป้งสีขาวครีม บนผิวหน้าอาหาร MS หลังจากหยดสารแขวนลอยของเชื้อประมาณ 10 วัน (ภาพ 12) ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์มีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรค หลังจากที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ คือ ในต้นกล้าที่อ่อนแอต่อโรค พบอาการใบจุดเป็นแผลสะเก็ดนูน ขนาดเล็กร่วมกับขนาดใหญ่ มีสีเขียวอ่อน ขอบแผลมีสีเหลืองฉ่ำน้ำ แผลจะลุกลามเพิ่มจำนวนและขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีอาการใบร่วงและต้นกล้าจะตายในที่สุด ส่วนในต้นกล้าที่แสดงความต้านทานต่อโรคจะพบอาการใบจุด เป็นแผลสะเก็ดนูนขนาดเล็กสีเขียวอมเหลือง แผลเป็นสะเก็ดและขอบแผลมีลักษณะเป็นขุยแห้ง ไม่ลุกลาม หรือขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากพืชเกิดการตอบสนองต่อตัวเชื้อ หรือสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้น ซึ่งชักนำให้เกิด phytoalexins ในเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชเกิดกระบวนการป้องกันตัวเองต่อเชื้อสาเหตุ โดยความต้านทานที่เกิดขึ้นอาจเกิดแบบ local resistance ซึ่งจะทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการตาย และเกิดการสะสมของสาร phytoalexins ขึ้น เป็นผลจากระดับความต้านทานที่มีอยู่ในพืชนั้นๆ หรือ แบบ systemic resistance ซึ่งจะไม่พบการตายของเนื้อเยื่อและมีการสะสมของสาร phytoalexins ในปริมาณน้อย ดังนั้นการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ป้องกันตัวเองของพืชแบบนี้จะเกี่ยวข้องกับระบบภายในพืช โดยเนื้อเยื่อที่มีชีวิตจะมีความต้านทานเพิ่มขึ้นและเป็นลักษณะการต้านทานในระยะยาวและเกิดขึ้นกับพืชทั้งต้น (Metlitskii and Ozeretskovskaya, 1985; Ozeretskovskaya and Chalova, 1989) ตามรายงานของ Shimizu *et al.* (2005) รายงานว่า การต้านทานโรคแอนแทรคโนสของต้นกล้า Arabidopsis ที่ถูกทดสอบโดยการใช้เชื้อ *Streptomyces galbus* R-5 มีผลทำให้เกิดกลไกการต้านทานแบบ complex mechanism ขึ้น ซึ่งประกอบด้วยการสร้างสารปฏิชีวนะ และการต้านทานแบบ systemic resistance

จากการทดลองปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลท บนผิวหน้าอาหาร MS ที่ต้นกล้าส้มทรอเยอร์ พบว่า หลังจากการปลูกเชื้อประมาณ 45 วัน เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM2 ทำให้ต้นกล้าส้มเริ่มแสดงอาการเหี่ยว เหลือง และตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณของเชื้อและสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้นที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเป็นพิษต่อต้นกล้าส้ม ตามรายงานของ Okasaki (2003) ได้แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ จากใบของ *Setaria viridis* var. *pachystachys*. พบเชื้อ *Streptomyces* sp. strain SANK63997 โดยเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารทุติยภูมิ Herbicidin H ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าพืชได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Dactylosporangium* sp. strain 61299 ที่แยกได้จาก *Cucubalus* sp. สามารถสร้างสาร streptol และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชอีก 2 ชนิด ที่มีผลในการยับยั้งการงอกของ *Brassica rapa.*

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 14 ลักษณะของต้นกล้าและใบของส้มทรอยเยอร์ที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ที่ระดับความรุนแรงต่างๆ

ก = ความรุนแรงของโรคระดับ 0

ข = ความรุนแรงของโรคระดับ 1

ค = ความรุนแรงของโรคระดับ 2

ง = ความรุนแรงของโรคระดับ 3

จ = ความรุนแรงของโรคระดับ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ที่ปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 เป็นเวลา 30 วัน แสดงอาการโรคแคงเกอร์ที่ระดับความรุนแรงต่างๆ หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เป็นเวลา 10 วัน

กรรมวิธี	ระดับความรุนแรงของโรค	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่แสดงอาการโรค[1]				
		0	1	2	3	4
ชุดควบคุม ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียว		0	0	5.6	27.78	66.7
ปลูกเชื้อไอโซเลท LIM1 ร่วมกับเชื้อสาเหตุ		5.6	50	33.3	11.1	0
ปลูกเชื้อไอโซเลท LIM2 ร่วมกับเชื้อสาเหตุ		16.7	38.9	22.2	22.2	0

[1] จากจำนวนต้นกล้าส้ม 18 ต้น

7. การทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟต์ในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้ม

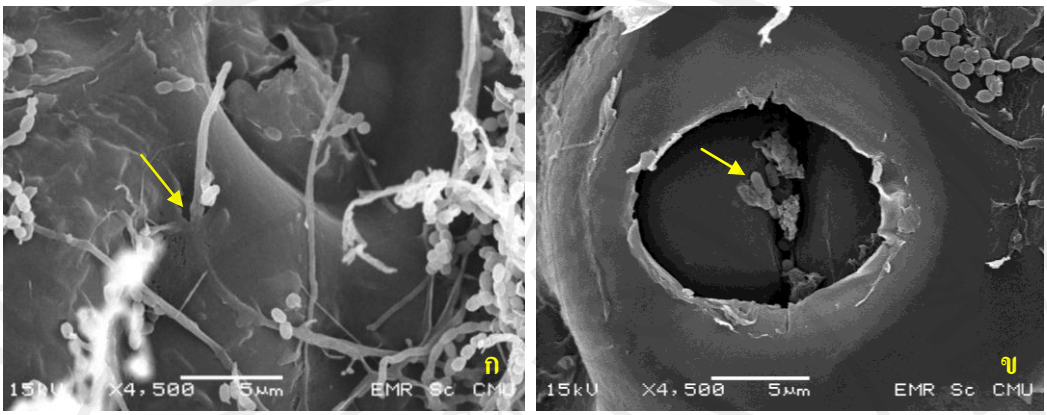
8.1 สภาพปลอดเชื้อ

จากการนำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 โดยหยดสารแขวนลอยของเชื้อ ลงบนผิวหน้าอาหาร เป็นเวลา 14 และ 30 วัน และนำไปตรวจดูลักษณะการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าเส้นใยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟท์สามารถแทงผ่านชั้น cuticle เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช มีการสร้างสปอร์และอาศัยอยู่ภายในช่องว่างของปากใบ (ภาพ14) ผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Suzuki *et al.* (2005) ซึ่งได้ปลูกเชื้อ *Streptomyces galbus* strain R-5 ลงบนผิวหน้าอาหารสังเคราะห์ที่มีต้นกล้า rhododendron ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 14, 30 และ 60 วัน แล้วตรวจดูการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) พบว่า หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 30 วัน เส้นใยของเชื้อเข้าอาศัยอยู่ใกล้ปากใบและเข้าไปในช่องว่างของ substomatal และที่ระยะเวลา 60 วัน พบเส้นใยเข้าไปอาศัย

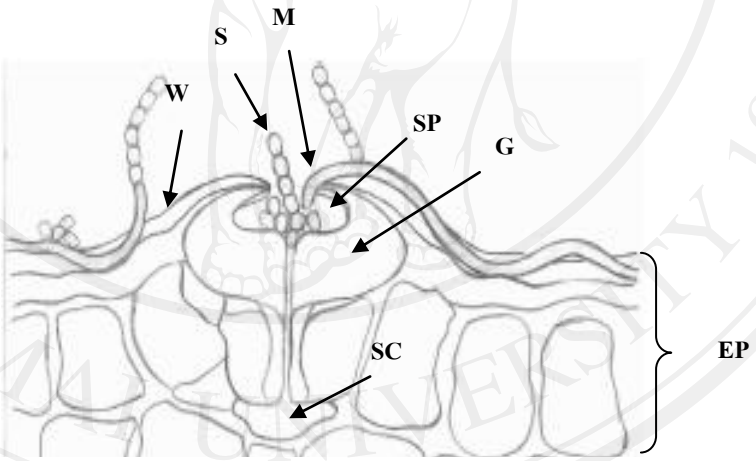
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อยู่ช่องว่างระหว่างเซลล์โดยผ่านทางช่องเปิดของปากใบ แต่ไม่พบบนผิวชั้น epidermis และ mesophyll cell ลักษณะการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 ที่พบจากการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ ฉัตรสุดา (2551) ซึ่งได้ศึกษาลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟต์ในใบและรากของผักกาดฮ่องเต้ โดยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และพบว่า เชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟต์ไอโซเลท SC16 สามารถสร้างเส้นใยแบบ substrate mycelium และ aerial mycelium ปกคลุมบริเวณผิวใบและราก ตลอดจนมีการเจริญเข้าไปในทางปากใบพืชด้วย จากการแยกเชื้อกลับโดยการสุ่มตัวอย่างส่วนเหนือผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ใบ และลำต้น และส่วนใต้ผิวอาหารได้แก่ ราก เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 สามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มได้ โดยมีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ออกจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชส่วนลำต้น ใบ และราก ของต้นกล้าส้ม หลังจากการแยกเชื้อกลับแล้วบ่มไว้ที่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ภาพ 15) ต้นกล้าที่ได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน มีจำนวนของชิ้นพืชส่วนเหนือผิวหน้าอาหาร ส่วนลำต้นที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 มากที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเท่ากับ 17.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรากนั้นมีเปอร์เซ็นต์ การแยกเชื้อกลับน้อย คือได้ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นกล้าส้มที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 เป็นเวลา 30 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเพิ่มมากขึ้น โดยชิ้นส่วนลำต้นและใบเหนือผิวหน้าอาหารให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และรากให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับได้ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4, ภาพ 16) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Meguro *et al.* (2004) ที่ได้ทดลองปลูกเชื้อ *Streptomyces padanus* AOK-30 ลงบนผิวหน้าอาหารสังเคราะห์ที่มีต้นกล้าของ Mountain Laurel ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถแยกเชื้อกลับได้จากชิ้นพืชส่วนโคนต้นถึงส่วนยอดของต้นกล้าได้ภายในระยะเวลา 10 วัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Meguro *et al.* (2004) ไม่มีการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนการแยกเชื้อกลับ แต่ในการทดลองครั้งนี้ มีการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนการแยกเชื้อกลับ ดังนั้นจำนวนชิ้นพืชและเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับจึงได้น้อยกว่า เนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่อยู่บนผิวพืชและในเนื้อเยื่อบางส่วนได้ถูกกำจัดไป จึงทำให้ปริมาณของเชื้อที่จะตรวจพบในช่วงการแยกเชื้อกลับดังกล่าวมีน้อยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 15 ลักษณะการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 (ศรชี้) บริเวณผิวของลำต้น (ก) และปากใบ (ข) ของส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 90 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ภาพ 16 ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 เข้าอาศัยภายในปากใบของส้มทรอยเยอร์

W = wax C = cuticle
G = guard cell S = spores of endophytic actinomycetes
EP = epidermal cell SP = stomatal pore
SC = substomatal cavity M = mycelium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 17 การแยกเชื้อกลับและการเจริญออกจากชิ้นพืชของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 ของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ จากการปลูกเชื้อในสภาพปลอดเชื้อหลังวางบนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 3 วัน

ก = จานอาหารในชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ

ข = ส่วนใบและลำต้น

ค = ส่วนราก

ง = จานอาหารในชุดทดสอบที่ปลูกเชื้อไอโซเลท LIM1

จ,ฉ = เชื้อเจริญออกมาจากบริเวณรอยตัดของราก และ ลำต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับหลังจากปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 เป็นเวลา 14 และ 30 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ

After inoculation (day)	Inoculum	Part of tissue	Plant No				Positive Re-isolation (%)
			1	2	3	4	
14	Control	Leaf, stem (10)[1]	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+1[a] (stem)	+2 (stem)	+1 (stem)	+3 (stem)	17.5
		Root (5)	+1	-	-	+1	10
30	Control	Leaf, stem (10)	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+1 (leaf) +2 (stem)	+1 (leaf) +3 (stem)	+3 (stem)	+1 (leaf) +5 (stem)	40
		Root (5)	-	-	+1	+1	10

[1]จำนวนชิ้นพืช

7.2 สภาพโรงเรือน

จากการนำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือนที่ปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 ในสภาพปลอดเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แล้วย้ายปลูก จากนั้นแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ30 วัน หลังการออกปลูกโดยการสุ่มตัวอย่างส่วนเหนือผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ใบ และลำต้น และส่วนใต้ผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ส่วนราก เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มในสภาพโรงเรือนพบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 สามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มได้ โดยพบการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญออกจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชส่วนเหนือผิวหน้าอาหาร หลังจากบ่มไว้ที่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน มีจำนวนของชิ้นพืชส่วนลำต้นและใบเหนือผิวหน้าอาหารที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 ซึ่งในแต่ละระยะเวลาทุก 7 วัน คือ 7,14, 21 และ 30 วัน ของการแยกเชื้อกลับมีเปอร์เซ็นต์แยกเชื้อกลับเพิ่มขึ้น โดยให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ เท่ากับ 27.5, 45, 50 และ 52.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในส่วนรากนั้นไม่พบการเจริญของเชื้อแอกติโน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมซีสต์เอนโดไฟต์หลังจากการแยกเชื้อกลับ (ภาพ 17) แตกต่างจากการทดลองของ Meguro *et al.* (2006) ที่ได้ทดลองปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 ลงบนผิวหน้าอาหารสังเคราะห์ที่มีต้นกล้าของ rhododendron เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว แล้วทำการแยกเชื้อกลับโดยใช้อาหาร IMA-2 หลังย้ายปลูก 10 วัน สามารถแยกเชื้อกลับได้ โดยพบการเจริญของเชื้อในชิ้นพืชส่วนราก และส่วนของลำต้นตั้งแต่คู่ใบแรกจนถึงคู่ใบที่ 3 ของต้นกล้า rhododendron ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่า เนื้อเยื่อส่วนลำต้นและใบของกล้าส้มทรอยเยอร์ มีเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 กลับได้มากกว่าเนื้อเยื่อส่วนราก ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีการปลูกเชื้อโดยการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหาร สปอร์ของเชื้อจึงมีโอกาสได้สัมผัสและเข้าไปในเนื้อเยื่อส่วนนั้นทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ เลนติเซลล์ เป็นต้น ส่วนรากนั้นอาจจะมีโอกาสได้สัมผัสกับสปอร์ของเชื้อน้อย เนื่องจากอยู่ใต้ผิวอาหารเพาะเลี้ยง และเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ก็มีการเจริญลงใต้ผิวอาหารเพาะเลี้ยงได้น้อยเช่นกัน ดังนั้นปริมาณของเชื้อที่พบบนชิ้นพืชนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณ โอกาสของเชื้อที่จะได้สัมผัสส่วนต่างๆ ของพืช และวิธีการปลูกเชื้อ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของการออกปลูกได้ใช้แกลบดำเป็นวัสดุปลูก โดยปกติแล้วแกลบดำจะมีค่า pH 7-8.5 และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเมื่ออายุของกองขี้เถ้าแกลบมากขึ้น (อิทธิสุนธร, ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่จะเจริญลงมาในส่วนราก หากมีการศึกษาในขั้นต่อไปของการทดลองครั้งนี้น่าจะมีการศึกษาความเหมาะสมของวัสดุปลูกที่ใช้ในการออกปลูกต้นกล้าส้มหลังจากการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

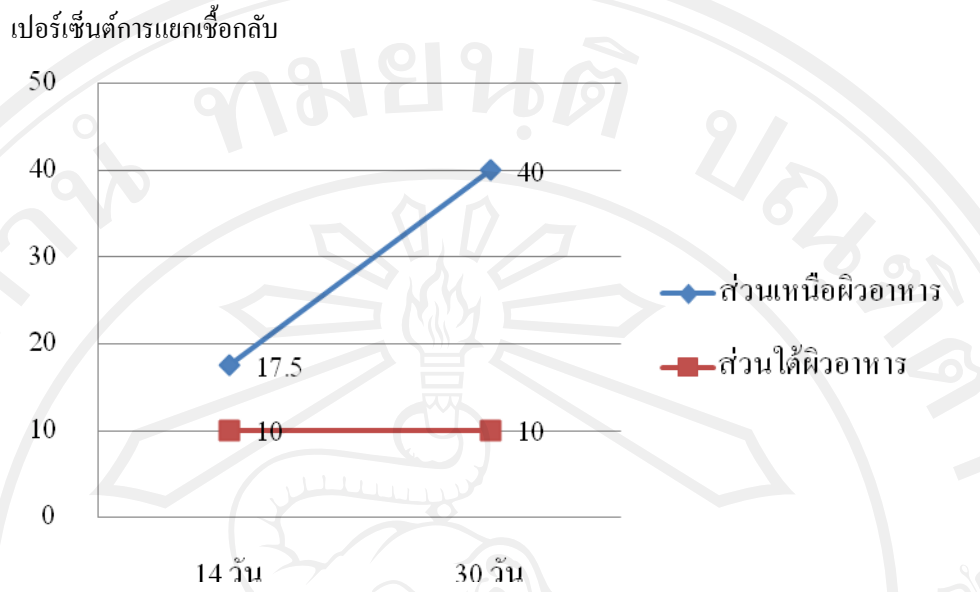
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับหลังจากปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 เป็นเวลา 30 วัน หลังการย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

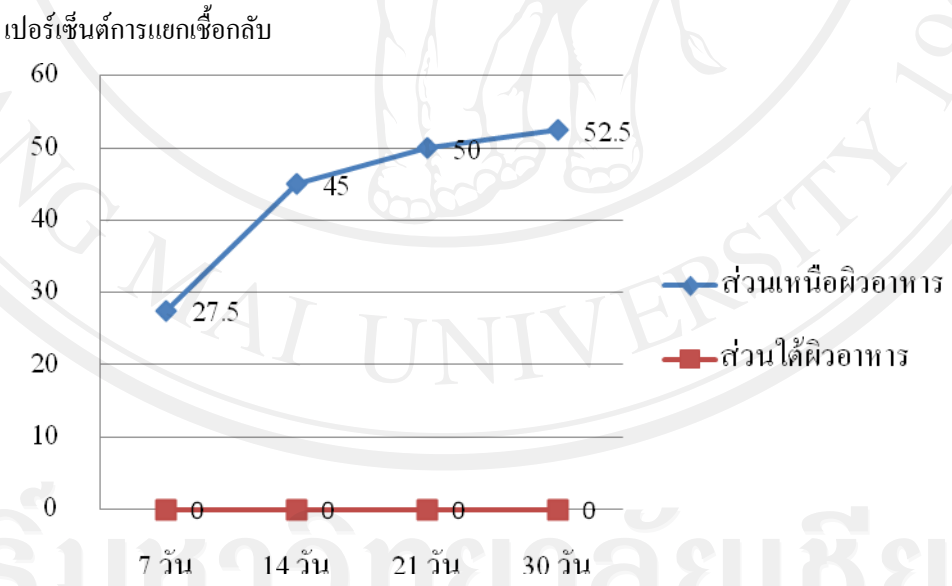
After transplant (day)	Inoculum	Part of tissue	Plant No				Positive Re-isolation (%)
			1	2	3	4	
7	Control	Leaf, stem (10)[1]	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+1 (leaf) +1 (stem)	+2 (leaf) +1 (stem)	+2 (leaf) +2 (stem)	+1 (leaf) +1 (stem)	27.5
		Root (5)	-	-	-	-	0
14	Control	Leaf, stem (10)	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+1 (leaf) +4 (stem)	+2 (leaf) +2 (stem)	+1 (leaf) +3 (stem)	+2 (leaf) +3 (stem)	45
		Root (5)	-	-	-	-	0
21	control	Leaf, stem (10)	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+2 (leaf) +2 (stem)	+3 (leaf) +3 (stem)	+2 (leaf) +3 (stem)	+2 (leaf) +3 (stem)	50
		Root (5)	-	-	-	-	0
30	control	Leaf, stem (10)	-	-	-	-	0
		Root (5)	-	-	-	-	0
	LIM1	Leaf, stem (10)	+2 (leaf) +3 (stem)	+2 (leaf) +4 (stem)	+2 (leaf) +4 (stem)	+2 (leaf) +2 (stem)	52.5
		Root (5)	-	-	-	-	0

[1]จำนวนชิ้นพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 กลับในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพ 19 เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LIM1 กลับในสภาพโรงเรือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved