การทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนจาก *Bacillus subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

นางสาวสุดารัตน์ นุชวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

PURIFICATION OF PROTEINS, FROM *Bacillus subtilis* N3, WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY ON PHYTOPATHOGEN *Bipolaris* sp.

Miss Sudarut Nuchawong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนจาก *Bacillus subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.
โดย	นางสาวสุดารัตน์ นุชวงษ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

สุดารัตน์ นุชวงษ์ : การทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนจาก *Bacillus subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.. (PURIFICATION OF PROTEINS, FROM *Bacillus subtilis* N3, 108 หน้า.

แบคทีเรีย *B. subtilis* N3 ที่คัดแยกได้จากดินสามารถผลิตโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดได้ โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ pH 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 79.08 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชสามารถแยกและทำบริสุทธิ์ได้ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความเข้มข้น 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 80% และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 118.18 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ด้วยไดเอธิลอะมิโนเอธิล (DEAE Bio-gel A) โดยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62% และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 159.61 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน เมื่อผ่านการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิสพบว่ามีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34.61 kDa จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry พบว่ามีลายพิมพ์เพปไทด์ใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลินที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefacien* subsp. *plantarum* โดยมีคะแนนความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 52% นอกจากนี้เมื่อศึกษาลักษณะของสายใยและสปอร์ราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ราก่อโรคพืช โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ 50% (IC50) มีค่าเท่ากับ 0.045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้โปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้สามารถป้องกันการรุกรานของรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในใบข้าวโพดได้มากกว่า 89% ดังนั้นจากงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมปัญหาโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดที่มีสาเหตุจากรา *Bipolaris* sp. ได้

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....
ปีการศึกษา	2556	

5472132823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: ANTIFUNGAL / BIOCONTROL / BACILLUS / BIPOLARIS / PLANT DISEASE

SUDARUT NUCHAWONG: PURIFICATION OF PROTEINS, FROM *Bacillus subtilis* N3, WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY ON PHYTOPATHOGEN *Bipolaris* sp.. ADVISOR: ASST. PROF. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 108 pp.

B. subtilis N3, a soil borne bacterium, showed antifungal activity against *Bipolaris* sp. which is a causal agent of Southern corn leaf blight. The objective of this research was to isolate and purify the antifungal proteins from the culture filtrate of *B. subtilis* N3 which was produced by culturing the bacterium in tryptic soy broth medium, pH 7.5 at 30°C for 18 hours. The result indicated that the culture filtrate demonstrated 65% inhibition on mycelial growth and accounted for 79.08 AU/mg of specific activity. The antifungal protein was fractionated in 40-80% ammonium sulfate saturation, with around 80% inhibition and 118.18 AU/mg of specific activity. This protein was further purified by anion exchange chromatography on diethylaminoethyl (DEAE Bio-gel A). The purified antifungal fraction from fraction numbers 45-50 (sample 38) exhibited the highest level of antifungal activity of about 62% and 159.61 AU/mg of specific activity. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a single band with a molecular weight corresponded to 34.61 kDa. Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry gave peptide fingerprint with significant similarity to flagellin from *Bacillus amyloliquefacien* subsp. *plantarum* with sequence coverage of 52%. Moreover, morphological study under microscope showed that the mycelial growth and conidia germination were significantly inhibited by the purified antifungal protein. The 50% inhibitory concentration (IC50) of the antifungal activity toward *Bipolaris* sp. was 0.045 mg/ml. Furthermore, the purified antifungal protein was able to prevent as well as protect disease development caused by *Bipolaris* sp. on corn leaves. The results from current investigation provide the evidence that the protein from *B. subtilis* N3 is applicable for the control of Southern corn leaf blight disease caused by *Bipolaris* sp.

Department:	Microbiology	Student's Signature	....
Field of Study:	Industrial Microbiology	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2013		

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยาพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งให้การอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือใน ด้านต่างๆ ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาช่วยแก้ไขและ ตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งช่วย ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ การอบรมสั่งสอน ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งใน การดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการ ทำงานวิจัย และขอขอบคุณพี่และน้องๆในห้องวิจัย 1904/15 ทุกท่าน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ภาคจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้กำลังใจ ในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ น้อง และครอบครัวของข้าพเจ้า สำหรับความรัก ความห่วงใย คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ...... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ...... จ
กิตติกรรมประกาศ ...... ฉ
สารบัญ ...... ช
สารบัญตาราง ...... ฎ
สารบัญภาพ ...... ฐ
บทที่ 1 1
บทนำ 1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
บทที่ 2 4
ปริทัศน์วรรณกรรม 4
2.1 ความสำคัญของข้าวและสถานการณ์ข้าวต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ 4
2.2 ความสำคัญของข้าวโพดและสถานการณ์ข้าวโพดต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ 4
2.3 โรคพืชของข้าวและข้าวโพด 5
2.4 ความสำคัญของราก่อโรคพืชสายพันธุ์ *Bipolaris sp.* 6
2.5 โรคกล้าเน่าตายในข้าว (Seedling Blight) 7
2.6 โรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว (Brown Leaf Spot) 8
2.7 โรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Southern corn leaf blight) 9
2.8 โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด (Northern corn leaf blight) 11
2.9 โรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียมในข้าวโพด (Northern Leaf Spot หรือ Helminthosporium Leaf Spot) 12
2.10 การป้องกันและการกำจัดราที่ก่อโรคในข้าวและข้าวโพด 13
2.11 การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological control) 14
2.12 *Bacillus* sp. 16
2.13 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 17
2.14 การทำโปรตีนบริสุทธิ์และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช 19
2.14.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) 20

หน้า

2.14.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) 20

2.14.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน 24

บทที่ 3 26

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 26

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 26

3.2 เคมีภัณฑ์ 28

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษา 30

3.3.1 แบคทีเรีย 30

3.3.2 ราก่อโรคพืช 30

3.4 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. 30

3.4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 และการเตรียมราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. 30

3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช 31

3.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช 31

3.5.1 ศึกษาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 31

3.5.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน 32

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช 32

3.5.4 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน 32

3.5.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี 33

3.5.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 34

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 35

3.6 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด 36

หน้า

3.7 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช 36
3.8 การหาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์ 37
3.9 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด .. 37
3.9.1 การเตรียมใบข้าวโพด 37
3.9.2 การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคพืชที่จะใช้ทดสอบ 37
3.9.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด 37
3.9.4 การทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด 38
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 38
บทที่ 4 39
ผลการทดลอง 39
4.1 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. 39
4.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช 40
4.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 40
4.2.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี 43
4.2.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)........... 53
4.3 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด 55
4.3.1 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของสายใยรา 55
4.3.2 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการงอกของสปอร์รา 56
4.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคพืช 59
4.5 การหาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์ 63
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้บนใบข้าวโพด 64

หน้า

บทที่ 5 68
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 68
รายการอ้างอิง 73
ภาคผนวก ก 86
ภาคผนวก ข 88
ภาคผนวก ค 92
ภาคผนวก ง 94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 108

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงโรคของข้าวที่เกิดจากราก่อโรคพืชสายพันธุ์ต่างๆ 5

ตารางที่ 2.2 แสดงโรคของข้าวโพดที่เกิดจากราสายพันธุ์ต่างๆ 6

ตารางที่ 2.3 แสดงชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชซึ่งผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* 17

ตารางที่ 2.4 แสดงชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ 23

ตารางที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ 23

ตารางที่ 2.6 แสดงสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography) 24

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. 39

ตารางที่ 4.2 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40%, 40-80% และ 80-100% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5) 41

ตารางที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 และสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต 42

ตารางที่ 4.4 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของช่วงลำดับส่วนจากสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE 48

ตารางที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 สารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต และลำดับส่วนของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE 52

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยชุดควบคุมมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และชุดทดลองมีโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง 57

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการวิเคราะห์แถบของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี LC/MS/MS แบบ Q-ToF 60
ตารางที่ 4.8 **แ**สดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ที่ถูกยับยั้งโดยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 63
ตารางที่ 4.9 แสดงความยาวของรอยโรคบริเวณใบของข้าวโพดหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรค หลังบ่มเป็นเวลา 5 วัน 65

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. oryzae* 8
รูปที่ 2.2 แสดงอาการของโรคต้นกล้าเน่าตายในข้าว 8
รูปที่ 2.3 แสดงอาการของโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าวที่เกิดจากรา *B. oryzae* 9
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. maydis* 10
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของ pseudothecia ของรา *C. heterostrophus* จากใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ 10
รูปที่ 2.6 แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในใบของข้าวโพด (*Zea mays* L.) ในแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* 11
รูปที่ 2.7 แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในกาบฝักและฝักผลของข้าวโพด ซึ่งมีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* 11
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะสปอร์และ appressoria ของรา *S. turcica* ที่บริเวณผิวใบ 12
รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ซึ่งเกิดจากรา *B. turcica* 12
รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. zeicola* 13
รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียม ซึ่งเกิดจากรา *B. zeicola* 13
รูปที่ 2.12 แสดงลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ประจุบวก) และประจุที่ล้อมรอบ (ประจุลบ) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) (a) และลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ประจุลบ) และประจุที่ล้อมรอบ (ประจุบวก) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) (b) 22
รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกชนิด carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบชนิด diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) 23
รูปที่ 4.1 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% (b), 40-80% (c), และ 80-100% (d) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5) ที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 เซนติเมตร (a) 41
รูปที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของลำดับส่วนต่างๆของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์

เชนจ์ DEAE ซึ่งชะโปรตีนด้วย linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 44
รูปที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของลำดับส่วนต่างๆของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ซึ่งชะโปรตีนด้วย linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 47
รูปที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส 54
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยชุดควบคุมจะไม่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ (a) และชุดทดลองที่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b) 56
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดโดยชุดควบคุมมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (a) และชุดทดลองมีโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (b) 59
รูปที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. โดยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 64
รูปที่ 4.8 แสดงอาการของใบข้าวโพดหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (c) และป้องกัน (d) การเจริญของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ของตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (a) และชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (b) 65
รูปที่ 4.9 แสดงอาการของใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (c) และป้องกัน (d) การเจริญของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (a) และชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (b) 66
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของสปอร์และสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ในเนื้อเยื่อของใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (b) และป้องกัน (c) การเจริญของราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (a) 67

บทที่ 1

บทนำ

ภาคเกษตรกรรมมีความสำคัญอย่างมากต่อระบบเศรษฐกิจในประเทศไทย เพราะรายได้ของประเทศไทยส่วนใหญ่มาจากการส่งออกสินค้าทางการเกษตร โดยเฉพาะข้าวและข้าวโพด (กระทรวงพาณิชย์, 2556) ซึ่งมีแนวโน้มในการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นในทุกๆปี โดยในปี 2555 ขยายตัวร้อยละ 5.5 เมื่อเทียบกับปี 2554 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ดังนั้นการพัฒนาภาคเกษตรกรรมจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อประเทศไทย ปัญหาหลักของภาคเกษตรกรรมที่ส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตร คือ ปัญหาทางด้านโรคพืช โดยสาเหตุของปัญหาโรคพืชส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก (Montesinos, 2007)

ราชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคพืชคือรา *Bipolaris* sp. โดยส่วนใหญ่ราในสกุลนี้มักจะเป็นสาเหตุหลักของโรคพืชหลายชนิด เช่น โรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าว ส่วนใหญ่โรคนี้เกิดจากรา *Bipolaris oryzae* หรือ *Helminthosporium oryzae* (*Cochliobolus miyabeanus*) (Harish และคณะ, 2007; Shabana และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบราอีกสามสปีชีส์ที่ก่อโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าวได้เช่นกันคือ *Bipolaris victoriae, Bipolaris indica* และ *Bipolaris bicolor* (Motlagh และ Kaviani, 2008) โดยโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าวนี้เป็นโรคพืชที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการส่งออกข้าวเนื่องจากส่งผลให้ผลผลิตของข้าวลดลงถึง 74% (Dallagnol และคณะ, 2011) ลักษณะอาการของโรคนี้คือ เกิดแผลลักษณะจุดกลมสีน้ำตาลที่บริเวณใบข้าว ขอบแผลมีสีเหลือง จากนั้นเชื้อจึงแพร่กระจายเข้าทำลายเมล็ดข้าว ส่งผลให้เมล็ดข้าวเกิดแผลลักษณะจุดสีน้ำตาล นอกจากข้าวแล้วยังพบว่ารา *Bipolaris maydis* ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Southern corn leaf blight) ด้วย โดยลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดคือ เกิดแผลที่บริเวณใบด้านล่างของต้นข้าวโพด จากนั้นจึงแพร่กระจายและลุกลามส่งผลให้ใบแห้งและต้นข้าวโพดตายในที่สุด ซึ่งโรคนี้ส่งผลกระทบอย่างมากต่อผลผลิตข้าวโพดทั่วโลก (Carson และคณะ, 2004; Huang และคณะ, 2012)

การป้องกันโรคพืชตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือการใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพดี แต่การใช้สารเคมีในการป้องกันโรคพืชนี้จะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม วิธีลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชอีกวิธีหนึ่งคือการควบคุมการเกิดโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งเป็นวิธีการนำสิ่งมีชีวิตที่เป็นปฏิปักษ์ (antagonist) ต่อเชื้อก่อโรคมาควบคุมโรคพืช

วิธีการควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพ เป็นทางเลือกหนึ่งของการลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืช มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในการทำลายและยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรค (Pal และ Gardener, 2006) ซึ่งกลไกในการควบคุมโรคพืชสามารถแบ่งออกได้หลายลักษณะ เช่น การแข่งขันเพื่อแย่งชิงอาหารหรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (competition) โดยจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคจะแย่งชิงอาหาร

กับเชื้อก่อโรค ส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโต จึงสามารถช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคได้ (Lugtenberg และ Kamilova, 2009) เช่น การแย่งชิงธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตระหว่าง *Pseudomonas aureofaciens* AR 1 และเชื้อก่อโรคในข้าว *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum* และ *Pyricularia oryzae* โดยพบว่า *P. aureofaciens* AR 1 สามารถผลิตไซเดอโรฟลอร์ (siderophore) เพื่อช่วยจับธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค ดังนั้นจึงช่วยป้องกันการก่อโรคของเชื้อก่อโรคในข้าวได้ (Chaiharn และคณะ, 2009) หรือการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในพืช (innate immunity) เพื่อกระตุ้นให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ เช่น *Pseudomonas* sp. WCS417r สามารถกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อรา *Colletotrichum orbiculare* ที่ก่อโรคในแตงกวาได้ (Loon, 2007) นอกจากการควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพโดยใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเช่นกันคือ การใช้สารสกัดจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยเคยมีรายงานระบุไว้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ได้จากสกุล *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Cawoy และคณะ, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus* sp. เป็นที่นิยมในการนำมาใช้เพื่อควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพ เนื่องจากแบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและมีความปลอดภัยเนื่องจากมีสมบัติตามหลักเกณฑ์ของ GRAS (generally regarded as safe) ของ US Food and Drug Administration (USFDA) (Cawoy และคณะ, 2011) *Bacillus* sp. มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคหลายชนิดตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สามารถยับยั้งการก่อโรคของรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอะโวคาโด, *Bacillus pumilus* สามารถยับยั้งการก่อโรคของราได้หลายชนิดอาทิเช่น *Rhizoctonia oryzae* และ *B. maydis* ในธัญพืช *Bacillus velezensis* สามารถยับยั้งรา *Botrytis cinerea* ซึ่งก่อโรคในมะเขือเทศ *Bacillus licheniformis* สามารถยับยั้งรา *Colletotrichum graminicola* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสได้ (Cawoy และคณะ, 2011)

สารที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชนั้นประกอบด้วยสารในกลุ่มไลโปเพปไทด์และโปรตีน โดยสารในกลุ่มไลโปเพปไทด์ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชนั้นมีหลายชนิด เช่น surfactins, iturins และ fengycins (Ongena และ Jacques, 2008) และสารในกลุ่มโปรตีน อาทิเช่น bacisubin (Liu และคณะ, 2007), chitinase (Dai และคณะ, 2011) และ baciamin (Wong และคณะ, 2008) ซึ่งจากที่เคยมีรายงานพบว่าสารในกลุ่มโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดี สามารถแยกและทำบริสุทธิ์เบื้องต้นได้ง่ายด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อนโดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีน เนื่องจากโปรตีนที่ตกตะกอนได้นั้นจะไม่เสียสภาพ นอกจากนี้มีรายงานว่าโปรตีนต้านราก่อโรคพืชที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีประจุลบ ดังนั้นจึงสามารถทำบริสุทธิ์ต่อไปได้โดยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟีซึ่งอาศัยหลักการแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างประจุสุทธิ และต่อจากนั้นสามารถทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีซึ่งอาศัยหลักการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุลต่อไป (Kavitha และคณะ, 2005; Li และคณะ, 2009; Liu และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2008)

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดย ทิพย์ศิรา ทองพิลา (2554) พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในข้าวและข้าวโพดได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *B. subtilis* N3 ในการผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) pH 7.5 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทั้งนี้สารออกฤทธิ์ที่ได้ยังมีความสามารถในการทนทานต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดเบสในช่วงกว้างได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำบริสุทธิ์สารประเภทโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบว่าโปรตีนออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชดังกล่าวเป็นโปรตีนชนิดใด เพื่อนำสารออกฤทธิ์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในข้าวและข้าวโพดต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จาก *Bacillus subtilis* N3
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. เพื่อวิเคราะห์ประเภทของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความสำคัญของข้าวและสถานการณ์ข้าวต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ

ข้าว (*Oryza sativa*) มีความสำคัญต่อประชากรทั่วโลกและมีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย (Londo และคณะ, 2006; Sweeney และ McCouch, 2007) จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae เช่นเดียวกับข้าวโพด (*Zea mays*) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Buell, 2009) โดยแหล่งผลิตข้าวของโลกนั้นมากกว่า 90% อยู่ในทวีปเอเชีย (Khush, 1997; Sweeney และ McCouch, 2007) ทั้งนี้เนื่องจากทวีปเอเชียมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกข้าวและประชากรส่วนใหญ่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก นอกจากนี้การขยายตัวของประชากรอย่างรวดเร็วยังส่งผลให้มีการสนับสนุนการผลิตข้าวเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภคข้าวภายในประเทศ และยังสามารถอาศัยการส่งออกข้าวเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศได้อีกด้วย (สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว, 2550) ความต้องการบริโภคข้าวของประชากรโลกเพิ่มมากขึ้นในทุกๆปี โดยจากรายงานของสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตรพบว่าสถานการณ์ความต้องการบริโภคข้าวของโลกในปี 2550/51 – 2554/55 มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 427.48 ล้านตันข้าวสารในปี 2550/51 เป็น 457.63 ล้านตันข้าวสารในปี 2554/55 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 1.57 ต่อปี และในแง่ของปริมาณการส่งออกข้าวของโลกนั้น มีรายงานว่าในปี 2554/55 มีปริมาณการส่งออก 38.21 ล้านตันข้าวสาร ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก 36.21 ล้านตันข้าวสารของปี 2553/54 โดยคิดเป็นร้อยละ 5.52 ในรายงานเดียวกันยังระบุว่าประเทศที่มีบทบาทในการส่งออกข้าวที่สำคัญของโลกและมีแนวโน้มการส่งออกข้าวเพิ่มขึ้นในปี 2556 ได้แก่ ออสเตรเลีย กัมพูชา จีน อียิปต์ สหภาพยุโรป ปากีสถาน ไทย และสหรัฐอเมริกา (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในปี 2556 ประเทศไทยมีการส่งออกข้าวเป็นอันดับสองของการส่งออกสินค้าทางเกษตรกรรมรองจากผลิตภัณฑ์กลุ่มยางพารา โดยการส่งออกข้าวในปี 2556 มีมูลค่าการส่งออกรวม 133,839 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.2 ความสำคัญของข้าวโพดและสถานการณ์ข้าวโพดต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae (Iltis, 2000) และเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญมากต่อโลก (Strable และ Scanlon, 2009) โดยจากรายงานของสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปี 2556 ระบุว่า “ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเอทานอล และเมล็ดพันธุ์ ในปี 2550/51-2554/55 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 772.60 ล้านตัน ในปี 2550/51 เป็น 873.35 ล้านตัน ในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.30 ต่อปี โดยประเทศสหรัฐอเมริกา ยูเครน จีน อาร์เจนตินา บราซิล ไนจีเรีย อินโดนีเซีย สหภาพยุโรป แอฟริกาใต้ อินเดีย และฟิลิปปินส์ มีความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้นในปี 2556 (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดเพื่อการบริโภค การอุตสาหกรรม และใช้เป็นอาหารสัตว์ (กรมวิชาการ

เกษตร, 2552) ทั้งนี้จากรายงานความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทยในปี 2550/51-2554/55 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 3.96 ล้านตันในปี 2550/51 เป็น 4.36 ล้านตันในปี 2554/55 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.92 ต่อปี เนื่องจากความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีมากขึ้น นอกจากนี้จากสถานการณ์การส่งออกข้าวโพดของไทยในปี 2554/55 พบว่ามีมูลค่า 2,660.99 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจาก 1,725.03 ล้านบาทในปี 2553/54 ดังนั้นข้าวโพดจึงมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ” (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.3 โรคพืชของข้าวและข้าวโพด

ปัญหาโรคพืชของข้าวและข้าวโพดนั้น ส่งผลให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพตามมาตรฐานและปริมาณผลผลิตลดลง ทั้งนี้ยังส่งผลกระทบต่อการส่งออกข้าวและข้าวโพดของประเทศเป็นอย่างมาก โดยปัญหาทางด้านโรคพืชนั้นเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ อาทิเช่น แมลง ไวรัส แบคทีเรีย และรา แต่พบว่ามากกว่า 85% ของปัญหาโรคพืชนั้นมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากรา (Pernezny และคณะ, 2011) โรคพืชของข้าวและข้าวโพดเกิดขึ้นจากราก่อโรคได้หลายชนิด และราก่อโรคชนิดหนึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาโรคพืชได้หลากหลายชนิดเช่นกัน ตัวอย่างของโรคพืชของข้าวและราที่ก่อโรคในข้าวแสดงในตารางที่ 2.1 และตัวอย่างของโรคพืชของข้าวโพดและราที่ก่อโรคในข้าวโพดแสดงในตารางที่ 2.2 จากตารางจะพบว่าโรคในข้าวและข้าวโพดนั้นมีหลากหลายชนิด ดังนั้นถ้ามีการควบคุมราที่ก่อโรคในข้าวและข้าวโพดได้นั้น จะช่วยให้ผลผลิตข้าวและข้าวโพดมีคุณภาพ ทั้งนี้ยังช่วยเพิ่มปริมาณการส่งออกข้าวและข้าวโพดของประเทศได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.1 แสดงโรคของข้าวที่เกิดจากราก่อโรคพืชสายพันธุ์ต่างๆ

โรคของข้าว	**ราที่ก่อโรคในข้าว**	**เอกสารอ้างอิง**
โรคกาบใบเน่า (Black Sheath Rot)	*Gaeumannomyces graminis*	(Freeman และ Ward, 2004)
โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Leaf Spot)	*Bipolaris oryzae, B. victoriae, B. indica* และ *B. bicolor*	(Motlagh และ Kaviani, 2008)
โรคไหม้ของข้าว (Blast)	*Pyricularia grisea*	(Picco และ Rodolfi, 2002)
โรคเมล็ดดำ/ โรคดินปืนในเมล็ดข้าว (Kernel Smut)	*Neovossia barclayana*	(Slaton และคณะ, 2004)
โรคใบลาย/โรคใบจุดสีดำ (Leaf Smut)	*Entyloma oryzae*	(Kandhari, 2005)
โรคใบขีดสีน้ำตาล (Narrow Brown Leaf Spot)	*Cercospora janseana*	(Biswas, 2006)
โรคกล้าเน่าตาย (Seedling Blight)	*Bipolaris oryzae*	(Krupinsky และคณะ, 2004)
โรคกาบใบเป็นแผล (Sheath Blight)	*Rhizoctonia solani*	(Jia และคณะ, 2007)
โรคลำต้นเน่า (Stem Rot)	*Sclerotium oryzae*	(Cintas และ Webster, 2001)

ตารางที่ 2.2 แสดงโรคของข้าวโพดที่เกิดจากราสายพันธุ์ต่างๆ

โรคของข้าวโพด	ราที่ก่อโรคในข้าวโพด	เอกสารอ้างอิง
โรคราน้ำค้าง หรือโรคใบลาย (Corn Downy Mildew)	*Peronosclerospora sorghi*	(Thakur และ Mathur, 2002)
โรคใบไหม้แผลเล็ก (Southern corn leaf blight)	*Bipolaris maydis* (*Helminthosporium maydis*)	(Sweets และ Wrather, 2000)
โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight)	*Bipolaris turcica* (*Helminthosporium turcicum*)	(Sweets และ Wrather, 2000)
โรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียม (Northern Leaf Spot หรือ Helminthosporium Leaf Spot)	*Bipolaris zeicola* (*Helminthosporium carbonum*)	(Sweets และ Wrather, 2000)
โรคราสนิม (Southern Rust)	*Puccinia polysora*	(Casela และ Ferreira, 2002)
โรคกาบและใบไหม้ (Banded Leaf and Sheath Blight)	*R. solani*	(Nagaraja และ Reddy, 2010)
โรคใบจุด (Leaf Spot)	*Curvularia lunata*	(Xu และคณะ, 2007)
โรคต้นเน่าเกิดจากเชื้อฟิวซาเรียม (Fusarium Stalk Rot)	*Fusarium moniliforme*	(Bacon และคณะ, 2001)
โรคต้นเน่า (Charcoal Rot)	*Macrophomina phaseolina*	(Saleh และคณะ, 2010)
โรคต้น ฝักและเมล็ดเน่าเกิดจากเชื้อดิโพลเดีย (Ear Rot)	*Diplodia maydis*	(Bressan, 2003)
โรคสมัทหรือโรคราเขม่าสีดำ (Common Smut)	*Ustilago maydis*	(Bolker, 2001)

2.4 ความสำคัญของราก่อโรคพืชสายพันธุ์ *Bipolaris sp.*

ราก่อโรคพืชในสกุล *Bipolaris* ก่อนหน้านี้จัดอยู่ในสกุล *Helminthosporium* *Bipolaris* เป็นชื่อที่ใช้ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรา (anamorph) โดยยังมีชื่อที่ใช้ในระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (teleomorph) ว่า *Cochliobolus* รานี้จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota ซึ่งราที่อยู่ในกลุ่มนี้มากกว่า 80% จัดเป็นราก่อโรคพืช (Guarro และคณะ, 1999) โดยการจัดจำแนกราก่อโรคพืชในสกุล *Bipolaris* นี้สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Order	Pleosporales
Family	Pleosporaceae
Genus	*Bipolaris* (anamorph): *Cochliobolus* (telemorph)
Species	*Bipolaris* sp. (anamorph): *Cochliobolus* sp. (telemorph)

(National Center for Biotechnology Information (NCBI): NCBI Taxonomy. Accessed via Global Biodiversity Information Facility (http://www.gbif.org/species/105909197 on 2013-12-02))

Bipolaris จัดเป็นราก่อโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายและกระทบต่อผลผลิตของพืชในวงศ์ *Poaceae* เช่น ข้าว ข้าวโพดและข้าวสาลี ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก (Manamgoda และคณะ, 2011) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่ารา *B. oryzae* ก่อโรคต้นกล้าเน่าตาย (Seedling Blight) ในเมล็ดข้าว (Krupinsky และคณะ, 2004), รา *B. oryzae*, *B. victoriae*, *B. indica* และ *B. bicolor* ก่อโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาล (Brown Leaf Spot) ในข้าว (Motlagh และ Kaviani, 2008) นอกจากนี้รา *B. maydis* ยังก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด, รา *B. turcica* ก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight) ในข้าวโพด และ *B. zeicola* ก่อโรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียมในข้าวโพด (Sweets และ Wrather, 2000) ทั้งนี้นอกจากข้าวและข้าวโพดแล้วราก่อโรคพืชในสกุลนี้ยังก่อโรคในพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น รา *B. sorokiniana* ก่อโรคใบจุดสีน้ำตาล (Spot blotch) ในข้าวบาร์เลย์ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งในประเทศแคนาดาและทั่วโลก (Ghazvini และ Tekauz, 2012), รา *B. bicolor* ก่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในเมล็ดและใบของข้าวสาลี (Morejon และคณะ, 2006) เป็นต้น

2.5 โรคกล้าเน่าตายในข้าว (Seedling Blight)

รา *B. oryzae* (anamorph) (Marchetti และ Petersen, 1984; Shoemaker, 1959) หรือ *Cochliobolus miyabeanus* (telemorph) (Dastur, 1942) เป็นราก่อโรคกล้าเน่าตาย (Seedling Blight) (Krupinsky และคณะ, 2004) และโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าว (Motlagh และ Kaviani, 2008) ลักษณะของสปอร์มีขนาดเล็ก รูปร่างทรงกระบอกปลายโค้งมน สีน้ำตาลทอง ภายในสปอร์มีการสร้างผนังกั้น (transverse septa หรือ cross walls) ประมาณ 6-14 เซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Datnoff และ Lentini, 1994) การแพร่กระจายและความรุนแรงของโรคขึ้นกับสุขภาพของต้นข้าว อุณหภูมิในดิน และปริมาณความชื้นในอากาศ โดยสปอร์ของรา *B. oryzae* ที่ปะปนอยู่ในอากาศ จะลุกลามและก่อโรคในต้นข้าวเมื่อภาวะแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการเจริญของรา จากนั้นจะส่งผลให้ต้นข้าวเกิดแผลลักษณะเป็นจุด กระจัดกระจาย และแพร่กระจายไปทั่วลำต้นของข้าว สุดท้ายต้นข้าวจะตายในที่สุดดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ซ้าย) หรือในกรณีที่ต้นข้าวสามารถเจริญเติบโตได้หลังจากเกิดการลุกลามของรา จะพบว่าต้นกล้ามีการเจริญเติบโตผิดปกติ ลำต้นจะมีสีเหลืองหรือสีเขียวอ่อนและไม่แข็งแรงดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ขวา)

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. oryzae* (Datnoff และ Lentini, 1994)

รูปที่ 2.2 แสดงอาการของโรคต้นกล้าเน่าตายในข้าว
(http://www.lsuagcenter.com/en/crops_livestock/crops/rice/Diseases/plant_path/Seedling-Blight.htm)

2.6 โรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว (Brown Leaf Spot)

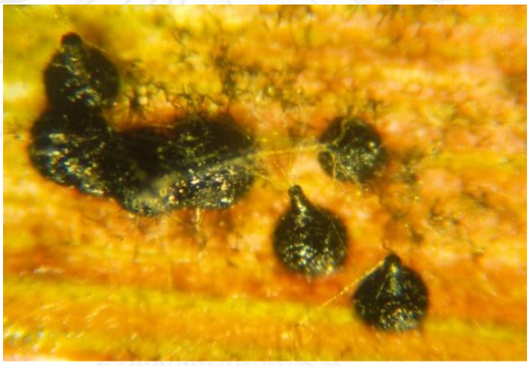
โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Leaf Spot) ในข้าวเกิดจากรา *B. oryzae*, *B. victoriae*, *B. indica* และ *B. bicolor* (Motlagh และ Kaviani, 2008) โดยลักษณะอาการของโรคคือ ใบข้าวจะเกิดบาดแผลเนื่องจากการเข้าทำลายใบของราก่อโรคพืช ซึ่งบาดแผลจะมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วยขอบเหลือง รูปวงกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-10 มิลลิเมตร เมื่อแผลกระจายเต็มบริเวณใบพบว่าที่บริเวณตรงกลางของแผลมีสีเทา ดังแสดงในรูปที่ 2.3 นอกจากนี้ยังสามารถเกิดแผลที่บริเวณเปลือกข้าวได้อีกด้วย นอกจากใบและเปลือกข้าวแล้วพบว่าราก่อโรคพืชนี้สามารถเข้าทำลายที่เมล็ดได้อีกด้วย โดยส่งผลให้เมล็ดข้าวมีจุดสีน้ำตาลปนดำประปรายหรือทั้งเมล็ด ทำให้เมล็ดข้าวมีคุณภาพไม่ดี น้ำหนักเบา และเมื่อนำไปสีข้าวสารจะหักง่าย (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2553)

รูปที่ 2.3 แสดงอาการของโรคใบไหม้จุดสีน้ำตาลในข้าวที่เกิดจากรา *B. oryzae*
(http://www.lsuagcenter.com/en/crops_livestock/crops/rice/Diseases/plant_path/Brown-Spot.htm; The American Phytopathological Society)

2.7 โรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Southern corn leaf blight)

โรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Southern corn leaf blight) มีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* (anamorph) (Shoemaker, 1959) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *Cochliobolus heterostrophus* (teleomorph) (Balint-Kurti และคณะ, 2007; Carson และคณะ, 2004; Drechsler, 1934) ลักษณะสปอร์ของราชนิดนี้แสดงในรูปที่ 2.4 โดยสปอร์มีรูปร่างยาวปลายมนเรียว ภายในสปอร์มีการสร้างผนังกั้นประมาณ 3-13 เซลล์ ซึ่งการงอกของสปอร์จะงอกออกทั้งสองด้าน (Alcorn, 1988) ในภาวะที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น จะพบการสร้าง pseudothecia ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ที่ภายในประกอบด้วย 4 แอสคัสรูปทรงกระบอก และแต่ละแอสคัสจะบรรจุ ascospore ประมาณ 5-9 สปอร์ (Navi และคณะ, 1999; Schoch และคณะ, 2006) การเข้าลุกลามและทำลายข้าวโพดนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด ลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดคือ เมื่อภาวะแวดล้อมเหมาะสมสปอร์ที่แพร่กระจายหรือปลิวมาตามลมและฝนนั้นจะงอกและเข้าทำลายใบข้าวโพดโดยการสร้าง appressoria แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของใบข้าวโพด (Shanmugam และคณะ, 2010) จากนั้นราจะเจริญและสร้างสายใยส่งผลให้ใบข้าวโพดเกิดบาดแผลที่บริเวณใบด้านล่างของข้าวโพด ขอบแผลมีสีน้ำตาลแดง กระจัดกระจายไม่สม่ำเสมอตามความยาวของเส้นใยในใบข้าวโพด จากนั้นบาดแผลจะแพร่กระจายและแต่ละบาดแผลจะเชื่อมต่อกันตามความยาวของใบ ส่งผลให้ใบแห้งไหม้และตายได้ดังแสดงในรูปที่ 2.6 นอกจากใบแล้ว รานี้ยังสามารถเข้าทำลายกาบใบ กาบฝัก ลำต้น และฝักของข้าวโพดได้อีกด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งโรคนี้ส่งผลกระทบอย่างมากต่อผลผลิตข้าวโพดทั่วโลก (Carson และคณะ, 2004; Huang และคณะ, 2012; Sweets และ Wrather, 2000)

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. maydis*
(http://chaleeprom.com/pd/ant00_corn_southern_corn_leaf_blight_fungi_bipolaris_maydis_fungi_cochliobolus_heterostrophus_20130203_104014_45296.html)



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของ pseudothecia ของรา *C. heterostrophus* จากใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Schoch และคณะ, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2.6 แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในใบของข้าวโพด (*Zea mays* L.) ในแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* (http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1524015)

รูปที่ 2.7 แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลเล็กในกาบฝักและฝักผลของข้าวโพด ซึ่งมีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* (http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1524022)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.8 โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด (Northern corn leaf blight)

โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด (Northern corn leaf blight) เกิดจากรา *B. turcica* (anamorph) (Shoemaker, 1959) อีกชื่อหนึ่งเรียกว่า *Setosphaeria turcica* (telemorph) (Technow และคณะ, 2013; Welz และ Geiger, 2000) รานี้มักจะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะยาวเรียวปลายโค้งมน ภายในมีการสร้างผนังกั้นประมาณ 3-8 เซลล์ การแพร่กระจายของโรคเกิดขึ้นเมื่อสปอร์ของราแพร่กระจายหรือปลิวตามลมและฝน จากนั้นเมื่อภาวะแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญของราสปอร์จะเริ่มงอกและสร้าง appressoria เพื่อแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของใบ (Martin, 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 โดยลักษณะอาการของโรคจะคล้ายกับโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด จากนั้นบาดแผล

จะขยายใหญ่ขึ้นส่งผลให้เนื้อเยื่อที่บริเวณนั้นแห้งตายและมีสีน้ำตาลหรือสีเขียวเทา ซึ่งลักษณะของบาดแผลจะแตกต่างจากโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดคือบาดแผลไม่ถูกจำกัดด้วยเส้นใบ ขอบแผลเรียบสม่ำเสมอ ระยะสุดท้ายบาดแผลจะเชื่อมต่อกันส่งผลให้ใบแห้งไหม้และตายได้ (Levy และ Pataky, 1992; Sweets และ Wrather, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.9

รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะสปอร์และ appressoria ของรา *S. turcica* ที่บริเวณผิวใบ (Martin, 2011)

รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ซึ่งเกิดจากรา *B. turcica*
(http://www.longislandhort.cornell.edu/vegpath/photos/NCLB_corn.html)

2.9 โรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียมในข้าวโพด (Northern Leaf Spot หรือ Helminthosporium Leaf Spot)

โรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียม (Northern Leaf Spot หรือ Helminthosporium Leaf Spot) เกิดจากรา *B. zeicola* (anamorph) หรือ *Cochliobolus carbonum* (telemorph)

(Walton และคณะ, 1997) ลักษณะสปอร์มีรูปร่างเรียวยาวรูปกระสวย ภายในมีการสร้างผนังกั้นประมาณ 6-12 เซลล์ และมีขนาดประมาณ 30-100 x 12-18 μm (Navi และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 โดยลักษณะอาการของโรคคือเมื่อสปอร์แพร่กระจายหรือปลิวมาตามลมและฝนแล้วจะเข้าทำลายที่ใบของข้าวโพด เกิดบาดแผลเป็นจุดสีเหลืองหรือน้ำตาล จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายไปตามใบต่างๆส่งผลให้ใบแห้งตาย (Sweets และ Wrather, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.11

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *B. zeicola*
(http://www.naro.affrc.go.jp/org/nilgs/diseases/contents/IMG/img0010.jpg)

รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียม ซึ่งเกิดจากรา *B. zeicola*
(http://cropdisease.cropsci.illinois.edu/corn/northernleafspot.html)

2.10 การป้องกันและการกำจัดราที่ก่อโรคในข้าวและข้าวโพด

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าราในสกุล *Bipolaris* นั้นก่อโรคได้ในพืชหลายชนิดทั้งในข้าวและข้าวโพด ดังนั้นเพื่อลดปัญหาโรคพืชที่เกิดจากราก่อโรคพืชดังกล่าวควรจะต้องมีการป้องกันและการกำจัดราก่อโรคพืชนี้ จากข้อมูลของสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2552) กล่าวถึงการป้องกันและกำจัดราก่อโรคพืชในข้าวไว้ดังนี้ เกษตรกรควรเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีสมบัติต้านทานและเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูก ใช้สารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดราก่อโรค

พืช และการกำจัดวัชพืชในนา ทำแปลงให้สะอาด และใส่ปุ๋ยในอัตราที่เหมาะสม หรือการปลูกพืชหมุนเวียนจะช่วยลดความรุนแรงของโรคได้

การป้องกันและกำจัดราก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Southern corn leaf blight) โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด (Northern corn leaf blight) และโรคใบจุดจากเชื้อเฮลมินโธสปอเรียมในข้าวโพด (Northern Leaf Spot หรือ Helminthosporium Leaf Spot) นั้นสามารถทำได้โดยการเลือกใช้เมล็ดพันธุ์ที่สมบูรณ์ ปราศจากโรค หรือคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อโรคได้ เช่น พันธุ์นครสวรรค์ 1 นครสวรรค์ 72 สุวรรณ 1 และสุวรรณ 2 จากนั้นจึงใช้สารเคมีฉีดพ่นเพื่อป้องกันและกำจัดโรค นอกจากนี้หลังจากเก็บเกี่ยวข้าวโพดแล้วควรทำลายเศษของข้าวโพด เพราะจากการศึกษาพบว่ารานี้สามารถอยู่ข้ามฤดูบนเศษซากของข้าวโพดได้ (เอกสารวิชาการโรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด สถาบันวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร, 2547)

2.11 การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological control)

วิธีการป้องกันและการกำจัดราก่อโรคพืชของเกษตรกรที่เป็นที่นิยมตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือการใช้สารเคมี เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถใช้ได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพดี แต่พบว่าการใช้สารเคมีในการป้องกันและการกำจัดราก่อโรคนั้นส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมเนื่องจาก เกิดสารพิษตกค้างหรือปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม ซึ่งส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย ทั้งนี้ราก่อโรคนั้นยังสามารถต้านทานต่อสารเคมีได้ จึงส่งผลให้การใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดราก่อโรคนั้นไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (Janisiewicz และ Korsten, 2002) ดังนั้นวิธีลดการใช้สารเคมีในการป้องกันและการกำจัดราก่อโรคพืชอีกวิธีหนึ่งคือการควบคุมการเกิดโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งเป็นวิธีการนำสิ่งมีชีวิตที่เป็นปฏิปักษ์ (antagonist) ต่อเชื้อก่อโรคมาควบคุมสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในพืช

วิธีการควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพเป็นทางเลือกหนึ่งของการลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืช มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในการทำลายและยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรค (Pal และ Gardener, 2006) โดยกลไกการควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพนี้สามารถแบ่งออกได้หลายลักษณะดังนี้

1. การแข่งขันเพื่อแย่งชิงอาหารหรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (competition) โดยจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคจะแย่งชิงอาหารหรือพื้นที่อยู่อาศัยกับเชื้อก่อโรค ส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโต จึงสามารถช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้ (Lugtenberg และ Kamilova, 2009) เช่น การแย่งชิงธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตระหว่าง *P. aureofaciens* AR 1 และรา *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum* และ *Pyricularia oryzae* ซึ่งก่อโรคในข้าว โดยพบว่า *P. aureofaciens* AR 1 สามารถผลิตไซเดอโรฟลอร์ เพื่อจับธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค ดังนั้นจึงยับยั้งหรือชะลอการเจริญของเชื้อก่อโรคและส่งผลช่วยในการป้องกันการก่อโรคของเชื้อก่อโรคในข้าวได้ (Chaiharn และคณะ, 2009) Yu และคณะ (2010) ยังพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* CAS15

สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. oxysporum* ที่ก่อโรคเหี่ยวในพริกได้ โดยพบว่า *B. subtilis* CAS15 สามารถผลิตไซเดอโรฟลอร์ ซึ่งทำหน้าที่ดักจับธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อราก่อโรค จึงช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

2. การควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (induced systemic resistance) ซึ่งช่วยให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ โดยกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของพืชนั้นเริ่มจาก เมื่อเชื้อก่อโรคเข้ารุกรานพืชจะเกิดการกระตุ้นให้พืชมีการผลิตกรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่จะไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรค (pathogenesis-related (PR) proteins) โดยโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ผลิตนี้จะทำหน้าที่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์พืชในบริเวณที่ถูกเชื้อก่อโรครุกราน ส่งผลให้สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการรุกรานจากเชื้อก่อโรคได้ (Pal และ Gardener, 2006) สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่สามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืชได้นี้เรียกว่า elicitor ซึ่งสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (Choudhary และ Johri, 2009) ตัวอย่างการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีนี้ เช่น *B. subtilis* GB03 และ *B. amyloliquefaciens* IN937a ผลิตสารระเหย 2,3-Butanediol ซึ่งทำหน้าที่เป็น elicitor และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ *Arabidopsis* sp. ส่งผลทำให้ *Arabidopsis* sp. ต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเน่าเละจาก *Erwinia carotovora* subsp. ได้ (Ryu และคณะ, 2004) นอกจากนี้รา *Colletotrichum fragariae* (M23) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ก็ยังสามารถผลิตสารที่ทำหน้าที่เป็น elicitor ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสตรอเบอร์รี่ ส่งผลให้สตรอเบอร์รี่สามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุมาจากรา *Colletotrichum acutatum* (M11) สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ (Chalfoun และคณะ, 2011)

3. การใช้จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นปรสิต (parasitism) ในการควบคุมโรคพืช โดยจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคนั้นสามารถเข้าไปเจริญและทำลายเชื้อก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น *Pasteuria penetrans* เป็นแบคทีเรียที่เป็นปรสิตของไส้เดือยฝอย (*Meloidogyne* spp.) ที่ก่อโรครากปม (root-knot) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญในพืชผักเศรษฐกิจหลายชนิด (Davies, 2009) อีกตัวอย่างหนึ่งคือ รา *Trichoderma viride, T. harzianum* และ *T. hamatum* สามารถยับยั้งรา *Sclerotium rolfsii* ที่ก่อโรครากเน่าโคนเน่า (white foot และ root rot) ในต้นชาได้ โดยกลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นพบว่ารา *T. viride, T. harzianum* และ *T. hamatum* เป็นปรสิตของราก่อโรคพืช เนื่องจากสามารถเจริญเข้าไปในเส้นใยของรา *S. rolfsii* ได้ ส่งผลให้ราก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญและแพร่กระจายได้ (Shaigan และคณะ, 2008)

4. การควบคุมโรคพืชด้วยสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หมายถึงการใช้สารพิษที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อก่อโรคที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคนั้น ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* B-916 สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยของราซึ่งก่อโรคพืชได้หลายชนิดเช่น *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *R. solani*, *Alternaria oleracea*, *Alternaria brassicae* และ *B. cinerea* โดยการผลิตสาร bacisubin (Liu และคณะ,

2007), *B. subtilis* B47 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิด iturin A2 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดที่มีสาเหตุมาจากรา *B. maydis* ได้ (Ye และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น 2,4-diacetylphloroglucinol, Phenazines, Oomycin A, Pyoluteorin, Pyrrolnitrin, 2,3-de-epoxy-2,3-didehydro-rhizoxin, Viscosinamide, Butyrolactones, N-Butylbenzenesulphonamide, Pantocin A และ B, Xanthobaccins, Kanosamine และ Zwittermycin A เป็นต้น (Raaijmakers และคณะ, 2002)

2.12 *Bacillus* sp.

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน พบได้ทั่วไปในดิน และมีสมบัติพิเศษคือสามารถผลิตเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมได้อย่างกว้างขวาง (Emmert และ Handelsman, 1999; Zhang และคณะ, 2008) ทั้งนี้ *Bacillus* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืช โดย Cawoy และคณะ (2011) ได้กล่าวถึงเหตุผลที่ *Bacillus* sp. มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืชไว้ดังนี้ ประการแรกคือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและเป็นที่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ เช่น *B. subtilis* ประการที่สองแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับจาก US Food and Drug Administration (USFDA) ว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (generally regarded as safe, GRAS) ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* จัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic) ประการที่สามแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีสมบัติพิเศษคือสามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีสมบัติพิเศษคือสามารถทนต่อภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ เช่น ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ความเป็นกรด-ด่างมากเกินไป และภาวะที่ขาดแคลนอาหาร ดังนั้นจึงส่งผลให้แบคทีเรียสกุลนี้สามารถอยู่รอดในภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ ประการที่สี่คือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic environments) และภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำๆได้ (facultative anaerobe environments) ซึ่งข้อดีนี้เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคพืชในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำได้ เช่นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* บางชนิดสามารถเคลื่อนที่ไปเจริญในบริเวณรากพืชใต้ดินที่ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนต่ำได้ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมโรคพืชและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชด้วย ประการสุดท้ายคือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืชเนื่องจากสามารถเกิดการควบคุมการเกิดโรคพืชได้หลากหลายกลไก

ปัจจุบันพบว่ามีการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชในผลิตภัณฑ์ต่างๆภายใต้ชื่อทางการค้าดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชซึ่งผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (Cawoy และคณะ, 2011)

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรีย	ราก่อโรคพืช	กลไก	พืช	บริษัท
Avogreen®	*B. subtilis*	*C. gloeosporioides*	antibiosis	Avocado	Ocean Agriculture
BacillusSPP®	*Bacillus* spp.	*P.* syringae pv. *syringae*, *X. campestris* pv.*vesicatoria* *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*	antibiosis	Several crops	Bio Insumos Nativa Ltda., Chile
Bio safe®	*B. subtilis*	Foliar bligth	antibiosis	Soybean, bean, cotton	Lab. Biocontrole Farroupilha, Brazil
Biosubtilin	*B. subtilis*	*Fusarium,Verticillium,Pythium, Cercospora, Colletotrichum, Alternaria, Ascochyta, Macrophomina, Myrothecium, Ramularia, Xanthomonas* และ *Erysiphe polygoni*	antibiosis, competition	Cotton, cereals, ornamental plants, vegetable crops	Biotech International Ltd.

2.13 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

กลไกการควบคุมโรคพืชของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* นั้นเกิดขึ้นได้หลายกลไกเช่น การผลิตเอนไซม์หรือโปรตีน, การสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm), การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (induced systemic resistance) และการส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth-promoting) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. กลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีน จากงานวิจัยของ Stein (2005) รายงานว่าประมาณ 4-5% ของจีโนมของ *B. subtilis* นั้นสามารถประมวลรหัสให้เอนไซม์หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* B29 สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยและยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา *F. oxysporum*, *R. solani*, *F. moniliforme* และ *S. sclerotiorum* ได้โดยการผลิตโปรตีน B29I ซึ่งโปรตีน B29I นี้เมื่อทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ (diethylaminoethyl หรือ DEAE) และวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี โดยการใช้ไบโอเจลพี-100 (Bio-Gel® P-100) แล้ว พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 42.3 kDa โดยโปรตีนชนิดนี้มีฤทธิ์

ยับยั้งการงอกของสปอร์, ยับยั้งการเจริญของ germ-tube elongation และกระตุ้นให้สปอร์เสียสภาพ, บวม และแตกออก (Li และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนชนิด E2 ที่ผลิตจาก *B. subtilis* EDR4 สามารถยับยั้งรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ซึ่งก่อโรค take-all ในต้นข้าวสาลี โดยโปรตีน E2 นี้สามารถแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ (diethylaminoethyl หรือ DEAE) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 377.0 kDa ซึ่งประกอบด้วย multi-subunits โดยโปรตีนนี้มีการแสดงออกของ ribonuclease และ hemagglutinating activities (Liu และคณะ, 2010)

2. กลไกการควบคุมโรคพืชโดยการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) หรือสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactant) จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ไบโอฟิล์มคือการอยู่ร่วมกันของเซลล์แบคทีเรียและมีการสร้างสารต่างๆร่วมกัน เช่น โปรตีน, พอลิแซ็กคาไรด์ และกรดนิวคลีอิก (Berenjian และคณะ, 2013) ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Chen และคณะ (2013) พบว่ามีแบคทีเรียหกสายพันธุ์จากแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ต่างๆในประเทศจีนมีความสามารถในการยับยั้ง *Ralstonia solanacearum* ที่ก่อโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ โดยกลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม โดยพบว่าเซลล์แบคทีเรียจะอยู่ร่วมกันบริเวณผิวรากพืชจำนวนมากขึ้น จึงส่งผลให้มีสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นการเกิดไบโอฟิล์มนี้จึงช่วยส่งเสริมให้พืชสามารถต้านทานต่อราก่อโรคพืชได้ อีกตัวอย่างหนึ่งของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ เช่น *B. subtilis* UMAF6614 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด surfactin, bacillomycin และ fengycin ซึ่งจะมีผลช่วยให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด ทั้งนี้ยังมีการสร้างไบโอฟิล์มที่บริเวณใบของเมล่อนอีกด้วย (Zeriouh และคณะ, 2013)

3. กลไกการควบคุมโรคพืชโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (induced systemic resistance) ด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ตัวอย่างเช่น *B. pumilus* EN16 และ *B. subtilis* SW1 สามารถกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อโรคไวรัสใบยาสูบด่าง (tobacco mosaic virus disease) ได้ โดยกลไกที่เกิดขึ้นคือแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชมีการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของพืชเพิ่มขึ้นคือ เฟนิลอะลานีน แอมโมเนีย – ไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase), พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค (pathogenesis-related (PR) proteins) (Lian และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารระเหยชนิดไดเมทิลไดซัลไฟด์ (dimethyl disulfide หรือ DMDS) ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. cereus* C1L ทำหน้าที่เป็น elicitor เพื่อไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืชได้ เมื่อสกัดแยกและวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยวิธี solid-phase microextraction, gas chromatography และ mass spectrometry พบว่าสารระเหยไดเมทิลไดซัลไฟด์นี้จะ

กระตุ้นให้ต้นยาสูบและข้าวโพดสามารถต้านทานต่อรา *B. cinerea* และ *Cochliobolus heterostrophus* ได้ ตามลำดับ (Huang และคณะ, 2012) แบคทีเรีย *B. subtilis* FB17 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 ที่ก่อโรคใบจุดในมะเขือเทศและต้นของ *Arabidopsis thaliana* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย โดยกลไกการควบคุมโรคพืชที่เกิดขึ้นพบว่า *B. subtilis* FB17 สามารถผลิตสารอะซีโทอิน (acetoin หรือ 3-hydroxy-2-butanone) ซึ่งทำหน้าที่เป็น elicitor ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช จึงส่งผลให้พืชสามารถต้านทานต่อ *P. syringae* pv. tomato DC3000 ได้ (Rudrappa และคณะ, 2010)

4. กลไกการควบคุมโรคพืชโดยการส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth-promoting) โดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นมีรายงานในหลายๆงานวิจัย ตัวอย่างเช่น *B. amyloliquefaciens* (FZB24, FZB42 และ FZB45) และ *B. subtilis* FZB37 ซึ่งคัดแยกได้จากดินนั้น มีความสามารถผลิตสาร indole-3-acetic acid หรือ IAA ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนพืชโดยมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดและเยื่อหุ้มต้นอ่อนของข้าวโพด ดังนั้นจึงช่วยส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิดได้ (Idris และคณะ, 2004) และจากงานวิจัยของ (Khan และ Patel, 2007) รายงานว่าจากการคัดแยกแบคทีเรียจากรากพืชใต้ดินจำนวน 35 ชนิด พบว่า *B. firmus* NARS1 มีสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วชิกพี (*Cicer arientinum*) โดยกลไกที่เกิดขึ้นคือช่วยให้พืชดูดซึมธาตุฟอสเฟต ผลิตไซเดอโรฟลอร์เพื่อช่วยดักจับธาตุเหล็ก และผลิตสาร IAA ซึ่งทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนพืชช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช จึงส่งผลให้พืชสามารถต้านทานต่อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด ทั้งนี้สารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MBI 600 สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชภายใต้ชื่อทางการค้า Integral® โดยสามารถควบคุมโรคกาบใบไหม้ (sheath blight) ในข้าวที่มีสาเหตุมาจากรา *R. solani* ได้ ซึ่งสารที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้มีฤทธิ์ไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากและลำต้น นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้กำจัดราชนิด hexaconazole, propiconazole และ validamycin ได้ดี ต้านทานต่อ tricyclazole ได้ในระดับปานกลาง และต้านทานต่อ benomyl และ mancozeb ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ได้เล็กน้อย (Lawrence และคณะ, 2011)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.14 การทำโปรตีนบริสุทธิ์และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช

วิธีการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นกับสมบัติของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย ประจุ ขนาด และสมบัติการจับ (binding) เป็นต้น (Berg และคณะ, 2002) จากรายงานในงานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* นั้นประกอบด้วยหลายขั้นตอนดังนี้ ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis,

SDS-PAGE) (Kavitha และคณะ, 2005; Li และคณะ, 2009; Liu และคณะ, 2010; Stein, 2005) โดยรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนมีดังนี้คือ

2.14.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

วิธีการตกตะกอนโปรตีนที่เป็นที่นิยมคือการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] เนื่องจากวิธีนี้ไม่ทำให้โปรตีนที่ตกตะกอนลงมาเสียสภาพ (Deutscher, 1990) การตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีนี้อาศัยหลักการการเพิ่มความแรงของไอออน (ionic strength) ในสารละลายด้วยเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (salting out) และเมื่อเพิ่มความแรงของไอออนในสารละลายโดยการเติมเกลือ พบว่าเกลือจะเข้าจับกับโมเลกุลของน้ำในสารละลายได้ดีกว่าโปรตีน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในสารละลายมากขึ้น เกลือจะเข้าจับกับโมเลกุลของน้ำที่จับอยู่กับโปรตีน ส่งผลให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่สามารถละลายน้ำได้ของโปรตีนจะมารวมตัวกันและตกตะกอนลงมา (Scopes, 1994) เกลือที่สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนมีหลายชนิดเช่น โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต เป็นต้น (Deutscher, 1990) แต่เกลือที่เป็นที่นิยมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] เนื่องจากมีค่าการละลายน้ำสูงมาก และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ (temperature coefficient of solubility) อยู่ในช่วง 0-30 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ (Scopes, 1994)

เนื่องจากในสารละลายจะมีโปรตีนผสมหลายชนิด ซึ่งสามารถแยกโปรตีนผสมเหล่านี้ออกจากกันโดยการใช้ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวที่แตกต่างกันเป็นช่วงๆ (salt fractionation) (Deutscher, 1990) ดังนั้นขั้นตอนแรกของการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตคือการหาความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนที่มีแอกทิวิตี โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนคือ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนที่ตกตะกอนลงมาเสียสภาพ จากนั้นจึงวัดแอกทิวิตีของโปรตีนที่ตกตะกอนได้ในแต่ละช่วงของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเลือกช่วงที่โปรตีนมีแอกทิวิตีสูงที่สุด ขั้นตอนต่อไปคือการแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากโปรตีนด้วยวิธีไดแอลิซิส (dialysis) วิธีการแยกเกลือและโปรตีนนี้อาศัยหลักการการแพร่ของสารผ่านเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) เช่น เยื่อเลือกผ่านชนิดเซลลูโลส (cellulose membrane) จากบริเวณที่สารมีความเข้มข้นมากไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นน้อย โดยจะพบว่าเมื่อเริ่มต้นการไดแอลิซิสนั้น ความเข้มข้นของเกลือภายในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) จะมากกว่าภายนอกถุงไดแอไลซ์ ดังนั้นเกลือจากภายในถุงไดแอไลซ์ จะแพร่ออกมาอยู่ภายนอกถุงไดแอไลซ์ โดยโปรตีนที่ต้องการมีขนาดใหญ่กว่ารูของเยื่อเลือกผ่านจึงไม่สามารถแพร่ออกจากถุงไดแอไลซ์ได้ (Berg และคณะ, 2002)

2.14.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)

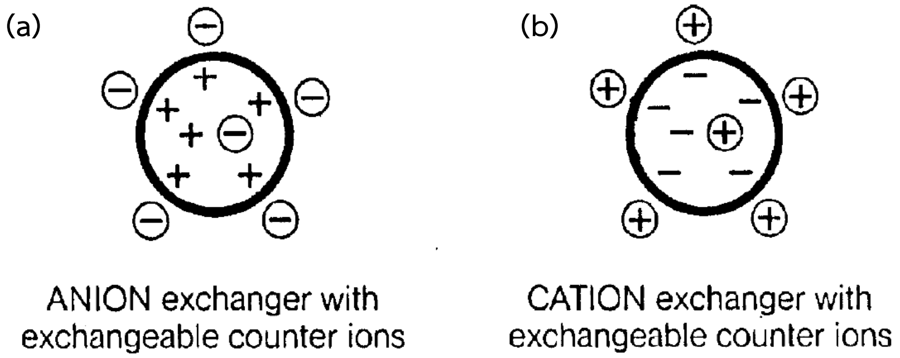
วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีและราคาถูกกว่าวิธีอื่น (Selkirk, 2004) วิธีนี้เป็นการแยกโปรตีนออกจากสารละลายโดยอาศัยหลักการการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟส

เคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลว (บัฟเฟอร์และตัวอย่างโปรตีน) กับเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นของแข็งภายในคอลัมน์ (column packing matrix) (Berg และคณะ, 2002; Bollag, 1995; Selkirk, 2004) โดยเฟสคงที่ (stationary phase) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่สามารถละลายในตัวทำละลายได้และได้รับการบรรจุไว้ภายในคอลัมน์เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งจะมีประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุ (counter ion) เพื่อใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุกับโปรตีนตัวอย่าง (Selkirk, 2004)

ขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสามารถทำได้ดังนี้ ขั้นตอนแรกคือการสร้างภาวะสมดุล (equilibrated) ให้กับตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วยสารที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์ โดยประจุของสารที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์จะเข้าไปอยู่ล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุ (counter ion) ขั้นตอนต่อมาเมื่อเติมโปรตีนตัวอย่างลงในคอลัมน์จะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุที่บริเวณ counter ion โดยประจุของโปรตีนที่เป็นชนิดเดียวกับประจุ counter ion ของสารที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์ ส่งผลให้ประจุของสารที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์ถูกชะออกไป และโปรตีนตัวอย่างจะจับอยู่กับตัวแลกเปลี่ยนประจุ ขั้นตอนต่อมาคือการชะโปรตีนตัวอย่างที่จับอยู่กับตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้ความแรงของไอออน (ionic strength) ของโปรตีนลดลง โปรตีนตัวอย่างจึงถูกชะลงมาได้ (Selkirk, 2004)

ทั้งนี้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสามารถแบ่งได้ 2 ชนิดคือ แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) และแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) (Selkirk, 2004) วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) ใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีประจุลบ โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุมีประจุบวกและมีประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุ (counter ion) เป็นประจุลบ ดังแสดงในรูปที่ 2.12 (a) อีกวิธีหนึ่งคือแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) ใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีประจุบวก โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุจะมีประจุลบและมีประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก (Selkirk, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.12 (b)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.12 (a และ b) แสดงลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ประจุบวก) และประจุที่ล้อมรอบ (ประจุลบ) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) (a) และลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ประจุลบ) และประจุที่ล้อมรอบ (ประจุบวก) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) (b) (Pharmacia, 1991a)

ตัวแลกเปลี่ยนประจุประกอบด้วยส่วนของเมทริกซ์ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งไม่สามารถละลายในตัวทำละลายได้และมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ซึ่งจะอยู่บริเวณผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยสารที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุในส่วนของเมทริกซ์มีหลายชนิดเช่น เซลลูโลส (cellulose), เด็กซ์แทรน (dextran) และเซฟาเด็กซ์ (sephadex) (Sheehan และ FitzGerald, 1996) และในการทำบริสุทธิ์โปรตีนนั้นจะต้องคำนึงถึงการเลือกหมู่ฟังก์ชันที่จะใช้ให้สัมพันธ์กับประจุสุทธิของโปรตีนที่ต้องการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันมีหลายชนิดโดยจะมีประจุและความแรงที่แตกต่างกันไป เมื่อแบ่งตามความแรงของประจุสามารถแบ่งหมู่ฟังก์ชันได้ 2 ชนิดคือ หมู่ฟังก์ชันที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างแรง (strong exchangers) มีช่วง pH 2-12 ตัวอย่างเช่น Sulphopropyl (SP), Methyl sulphonate (S) ซึ่งจัดเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และ Quaternary ammonium (Q), Quaternary aminoethyl (QAE) ซึ่งจัดเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ นอกจากนี้ยังมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างอ่อน (weak exchangers) ตัวอย่างเช่น carboxymethyl (CM) ซึ่งมีช่วง pH 6-11 ซึ่งจัดเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและ diethylaminoethyl (DEAE) ซึ่งมีช่วง pH 2-9 ซึ่งจัดเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Selkirk, 2004; Sheehan และ FitzGerald, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 2.4 โดยโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุแสดงในตารางที่ 2.5 ทั้งนี้ในรูปที่ 2.13 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกชนิด carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบชนิด diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) (Berg และคณะ, 2002) สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนนั้น จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุและประจุสุทธิของโปรตีนที่ต้องการทำบริสุทธิ์ โดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับตัวแลกเปลี่ยนประจุนั้นสรุปไว้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.4 แสดงชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

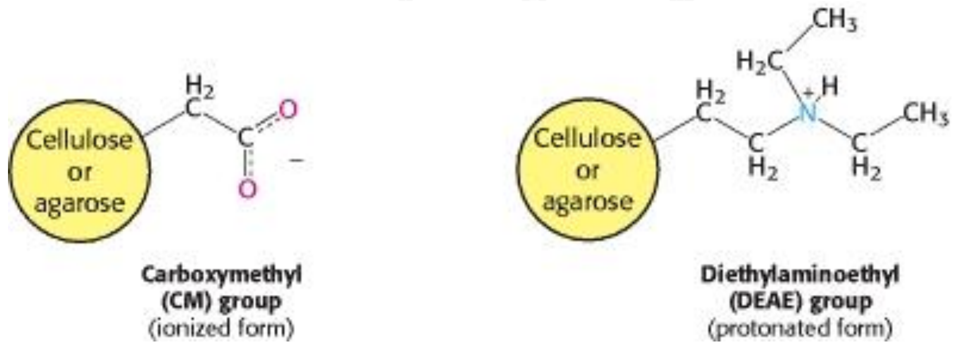
ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchanger type)	**ตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างแรง** (strong exchangers)	**ตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างอ่อน** (weak exchangers)
ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchangers)	Sulphopropyl (SP) Methyl sulphonate (S)	Carboxymethyl (CM)
ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchangers)	Quaternary ammonium (Q) Quaternary aminoethyl (QAE)	Diethylaminoethyl (DEAE)

ที่มา: (Selkirk, 2004)

ตารางที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก	**โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชัน**
Sulphopropyl (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Methyl sulphonate (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	**โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชัน**
Quaternary ammonium (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Quaternary aminoethyl (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$

ที่มา: Amersham Biosciences, Ion Exchange Chromatography – Principles and Method



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกชนิด carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบชนิด diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) (Berg และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.6 แสดงสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography)

สารละลายบัฟเฟอร์: แบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (Buffers: Cation exchange)	ประจุบวก (cation)	ช่วง pH ที่เหมาะสม (pH range)
Maleic acid	Na^+	1.5–2.5
Formic acid	Na^+	3.3–4.3
Citric acid	Na^+	2.6–6.0
Lactic acid	Na^+	3.6–4.3
Acetic acid	Na^+	4.3–5.3
MES/NaOH	Na^+	5.5–6.7
Phosphate	Na^+	6.7–7.7
MOPS	Na^+	6.5–7.5
HEPES	Na^+	7.5–8.2
สารละลายบัฟเฟอร์: แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (Buffers: Antion exchange)	**ประจุลบ (anion)**	**ช่วง pH ที่เหมาะสม (pH range)**
N-methyl piperazine	Cl^-	4.5–5.0
Piperazine	Cl^-	5.0–6.0
L-Histidine	Cl^-	5.5–6.5
Bis-Tris	Cl^-	5.8–6.8
Bis-Tris propane	Cl^-	6.4–7.3
Triethanolamine	Cl^-	7.3–8.2
Tris	Cl^-	7.5–8.0
Diethanolamine	Cl^-	8.4–9.4

ที่มา: (Selkirk, 2004)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.14.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสามารถทำได้ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ซึ่งเป็นวิธีการแยกโปรตีนตามรูปร่างและขนาดโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสามารถทราบขนาดโมเลกุลของโปรตีนได้เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนขนาดมาตรฐาน (Laemmli, 1970) โปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพด้วยสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ซึ่งเป็นสารที่มีประจุลบ (anionic detergent) โดยจะจับกับโครงสร้างของโปรตีน ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพ และเมื่อเติม mercaptoethanol (2-thioethanol) หรือ

dithiothreitol จะทำหน้าที่ไปสลายพันธะ disulfide bonds ของโปรตีน ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพ โดยโครงสร้างของโปรตีนไม่สามารถจับกันเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ แต่โครงสร้างจะเป็นเส้นตรงเพราะถูกสลายพันธะ disulfide bonds ไป จากนั้นนำโปรตีนที่เสียสภาพนี้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า และย้อมสีแถบของโปรตีนที่ปรากฎด้วยสีย้อมคูแมซีบลู (coomassie blue) (Berg และคณะ, 2002) เมื่อโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ ขั้นตอนที่เป็นที่นิยมและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นสามารถทำได้ด้วยเครื่อง Mass Spectrometry โดยนำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass Spectrometry จากนั้นนำรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน เช่น ฐานข้อมูลของ NCBI (The National Center for Biotechnology Information) เพื่อระบุว่าเป็นโปรตีนชนิดใด (Berg และคณะ, 2002)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตรของบริษัท Whatman International CO., Ltd., England
2. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
4. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magatic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
5. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง (Sonicator) รุ่น SONOREX RX 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
6. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA
7. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific, Edison, N.J., USA
8. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Rad Biologic LP และ Bio-Rad model 2110 fraction collector ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
9. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
10. เครื่องนาโนดรอป 2000 (Nanodrop 2000 spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Backman, Germany
14. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
15. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo, USA
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lambda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท Perkin Elmer instruments, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

17. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90x15 มิลลิลิตร ของบริษัท Hycon plastic, USA, ขนาด 65x15 มิลลิเมตร ของบริษัท Bioplast, Austria
18. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
19. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEIN II และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น PAC 300 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
20. ตู้เขี่ยเชื้อ laminar flow ISSGO รุ่น Clean ของบริษัท Triwork, Thailand
21. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
22. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
23. ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 และ UL80 ของบริษัท Memmert, Germany
24. ถุงไดแอไลซ์ ขนาดรู 3500 MWCO SnakeSkin บริษัท Thermo Scientific, USA
25. ไมโครปิเปตและทิปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, Japan
26. หลอดคิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
27. อุปกรณ์นับเซลล์ (haemacytometer) ของบริษัท Schott Duran, Germany
28. Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไทรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid, TCA) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH) ของบริษัท Merck, Germany
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
4. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
5. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Amersco, USA
6. ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ของบริษัท Thermo Scientific, USA
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Amersco, USA
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
10. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
11. ทู-เมอร์แคบโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
12. แบคโตเปบโทน (Bacto peptone) ของบริษัท Himedia, India
13. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA
14. ผงบลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) ของบริษัท Bronson and Jacobs International, ประเทศไทย
15. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
16. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Himedia, India
17. เมธานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
18. สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Bio Basic, Canada
19. สีบรอมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ของบริษัท Fluka, Switzerland
20. อาหารสำเร็จรูป PDB (Patato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, India
21. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Becton, Dickinson and company, France
22. เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) ของบริษัท Bio Basic, Canada
23. แอซีโตน (acetone) ของบริษัท Merck, Germany
24. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของบริษัท BDH, England
25. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Bio Basic, Canada

26. Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) solution ของบริษัท Amersco, USA
27. DTT (DL-Dithiothreitol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
28. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
29. Tris(hydroxymethyl) aminomethane, ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Research Organics, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษา

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* N3 ได้จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA โดยทิพย์ศิรา ทองพิลา (2554) การเก็บรักษาทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็งเอียง Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 ราก่อโรคพืช

ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ได้รับการอนุเคราะห์จากกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร การเก็บรักษาทำโดยเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเททับด้วย 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

3.4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 และการเตรียมราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

3.4.1.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3

เลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารแข็งเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ย *B. subtilis* N3 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำหัวเชื้อ *B. subtilis* N3 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) pH 7.5 โดยให้ค่าความทึบแสง (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรด้วยชุดกรอง Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ

3.4.1.2 การเตรียมราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

เลี้ยงรา *Bipolaris* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเพื่อไม่ให้อาหารแข็ง จากนั้นผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ที่ผ่านการกรองด้วย Millipore filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 24 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB แทนน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย หลังจากนั้นจึงเทเพลต แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง ตัดราก่อโรคพืชจากข้อ 3.4.1.2 ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วัดการเจริญของราก่อโรคพืชโดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญ และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสูตรต่อไปนี้

$$\text{\% การยับยั้ง} = \left(1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดควบคุม}}\right)\right) \times 100$$

3.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

3.5.1 ศึกษาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3

เลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ทิพย์ศิรา ทองพิลา, 2554) จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 ทั้งหมด 3 ช่วงคือ 0-40% 40-80% และ 80-100% โดยปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้จะดูจากตาราง nomogram (Cutler, 2004) และในระหว่างการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจะเติมทีละน้อยๆพร้อมกับการกวนอย่างช้าๆ เพื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายได้ดีและจับกับโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาแยกตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนได้แต่ละช่วงด้วยสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ในปริมาณที่น้อยที่สุด จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ตกตะกอนได้ โดยการนำตะกอนโปรตีนที่ละลายได้ไปลดปริมาตรน้ำด้วยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) จากนั้นไดแอไลซ์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 เพื่อขจัดเกลือ โดยนำตะกอนโปรตีนใส่ลงในถุงไดแอไลซ์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) และแช่ถุงไดแอไลซ์ที่มีตะกอนโปรตีนใน

สารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร พร้อมทั้งกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ทุกๆ 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายแช่ถุงไดแอไลซ์ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 30% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นวัดความเข้มข้นของโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วจึงนำโปรตีนไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชตามวิธีในข้อ 3.5.3

3.5.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน

วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยชุด Bio-Rad Protein Assay (Bio-rad laboratories, USA) เตรียม dye reagent โดยผสม dye reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 200 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการวัดความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมด้วย dye reagent ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีพร้อมทั้งเขย่าเบาๆตลอดเวลา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 2-10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเพื่อไม่ให้อาหารแข็ง จากนั้นผสมสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนได้ทั้งสามช่วงที่ผ่านการกรองด้วย Millipore filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมจะใช้ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายโปรตีน หลังจากนั้นจึงเทเพลต แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง ตัดราก่อโรคพืชจากข้อ 3.4.1.2 ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วัดการเจริญของราก่อโรคพืชและนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.

3.5.4 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน

ในการทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีนสามารถทำได้โดยนำโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาปรับความเข้มข้นโปรตีนให้เท่ากัน หลังจากนั้นจึงเจือจางความเข้มข้นของโปรตีนแบบลำดับส่วนทีละสองเท่า ตามวิธีของ Mataragas และคณะ (2003) และนำโปรตีนตัวอย่างที่ได้เจือจางความเข้มข้นมาทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยโปรตีนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ สารละลายตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี ดังวิธีในข้อ 3.4.2 และ 3.5.3

และ 3.5.7 ตามลำดับ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ได้จะเปรียบเทียบเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) โดยค่า AU คือส่วนกลับของค่าความเจือจางของโปรตีนตัวอย่างที่สูงที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ใช้ทดสอบได้ จากนั้นคำนวณเป็นค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโปรตีน (AU/มิลลิกรัมโปรตีน) (Barefoot และ Klaenhammer, 1983; Mataragas และคณะ, 2003)

3.5.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี

นำโปรตีนที่ตกตะกอนได้จากข้อ 3.5.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE (Diethylaminoethyl) โดยการเตรียมเจล DEAE ทำได้โดยบรรจุเจลลงในบีกเกอร์หลังจากนั้นใช้แท่งแก้วกวนเบาๆ จากนั้นตั้งไว้เพื่อให้เจลตกตะกอน แล้วจึงเทน้ำส่วนใสด้านบนทิ้งเนื่องจากเป็นเจลที่เสียสภาพ และล้างเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ พร้อมทั้งใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที โดยครั้งสุดท้ายจะล้างด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 จากนั้นบรรจุเจลลงในคอลัมน์และตั้งไว้ข้ามคืน นอกจากนี้สารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนซึ่งประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) และน้ำกลั่นปลอดประจุ จะต้องผ่านการกำจัดฟองอากาศออกให้หมดโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ภายใต้ระบบสุญญากาศ จากนั้นทำให้เจลภายในคอลัมน์อยู่ในภาวะสมดุลด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 และนำโปรตีนที่ตกตะกอนได้จากข้อ 3.5.1 ที่มีแอกทิวิตีปริมาตร 1 มิลลิลิตรบรรจุลงคอลัมน์ของ DEAE และชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 และชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ 0-1000 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 จากนั้นชะโปรตีนที่เหลือในคอลัมน์ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสุดท้ายชะคอมลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ การเก็บตัวอย่างโปรตีนนั้นจะเก็บเป็นลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร และวัดความเข้มข้นของโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และรวมลำดับส่วนในแต่ละช่วงเพื่อนำไปไดแอลิซิสด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 เพื่อขจัดเกลือ โดยนำโปรตีนใส่ลงในถุงไดแอไลซ์และแช่ถุงไดแอไลซ์ที่มีโปรตีนใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร พร้อมทั้งกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายแช่ถุงไดแอไลซ์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 30% กลีเซอรอล เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชเพื่อเลือกลำดับส่วนของโปรตีนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชตามวิธีในข้อ 3.5.7 และนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และประมาณน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ตามวิธีในข้อ 3.5.6

3.5.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

การประมาณน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์สามารถทำได้ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) ขั้นตอนแรกคือทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลที่มีขนาด 8.2x10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.4x10.2 เซนติเมตร ด้วย 95% แอลกอฮอล์ ซึ่งกระจกทั้งสองแผ่นจะมีช่องว่างระหว่างกระจกประมาณ 1.5 มิลลิเมตร จากนั้นประกบแผ่นกระจกเข้าด้วยกัน และประกอบเข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEIN II (Bio-Rad Laboratories, USA) จากนั้นเทสารละลายเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้น 14% ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้

การเตรียมสารละลายเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้น 14% โดยผสมสารต่างๆดังนี้

น้ำกลั่นปลอดประจุ	5.62	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 8)	4.5	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 9)	180	ไมโครลิตร
40% Acrylamide PAGE	5.625	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (ภาคผนวก ข หมายเลข 10)	150	ไมโครลิตร

เติม TEMED 15 ไมโครลิตร เป็นสารสุดท้ายเนื่องจาก TEMED และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตจะทำให้สารละลายเซพาเรติงเจลแข็งตัวเร็ว จากนั้นผสมสารละลายทุกชนิดให้เข้ากัน และเทสารละลายเซพาเรติงเจลลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ให้มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร และเทน้ำกลั่นปลอดประจุลงไปให้ท่วมแผ่นกระจกเพื่อไล่ฟองอากาศและปรับผิวหน้าของเซพาเรติงเจลให้เท่ากัน จากนั้นตั้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อรอให้เซพาเรติงเจลแข็งตัว หลังจากนั้นจึงเทน้ำกลั่นปลอดประจุทิ้งและซับด้วยกระดาษซับ ลำดับต่อมาเตรียมสารละลายสแต็กกิงเจล (stacking gel) ที่มีความเข้มข้น 5% ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้

การเตรียมสารละลายสแต็กกิงเจล (stacking gel) ที่มีความเข้มข้น 5% โดยผสมสารต่างๆดังนี้

น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.8	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 11)	1.25	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 9)	50	ไมโครลิตร
40% Acrylamide PAGE	0.6225	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (ภาคผนวก ข หมายเลข 10)	50	ไมโครลิตร

เติม TEMED 5 ไมโครลิตร เป็นสารสุดท้ายและผสมสารละลายทุกชนิดให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายสแต็กกิงเจลให้ท่วมช่องว่างที่เหลือของกระจก และวางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองแผ่น ตั้งไว้เพื่อรอให้สแต็กกิงเจลแข็งตัว จากนั้นจึงค่อยๆดึงเอาแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างออก ลำดับต่อมานำเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรฟอเรซิส และเติมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ลงในชุดทำอิเล็กโทรฟอเรซิสจนเต็ม

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยผสมโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Thermoscientific PageRuler Prestained Protein Ladder: Cat. No. 26616; Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder: Cat. No. 26634, Lithuania) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 2x denaturing buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง สำหรับการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.5.5 เตรียมโดยนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 200 ไมโครกรัม ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 10% กรดไทรคลอโรอะซีติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงละลายกรดไทรคลอโรอะซีติก ออกจากตะกอนโปรตีนด้วยแอซีโตน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงผสมโปรตีนที่ตกตะกอนได้กับ 1x SDS-PAGE sample buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มโปรตีนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงหยดโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง และทำอิเล็กโทรฟอเรซิสที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเมื่อสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาถึงปลายของแผ่นเจลแล้ว นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก และย้อมสีโปรตีนด้วยสีย้อมคูแมสซีบลู (Coomassie blue staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) โดยแช่แผ่นเจลให้ท่วมด้วยสีย้อมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าเบาๆตลอดเวลา หลังจากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง และครั้งสุดท้ายล้างสีย้อมออกด้วย fix solution (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) ระหว่างการล้างสีย้อมออกจะต้องเขย่าเบาๆตลอดเวลาจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากนั้นจึงหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเพื่อไม่ให้อาหารแข็ง และผสมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้โดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากันเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 9 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นจึงเทเพลต และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง ตัดราก่อโรคพืชจากข้อ 3.4.1.2 ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของราก่อโรคพืชและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งคืออาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5

3.6 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

3.6.1 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของสายใยรา

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเพื่อไม่ให้อาหารแข็ง และผสมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้โดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากันเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 9 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงเทเพลต และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง ตัดราก่อโรคพืชจากข้อ 3.4.1.2 ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของการเจริญของสายใยราโดยเขี่ยสายใยราจากจานเพาะเชื้อมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้

3.6.2 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการงอกของสปอร์รา

เลี้ยงรา *Bipolaris* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์รา 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในชุดทดลองจะผสมสารแขวนลอยของสปอร์รากับโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ โดยปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 100 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ และในชุดควบคุมคือเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) แทนโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปทุกๆ 3 ชั่วโมงหลังจากเติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้

3.7 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ผ่านการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิสจากข้อ 3.5.6 มาวิเคราะห์ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด โดยตัดแถบของโปรตีนที่ปรากฏจากอะคริลาไมด์เจลใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอด

ประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อไม่ให้เจลแห้ง จากนั้นส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS แบบ Q-ToF) โดยใช้บริการของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI (The National Center for Biotechnology Information) เพื่อระบุว่าเป็นโปรตีนชนิดใด

3.8 การหาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์

นำโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากวิธีในข้อ 3.5.5 มาปรับความเข้มข้นโปรตีนแบบลำดับส่วนให้เท่ากับ 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00313, 0.00156, และ 0.00078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำโปรตีนไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชตามวิธีในข้อ 3.5.7 และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้นโปรตีน เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์

3.9 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด

3.9.1 การเตรียมใบข้าวโพด

คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่มีความสมบูรณ์คือไม่มีโรคและบาดแผล จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพันธุ์ด้วย 0.5% NaOCl เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง (Zhang และคณะ, 2013) หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์มาแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีการงอกของรากประมาณ 1 เซนติเมตร และปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และปลอดเชื้อ รดน้ำวันละ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตเป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ โดยในแต่ละกระถางจะประกอบด้วยข้าวโพด 1 เมล็ด

3.9.2 การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคพืชที่จะใช้ทดสอบ

เลี้ยงรา *Bipolaris* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์รา 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้

3.9.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด

ในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ จะทำการทดลองบริเวณใบของต้นข้าวโพด โดยคัดเลือกต้นข้าวโพดที่มีใบที่ปราศจากโรคและไม่มีบาดแผลจากข้อ 3.9.1 ตัดใบข้าวโพดให้มีความยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร โดยแต่ละการทดลองจะทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำ

บริสุทธิ์ได้ โดยทำให้ใบข้าวโพดเกิดบาดแผลที่บริเวณกึ่งกลางของใบโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารแขวนลอยของสปอร์รา 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนบริเวณบาดแผล และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.5.5 โดยปรับความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ให้เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณที่เกิดบาดแผล จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งวัดความกว้างของบาดแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือเติมน้ำกลั่นแทนโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ และชุดควบคุมผลบวกคือเติมเฉพาะสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคพืช

3.9.4 การทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในใบข้าวโพด

ในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ จะทำการทดลองบริเวณใบของต้นข้าวโพด โดยคัดเลือกต้นข้าวโพดที่มีใบที่ปราศจากโรคและไม่มีบาดแผลจากข้อ 3.9.1 ตัดใบข้าวโพดให้มีความยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร โดยแต่ละการทดลองจะทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง โดยขั้นตอนแรกจะทำให้ใบข้าวโพดเกิดบาดแผลที่บริเวณกึ่งกลางของใบโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ จากนั้นเติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.5.5 โดยปรับความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ให้เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณที่เกิดบาดแผล และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารแขวนลอยของสปอร์รา 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนบริเวณที่เกิดบาดแผล นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งวัดความกว้างของบาดแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือเติมน้ำกลั่นแทนโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ และชุดควบคุมผลบวกคือเติมเฉพาะสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคพืช

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ สถิติพรรณนา (Descriptive statistics) ในการคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดลองแต่ละขั้นตอน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยวิธีการกรองน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย Millipore filter โดยเลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB) pH 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกและนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรด้วยชุดกรอง Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นจึงผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 24 มิลลิลิตร เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัดราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชกับชุดควบคุมคือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นวัดการเจริญของราก่อโรคพืชโดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญ จากการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\%\ \text{การยับยั้ง} = \left(1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดควบคุม}}\right)\right) \times 100$$

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 65.56±0.21 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp.

ราก่อโรคพืช	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
Bipolaris sp.			65.56±0.21

4.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

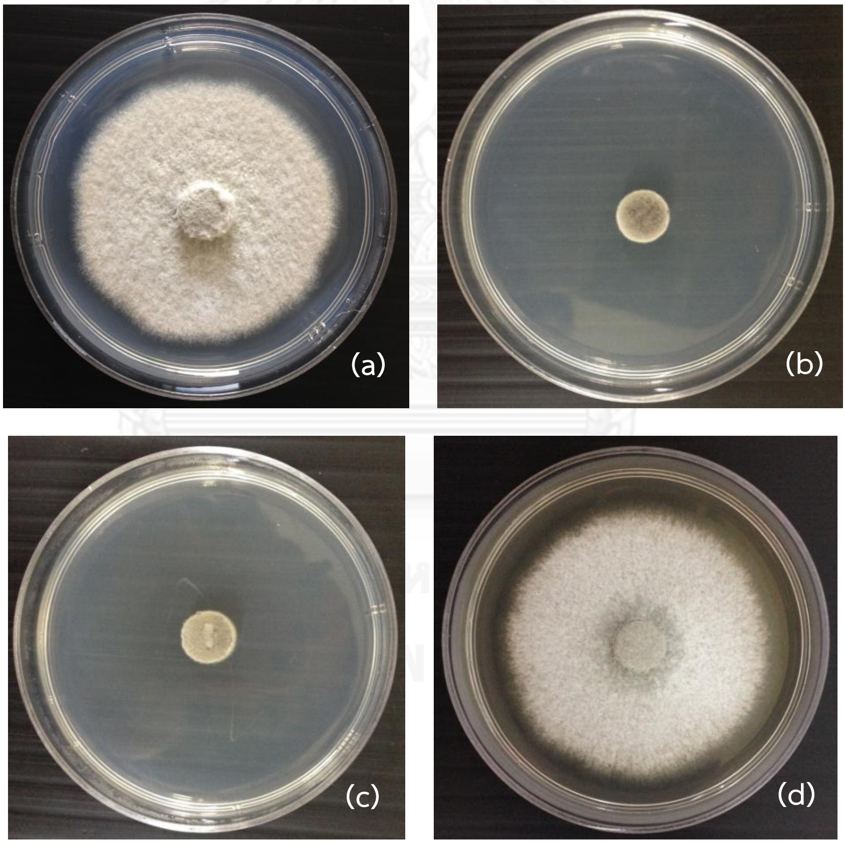
4.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB) pH 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* N3 ทั้งหมด 3 ช่วงคือ 0-40%, 40-80% และ 80-100% จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนได้แต่ละช่วงด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุด และเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายตะกอนโปรตีนโดยการลดปริมาตรน้ำด้วยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) สุดท้ายนำเกลือออกจากสารละลายตะกอนโปรตีนด้วยวิธีไดแอลิซิส จากนั้นจึงนำสารละลายตะกอนโปรตีนไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยผสมสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนได้จากทั้งสามช่วง ที่ผ่านการกรองด้วย Millipore filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมจะใช้ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจึงตัดราก่อโรคพืชด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วัดการเจริญของราก่อโรคพืช จากการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 พบว่าสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยสารละลายตะกอนโปรตีนทั้งสองช่วงมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากันคือ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 65.56 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% เท่ากับ 5.97 และ 17.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และพบว่าในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนในช่วง 80-100% นั้น ตะกอนโปรตีนในช่วงนี้มีปริมาณที่น้อยมาก จึงไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช ดังนั้นสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% จึงเหมาะสมในการนำไปแยกและทำบริสุทธิ์ต่อไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.2 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40%, 40-80% และ 80-100% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5)

แอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
0-40	1±0	80
40-80	1±0	80
80-100	5±0	0



รูปที่ 4.1 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% (b), 40-80% (c), และ 80-100% (d) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5) ที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 เซนติเมตร (a)

เมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 และสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% และ 40-80% พบว่ามีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 1.62, 5.97 และ 17.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดพบว่ามีค่าเท่ากับ 16186.96, 238.92 และ 797.18 มิลลิกรัมตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อ และสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ไปทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. พบว่าสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต มีแอกทิวิตีเท่ากันคือ 2048 AU/มิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้มากกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 128 AU/มิลลิลิตร นอกจากนั้นเมื่อคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะของโปรตีนในแต่ละช่วงพบว่า สารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าเท่ากับ 342.88 และ 118.18 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งมีค่ามากกว่าน้ำเชื้อเลี้ยงที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 79.08 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน และเมื่อคำนวณค่าแอกทิวิตีรวมพบว่าสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าเท่ากับ 81920 และ 94208 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าแอกทิวิตีรวมเท่ากับ 1280000 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.3

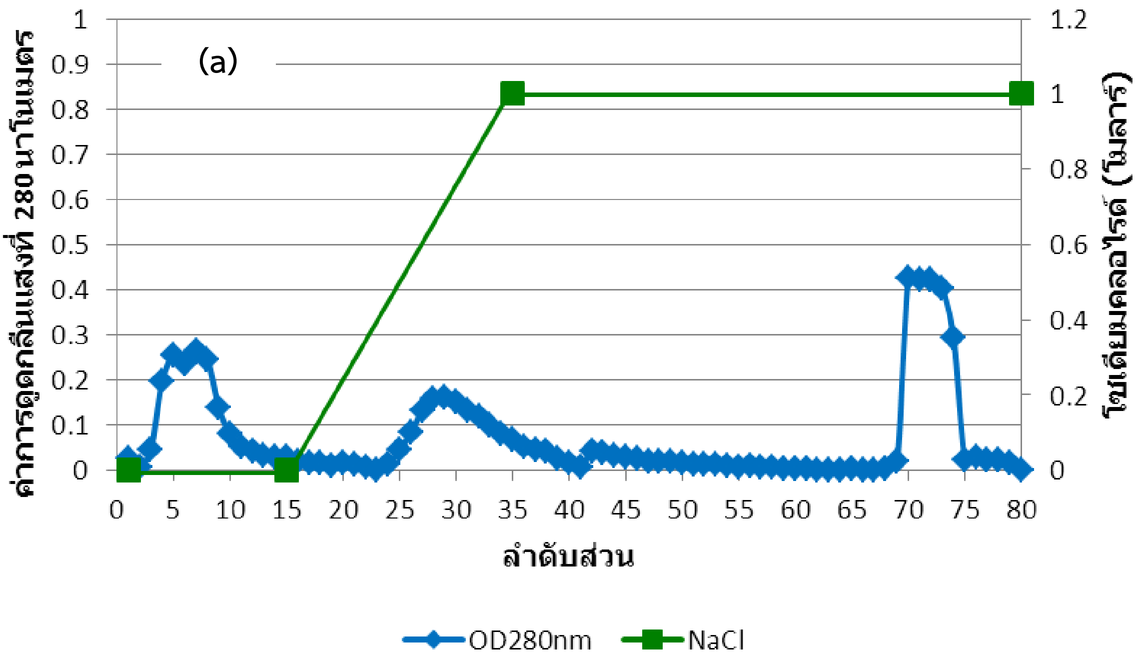
ตารางที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 และสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต

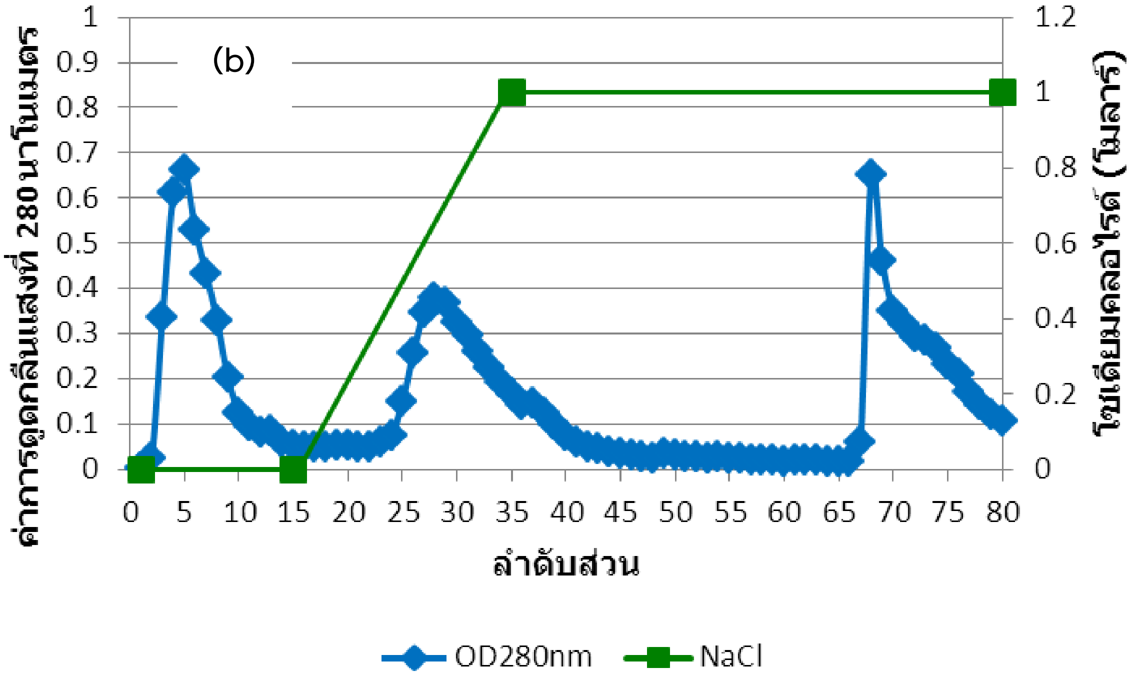
ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
น้ำเลี้ยงเชื้อ	10000	1.62	16186.96	128	79.08	1280000	1.00
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-40%	40	5.97	238.92	2048	342.88	81920	4.34
แอมโมเนียมซัลเฟต 40-80%	46	17.33	797.18	2048	118.18	94208	1.49

4.2.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี

ขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี ทำได้โดยนำสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.97 และ 17.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE (Diethylaminoethyl) ซึ่งสารตัวกลางนี้ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนประจุลบ ตามวิธีในข้อ 3.5.5 จากนั้นชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 และชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ 0-1000 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 การเก็บตัวอย่างโปรตีนจะเก็บเป็นลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร และวัดความเข้มข้นของโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และรวมลำดับส่วนเป็นช่วง ช่วงละ 4-6 ลำดับส่วน เพื่อนำไปขจัดเกลือด้วยวิธีไดแอลิซิส หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชเพื่อเลือกช่วงของลำดับส่วนโปรตีนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ผลการทดลองแสดงดังนี้ เมื่อนำสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง (a และ b) แต่ละครั้งของการทดลองจะเติมสารละลายตะกอนโปรตีนที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรด้วยชุดกรอง Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นรวมช่วงลำดับส่วนของโปรตีนที่อยู่ในช่วงระหว่างและหลัง linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 โดยกำหนดให้แต่ละช่วงประกอบด้วย 4-6 ลำดับส่วน ดังนี้ ช่วงลำดับส่วนที่ 25-28, 29-32, 33-36, 37-40, และ 41-45 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (a) และช่วงลำดับส่วนที่ 25-29, 30-35, 36-40, และ 41-45 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (b)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



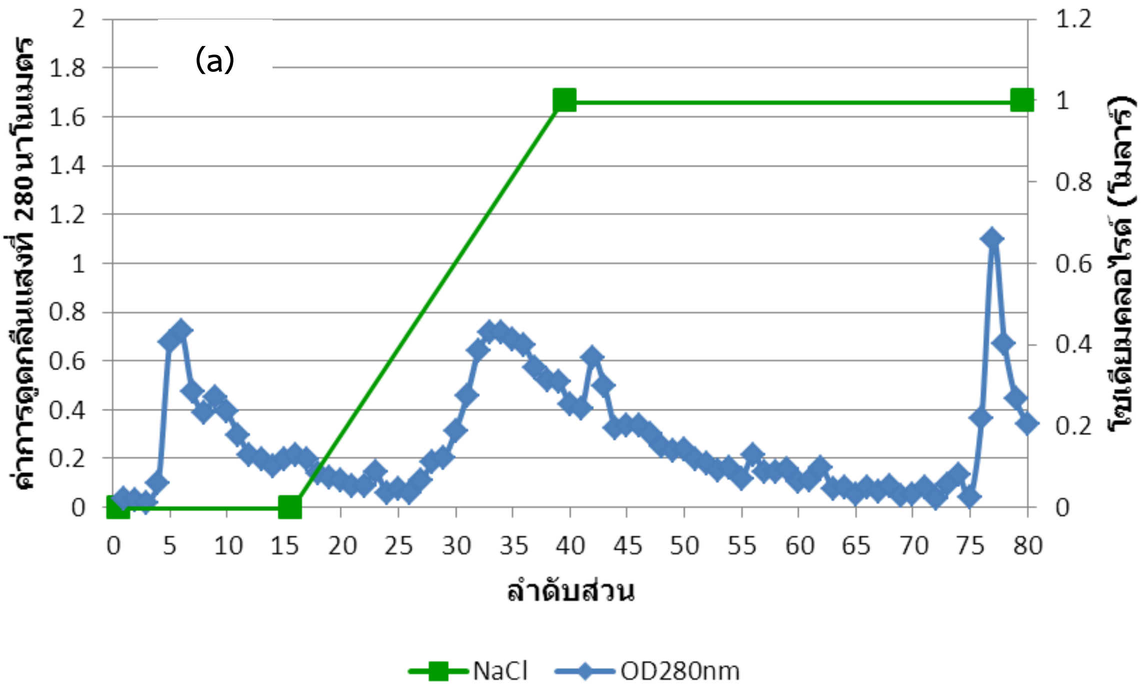


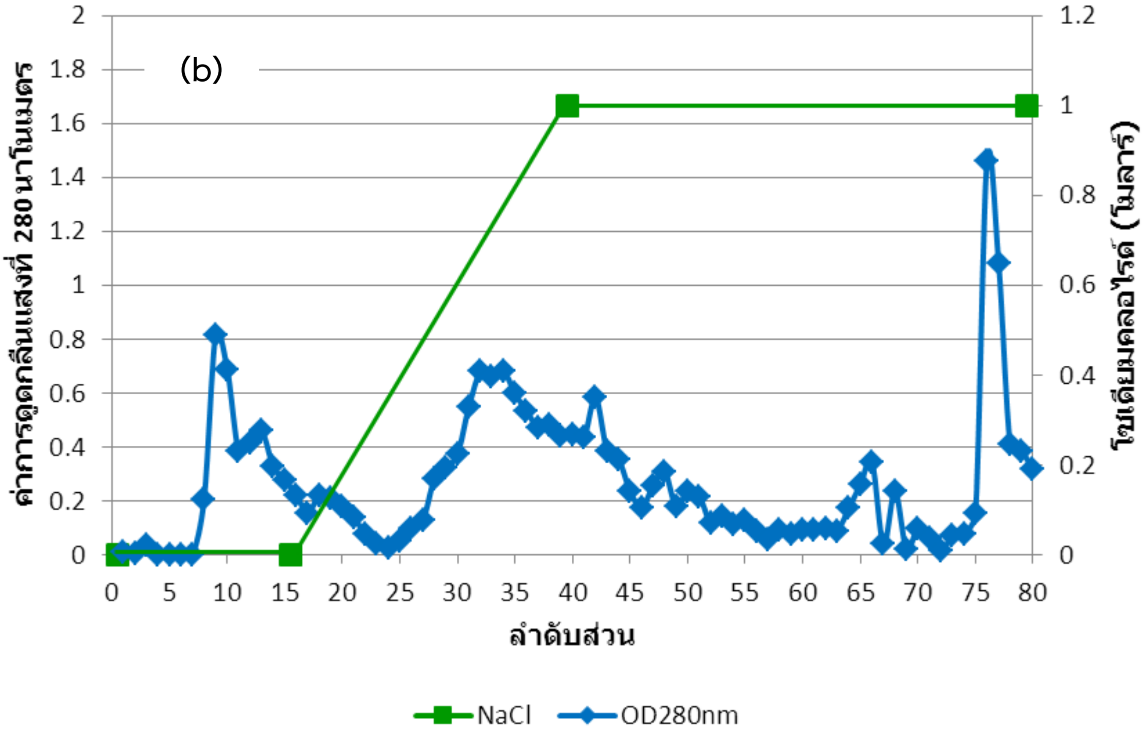
รูปที่ 4.2 (a และ b) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของลำดับส่วนต่างๆของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ซึ่งชะโปรตีนด้วย linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5

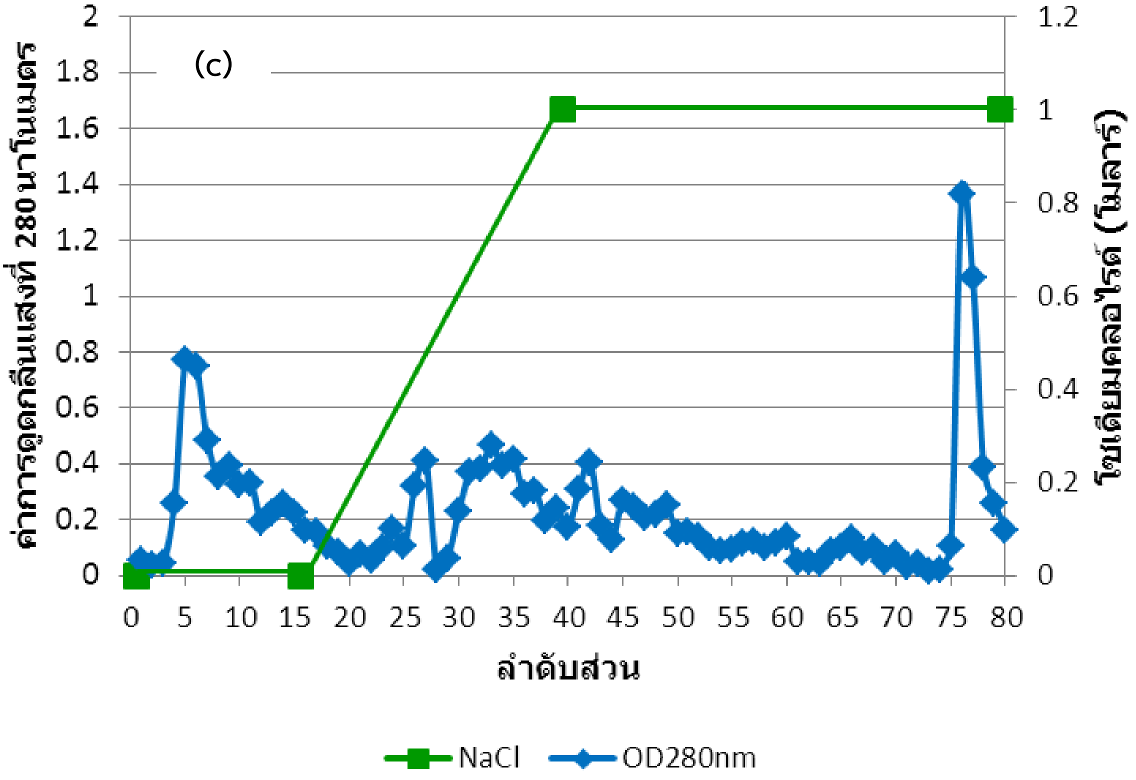
จากนั้นนำโปรตีนในแต่ละช่วงไปขจัดเกลือด้วยวิธีไดแอลิซิส และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ตามวิธีในข้อ 3.5.7 พบว่าช่วงลำดับส่วนที่ 33-36, 37-40, 30-35, และ 36-40 สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 17.50, 25.00, 11.11, และ 2.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ช่วงลำดับส่วนอื่นๆไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ เนื่องจากพบว่าสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE นั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ค่อนข้างต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่ได้นำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ลำดับต่อไปจึงนำสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 17.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง (a, b และ c) แต่ละครั้งของการทดลองจะเติมสารละลายตะกอนโปรตีนที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรด้วยชุดกรอง Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นรวมช่วงลำดับส่วนของโปรตีนที่อยู่ในช่วงระหว่างและหลัง linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 โดยกำหนดให้แต่ละช่วงประกอบด้วย 4-6 ลำดับส่วน ดังนี้ ช่วงลำดับส่วนที่ 15-18, 21-24, 32-35, 41-44, 45-48, และ 49-52 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 (a) และรูปที่ 4.3 (b) แสดงช่วงลำดับส่วนที่ 28-32, 33-38, 39-44, 45-50, 51-55, และ 56-60 และรูปที่ 4.3 (c) แสดงช่วงลำดับส่วนที่ 25-28, 29-34, 35-39, 40-44, 45-50, และ 51-55 จากนั้นนำโปรตีนในแต่ละช่วงลำดับส่วนไปขจัดเกลือด้วยวิธีไดแอลิซิส และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ตามวิธีในข้อ 3.5.7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University


(a)
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
โซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)
ลำดับส่วน
NaCl
OD280nm


(b)
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
โซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)
ลำดับส่วน
NaCl
OD280nm

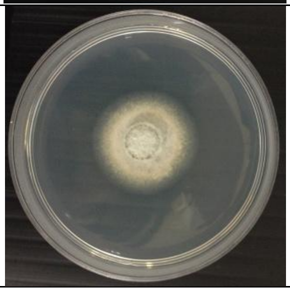


รูปที่ 4.3 (a, b, และ c) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของลำดับส่วนต่างๆของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ซึ่งชะโปรตีนด้วย linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5

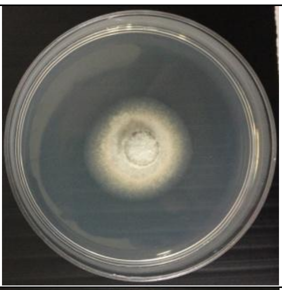
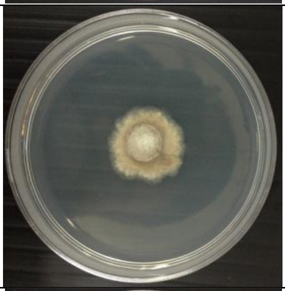
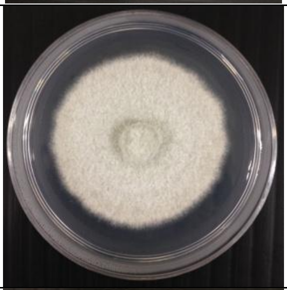
จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของช่วงลำดับส่วนของโปรตีนจากสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE พบว่าโปรตีนในแต่ละช่วงลำดับส่วนทั้งระหว่างและหลัง linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีกว่าโปรตีนจากสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ในการทดสอบนั้นมีช่วงลำดับส่วน 2 ช่วงที่ปริมาตรสุดท้ายไม่เพียงพอต่อการทดสอบคือ ช่วงลำดับส่วนที่ 21-24 (ตัวอย่างที่ 23) และ 25-28 (ตัวอย่างที่ 34) ช่วงลำดับส่วนโปรตีนที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 8 ช่วงลำดับส่วนแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งประกอบด้วย ช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28), 51-55 (ตัวอย่างที่ 32), 51-55 (ตัวอย่างที่ 39), 45-50 (ตัวอย่างที่ 38), 45-48 (ตัวอย่างที่ 26), 40-44 (ตัวอย่างที่ 37), 45-50 (ตัวอย่างที่ 31), และ 29-34 (ตัวอย่างที่ 35) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71, 70, 66, 62, 59, 59, 58, และ 57% ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนของแต่ละช่วงลำดับส่วนพบว่ามีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.50, 0.39, 0.54, 0.40, 0.38, 1.07, 0.36, และ 0.74 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 129.22, 164.66, 118.43, 159.61, 166.41, 60.08, 177.79, และ 86.82 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน หลังจากทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชจากช่วงลำดับส่วนทั้ง 8 อันดับ พบว่าช่วงลำดับส่วนที่ 45-48 (26), ช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (31), ช่วงลำดับส่วนที่ 51-55 (ตัวอย่างที่ 32), ช่วงลำดับส่วนที่ 29-34 (35), และช่วงลำดับส่วนที่ 51-55 (ตัวอย่างที่ 39) มีปริมาตรสุดท้ายไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะช่วงลำดับส่วนโปรตีนที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28), 40-44 (ตัวอย่างที่ 37), และ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิสต่อไป

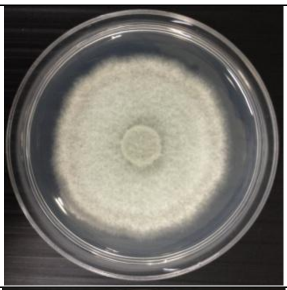
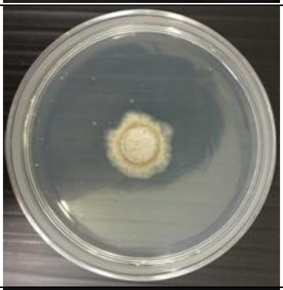
ตารางที่ 4.4 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของช่วงลำดับส่วนจากสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE

ตัวอย่าง	ช่วงลำดับส่วน	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ภาพแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม	-	5.00±0.00	0	
22	15-18	2.90±0.14	42	

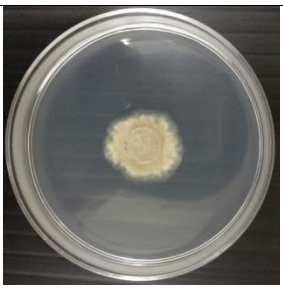
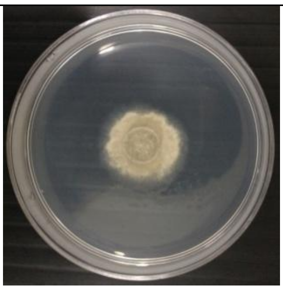
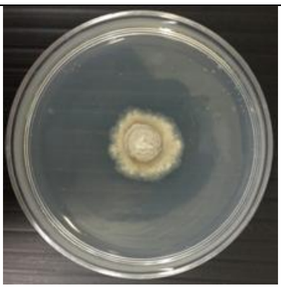
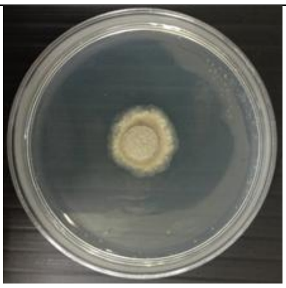
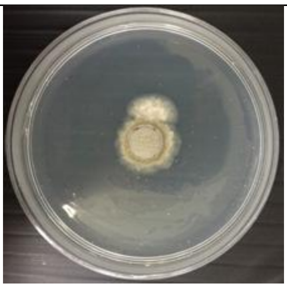
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตัวอย่าง	ช่วงลำดับส่วน	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ภาพแสดงการยับยั้ง
24	32-35	2.95±0.07	41	
25	41-44	2.20±0.00	56	
26	45-48	2.05±0.21	59	
27	49-52	4.85±0.07	3	
28	28-32	1.45±0.35	71	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตัวอย่าง	ช่วงลำดับส่วน	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ภาพแสดงการยับยั้ง
29	33-38	5.00±0.00	0	
30	39-44	2.95±0.07	41	
31	45-50	2.10±0.00	58	
32	51-55	1.50±0.42	70	
33	56-60	4.50±0.00	10	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตัวอย่าง	ช่วงลำดับส่วน	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ภาพแสดงการยับยั้ง
35	29-34	2.15±0.21	57	
36	35-39	2.40±0.57	52	
37	40-44	2.05±0.07	59	
38	45-50	1.90±0.00	62	
39	51-55	1.70±0.71	66	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 สารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 0-40% และ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต และลำดับส่วนของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE

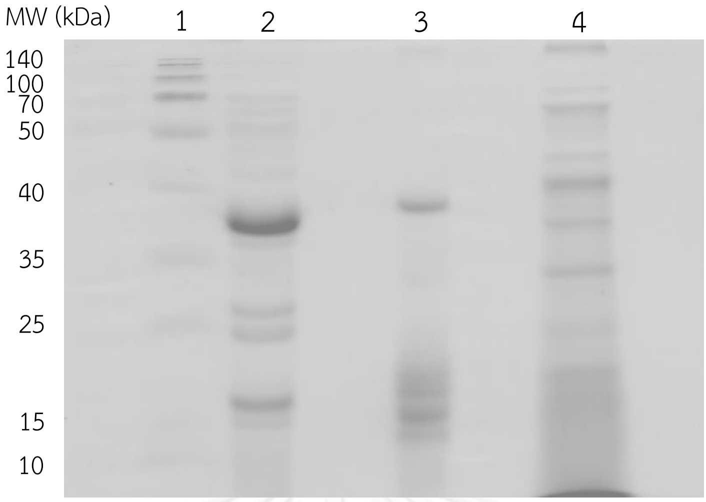
ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
น้ำเลี้ยงเชื้อ	10000	1.62	16186.96	128	79.08	1280000	1.00
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-40%	40	5.97	238.92	2048	342.88	81920	4.34
แอมโมเนียมซัลเฟต 40-80%	46	17.33	797.18	2048	118.18	94208	1.49
ลำดับส่วนที่ 45-48 (26)	2	0.38	0.77	64	166.41	128	2.10
ลำดับส่วนที่ 28-32 (28)	1.5	0.50	0.74	64	129.22	96	1.63
ลำดับส่วนที่ 45-50 (31)	2	0.36	0.72	64	177.79	128	2.25
ลำดับส่วนที่ 51-55 (32)	2	0.39	0.78	64	164.66	128	2.08
ลำดับส่วนที่ 29-34 (35)	2	0.74	1.47	64	86.82	128	1.10
ลำดับส่วนที่ 40-44 (37)	2	1.07	2.13	64	60.08	128	0.76
ลำดับส่วนที่ 45-50 (38)	2.5	0.40	1.00	64	159.61	160	2.02
ลำดับส่วนที่ 51-55 (39)	2	0.54	1.08	64	118.43	128	1.50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

นำโปรตีนจากช่วงลำดับส่วนทั้ง 3 ช่วงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE จากสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วง 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟต มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส โดยนำโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 10% กรดไทรคลอโรอะซีติก และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้โดยเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Thermoscientific PageRuler Prestained Protein Ladder: Cat. No. 26616, Lithuania) พบว่าโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และสารละลายตะกอนโปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% และ 40-80% แสดงแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (a) ในขณะที่โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE แสดงแถบโปรตีนลดลง โดยพบว่าโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28) มีแถบโปรตีนที่ชัดเจน 2 แถบ และเมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60.29 และ 32.90 kDa และในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37) พบแถบโปรตีนที่ชัดเจน 4 แถบ แต่ละแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68.98, 54.50, 50.11, และ 34.03 kDa ตามลำดับ และในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) พบแถบโปรตีนที่มองเห็นได้ 1 แถบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34.61 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (b) ดังนั้นจึงตัดแต่ละแถบของโปรตีนที่ปรากฏบนอะคริลาไมด์เจลทั้งหมด ส่งวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS แบบ Q-ToF) ในขั้นตอนต่อไป

สำหรับในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคพืชในใบข้าวโพดนั้น จะเลือกเฉพาะโปรตีนจากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) เท่านั้น เนื่องจากปรากฏโปรตีนที่มองเห็นได้เพียงแถบเดียวจากการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส



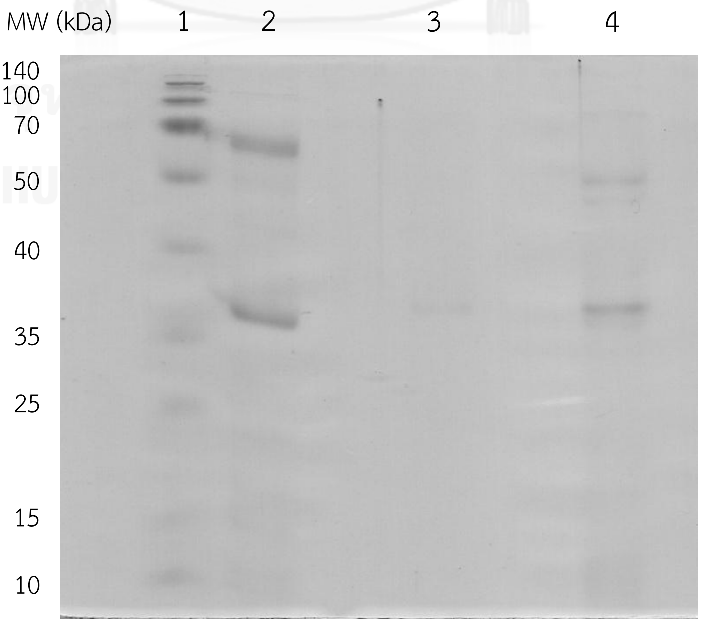
รูปที่ 4.4 (a) แสดงการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

ช่องที่ 2 โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3

ช่องที่ 3 โปรตีนจากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40%

ช่องที่ 4 โปรตีนจากสารละลายตะกอนโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80%



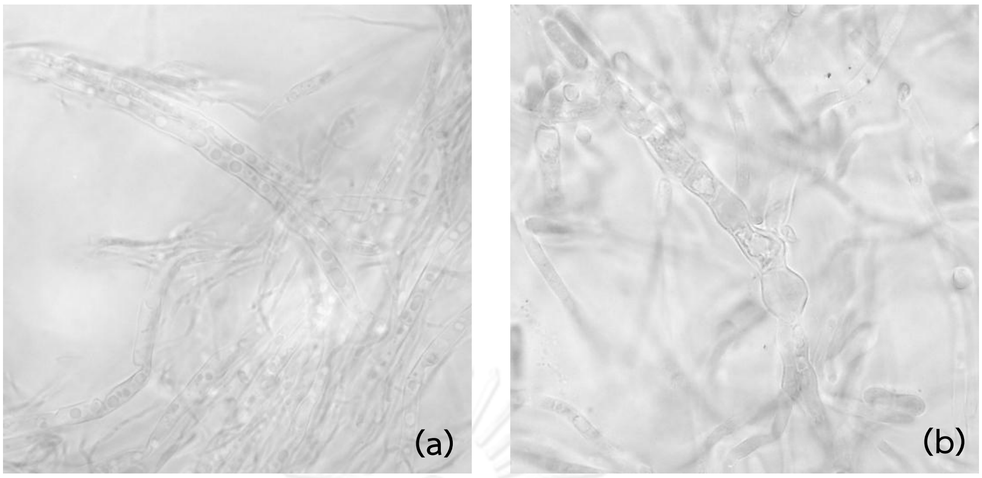
รูปที่ 4.4 (b) แสดงการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
ช่องที่ 2 โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% และ DEAE ในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28)
ช่องที่ 3 โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% และ DEAE ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38)
ช่องที่ 4 โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% และ DEAE ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37)

4.3 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

4.3.1 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของสายใยรา

เมื่อศึกษาผลของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ต่อลักษณะของสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. โดยปรับความเข้มข้นของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ให้เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมโปรตีนกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปราศจากเชื้อในปริมาตร 1 และ 9 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาเทเพลตพร้อมทั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง หลังจากนั้นตัดราก่อโรค จากข้อ 3.4.1.2 ด้วย cork borer ขนาด 9 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลตไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ จากนั้นเขี่ยสายใยราจากจานเพาะเชื้อมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าสายใยราในชุดควบคุมที่ไม่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์นั้น สายใยรามีการเจริญปกติ โดยผนังของสายใยเรียบ ไม่บวมและโป่งพอง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (a) ซึ่งแตกต่างกับสายใยราในชุดทดลองที่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ได้ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) โดยพบว่าสายใยรามีการเจริญแตกต่างจากชุดควบคุม โดยสายใยมีลักษณะบวมและโป่งพอง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (b) ดังนั้นจากผลการทดลองจะพบว่าโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) นั้นมีผลต่อการเจริญของสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.

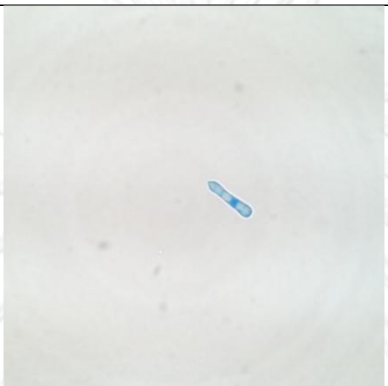
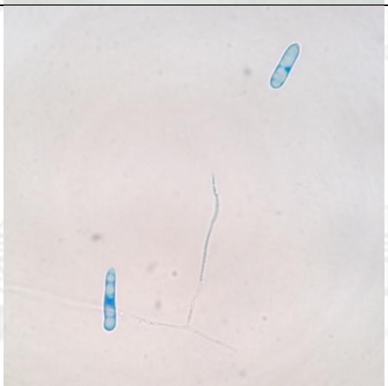


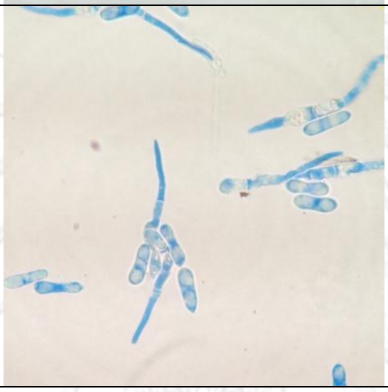
รูปที่ 4.5 (a และ b) แสดงลักษณะของสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยชุดควบคุมจะไม่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ (a) และชุดทดลองที่เติมโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b)

4.3.2 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการงอกของสปอร์รา

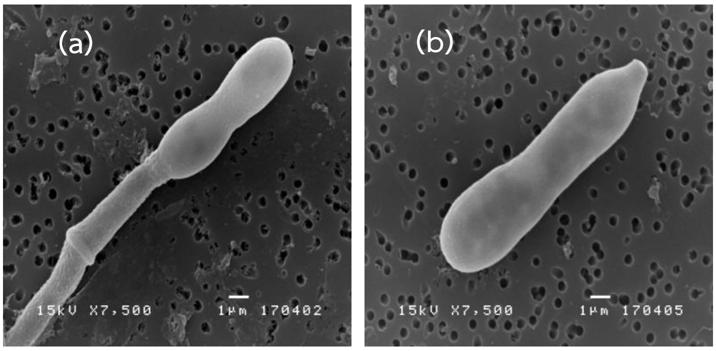
เมื่อนำสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาผสมกับโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB แทนโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าสปอร์ของราในชุดควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB หลังบ่มเป็นเวลา 0-3 ชั่วโมงยังไม่พบการงอกของสปอร์ แต่เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงพบว่าสปอร์เริ่มงอกออกมาเล็กน้อย และหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงพบว่าสายใยราที่งอกออกจากสปอร์เรียงตัวเป็นสายยาวมากขึ้น ซึ่งแตกต่างกับในชุดทดลองที่เติมโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ ที่พบว่าหลังบ่มไว้เป็นเวลา 0-12 ชั่วโมงพบว่ายังไม่ปรากฏการงอกของสปอร์เกิดขึ้น แต่หลังจากบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสปอร์เริ่มงอกออกมาเล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยชุดควบคุมมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และชุดทดลองมีโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	**ชุดควบคุม**	**ชุดทดลอง**
0		
3		
6		

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
12		
24		

นอกจากนี้เมื่อศึกษาลักษณะของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังบ่มสปอร์ด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในชุดทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่บ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าในชุดควบคุมสปอร์ส่วนใหญ่เกิดการงอกของสายใยปกติ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (a) แตกต่างจากชุดทดลองที่ไม่พบการงอกของสปอร์ และสปอร์มีอาการบวม ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (b)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของสปอร์ราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยชุดควบคุมมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (a) และชุดทดลองมีโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จากช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (b)

4.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคพืช

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคพืช จากโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE แล้วผ่านการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิสนั้นสามารถวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนได้ โดยตัดแต่ละแถบของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ปรากฏบนอะคริลาไมด์เจลใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมน้ำกลั่นปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อไม่ให้เจลแห้ง จากนั้นส่งวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS แบบ Q-ToF) โดยใช้บริการของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI (The National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม Mascot (http://www.matrixscience.com) เพื่อระบุเอกลักษณ์ของโปรตีน และเมื่อพิจารณาคะแนนความใกล้เคียงของลำดับเพปไทด์ (p<0.05) พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ช่วงลำดับส่วนมีลำดับของเพปไทด์ใกล้เคียงกับโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. โดยมีรายละเอียดของโปรตีนที่ใกล้เคียงที่สุดดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการวิเคราะห์แถบของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี LC/MS/MS แบบ Q-ToF

ช่วงลำดับส่วนของโปรตีน	ตัวอย่างที่	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	Accession number [1]	ชื่อโปรตีน	สิ่งมีชีวิต	% Sequence coverage [2]	Score [3]
28-32	28	60.29	gi|549696214	แอลฟา-อะไมเลส พรีเคอร์เซอร์ (alpha-amylase precursor)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	40	1341
28-32	28	32.90	gi|384267502	พูเททีพ ดับเบิลยูดี รีพีท คอนเทนนิง โปรตีน (putative WD repeat-containing protein)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2	31	659
28-32	28	32.90	gi|384264562	ฟอสโฟเซรีน อะมิโนทรานสเฟอเรส (phosphoserine aminotransferase)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2	27	444
40-44	37	68.98	gi|494888363	ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase)	*Bacillus* sp. 5B6	10	497
40-44	37	68.98	gi|452857429	เอกซ์ตราเซลลูลาร์ เซรีน โปรตีเอส (extracellular serine protease)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036	14	497
40-44	37	54.50	gi|154685878	ไดไฮโดรลิโพเอไมด์ ดีไฮโดรจีเนส (dihydrolipoamide dehydrogenase)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42	44	1263
40-44	37	50.11	gi|384265809	คาร์บอกซีเพปทิเดส แทก (carboxypeptidase Taq)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2	46	1062

ช่วงลำดับส่วนของโปรตีน	ตัวอย่างที่	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	Accession number [1]	ชื่อโปรตีน	สิ่งมีชีวิต	% Sequence coverage [2]	Score [3]
40-44	37	50.11	gi|375363628	ลูซิล อะมิโนเพปทิเดส (leucyl aminopeptidase)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946	38	774
40-44	37	34.03	gi|549699392	แฟลกเจลลิน เอ (Flagellin A)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3	71	1383
45-50	38	34.61	gi|549699392	แฟลกเจลลิน เอ (Flagellin A)	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3	52	984

[1] Accession number คือหมายเลขเข้าถึงของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI

[2] % Sequence coverage หมายถึงเปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกันกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล NCBI

[3] Score คือ MASCOT score ของโปรตีนที่สืบค้นได้ โดยคะแนนต่ำสุดที่ยอมรับได้สำหรับฐานข้อมูล NCBI (significant; $p < 0.05$) คือ 69

ผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ของโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28) ที่มีแถบโปรตีน 2 แถบ พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60.29 kDa มีลำดับของรูปแบบลายพิมพ์เพปไทด์ใกล้เคียงกับโปรตีนแอลฟา-อะไมเลส พรีเคอร์เซอร์ (gi|549696214) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.1 โดยมีคะแนนเท่ากับ 1341 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 40% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.2 และแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.90 kDa เมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนพบว่าลำดับของเพปไทด์ของโปรตีนมีความใกล้เคียงกับ พูเททีพ ดับเบิลยูดี รีพีท คอนเทนนิง โปรตีน (gi|384267502) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.3 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 659 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 31% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.4 และอันดับรองลงมามีคะแนนความใกล้เคียงกับโปรตีนฟอสโฟเซรีน อะมิโนทรานสเฟอ

เรส (gi|384264562) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.3 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 444 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 27% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.4

ผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ของโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37) ทั้ง 4 แถบโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 68.98 kDa เมื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนพบว่าลำดับเพปไทด์ของโปรตีนมีความใกล้เคียงกับโปรตีนไนเตรตรีดักเทส (gi|494888363) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. 5B6 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.5 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 497 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 10% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.6 และอันดับรองลงมามีคะแนนความใกล้เคียงกับโปรตีนเอกซ์ตราเซลลูลาร์ เซรินโปรตีเอส (gi|452857429) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.5 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 497 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 14% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.6 แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 54.50 kDa พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนไดไฮโดรลิโพเอไมด์ ดีไฮโดรจีเนส (gi|154685878) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.7 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 1263 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 44% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.8 แถบโปรตีนถัดไปที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 50.11 kDa พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนคาร์บอกซีเพปทิเดส แทก(gi|384265809) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.9 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 1062 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 46% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.10 และอันดับรองลงมามีคะแนนความใกล้เคียงกับโปรตีนลูซิล อะมิโนเพปทิเดส (gi|375363628) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946) ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.9 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 774 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 38% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.10 และแถบโปรตีนสุดท้ายที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 34.03 kDa พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอ (gi|549699392) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.11 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 1383 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 71% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.12

ผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ของโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่มีการแสดงออกของแถบโปรตีน 1 แถบนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 34.61 kDa และเมื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนพบว่าลำดับของเพปไทด์ของโปรตีนมีความใกล้เคียงกับโปรตีนแฟลกเจลลิน เอ

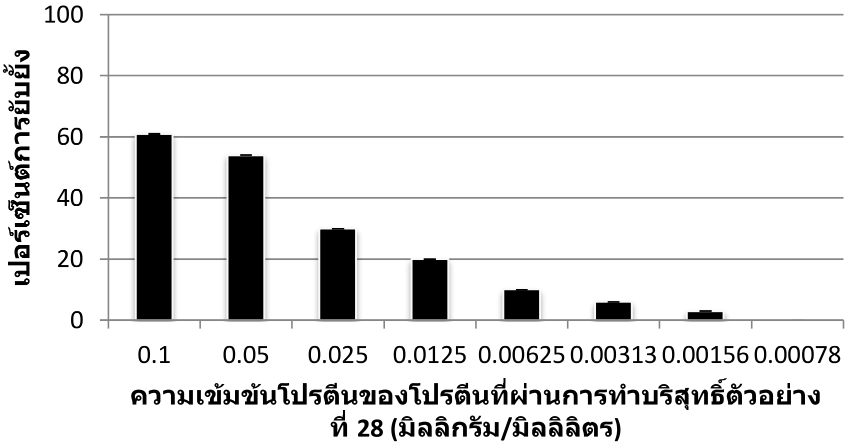
(gi|549699392) ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3 ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.13 โดยมีคะแนนความใกล้เคียงเท่ากับ 984 และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเพปไทด์เท่ากับ 52% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.14

4.5 การหาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์

นำโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้มาเจือจางความเข้มข้นโปรตีนแบบลำดับส่วนให้เท่ากับ 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00313, 0.00156, และ 0.00078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำโปรตีนไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชตามวิธีในข้อ 3.5.7 โดยวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้นของโปรตีน และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์จากสมการกราฟเส้นตรง พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38 ที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์คือ 0.045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ที่ถูกยับยั้งโดยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38	0.1	1.95±0.07	61
	0.05	2.30±0.00	54
	0.025	3.50±0.00	30
	0.0125	4.00±0.00	20
	0.00625	4.50±0.00	10
	0.00313	4.70±0.00	6
	0.00156	4.85±0.07	3
	0.00078	5.00±0.00	0



รูปที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. โดยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ 38 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้บนใบข้าวโพด

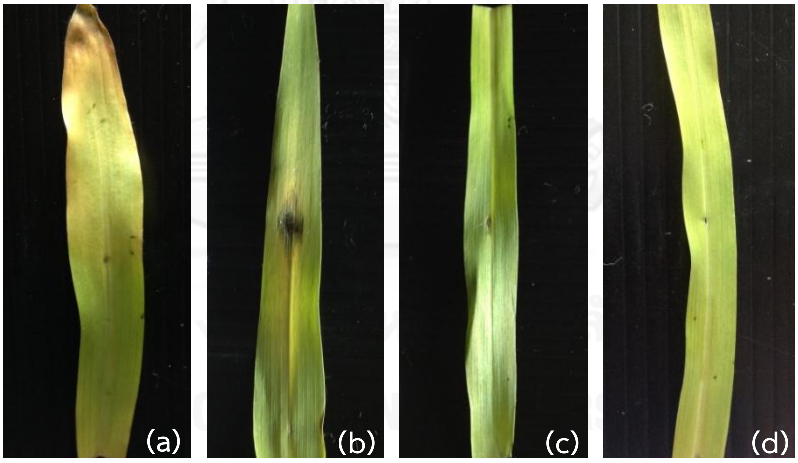
ในการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) ได้ปฏิบัติในสองแนวทาง แนวทางแรกทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนดังกล่าวซึ่งทำโดยทำให้ใบข้าวโพดเกิดรอยโรคที่บริเวณกึ่งกลางของใบโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ จากนั้นใส่สารแขวนลอยของสปอร์ราลงบนบริเวณรอยโรค และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่โปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงบนบริเวณที่เกิดรอยโรค ส่วนแนวทางที่สองทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ซึ่งปฏิบัติโดยใส่โปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ลงบนใบข้าวโพดก่อนใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช ทั้งสองแนวทางเมื่อใส่ส่วนประกอบต่างๆครบแล้วได้บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นวัดความยาวของรอยโรคที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือใส่เฉพาะน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมผลบวกคือใส่เฉพาะสปอร์ราก่อโรคพืช

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.8 พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ของตัวอย่างที่ 38 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันราก่อโรคพืช โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกพบว่าสปอร์ราก่อโรคพืชทำให้ใบข้าวโพดเกิดรอยโรคที่มีความยาวเท่ากับ 1.23±0.25 เซนติเมตร และชุดควบคุมผลลบที่มีความยาวของรอยโรคเท่ากับ 0.10±0.00 ในขณะที่โปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ ช่วยลดการเกิดรอยโรคจากสปอร์ราก่อโรคพืช โดยพบว่ามีความยาวของรอยโรคเท่ากับ 0.27±0.06 เซนติเมตร ดังนั้นโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดรอยโรคจากราก่อโรคพืช โดยความยาวของรอยโรคลดลง 0.96 เซนติเมตร ซึ่งเทียบเท่ากับลดลง

ถึง 78% นอกจากนี้พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคพืชได้ดียิ่ง โดยจากผลการทดลองพบว่าความยาวของรอยโรคในการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้มีค่าเท่ากับ 0.13 เซนติเมตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมผลลบ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้มีประสิทธิภาพในการป้องกันราก่อโรคพืช โดยความยาวของรอยโรคลดลง 1.1 เซนติเมตร ซึ่งเทียบเท่ากับลดลงได้มากกว่า 89%

ตารางที่ 4.9 แสดงความยาวของรอยโรคบริเวณใบของข้าวโพดหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรค หลังบ่มเป็นเวลา 5 วัน

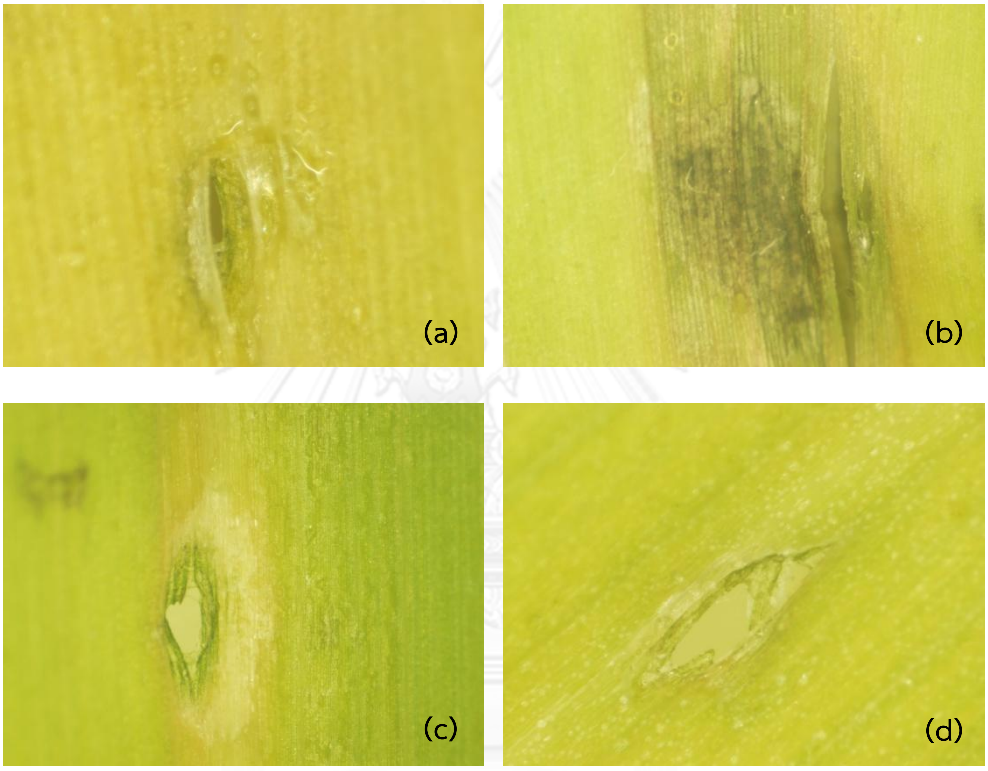
รายละเอียดการจัดการ	ความยาวของรอยโรค (เซนติเมตร)
ชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)	0.10±0.00
ชุดควบคุมผลบวก (สปอร์ราก่อโรคพืช)	1.23±0.25
ประสิทธิภาพในการยับยั้งด้วยโปรตีนตัวอย่างที่ 38	0.27±0.06
ประสิทธิภาพในการป้องกันด้วยโปรตีนตัวอย่างที่ 38	0.13±0.06



รูปที่ 4.8 แสดงอาการของใบข้าวโพดหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (c) และป้องกัน (d) การเจริญของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ของตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (a) และชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (b)

เมื่อตรวจสอบลักษณะของรอยโรคที่เกิดจากราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าในชุดควบคุมผลลบคือใส่เฉพาะน้ำกลั่นปลอดเชื้อไม่พบการเจริญของสายใยราก่อโรคพืช ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (a) ซึ่งแตกต่างจากในชุดควบคุมผลบวกที่ใส่เฉพาะสปอร์รา

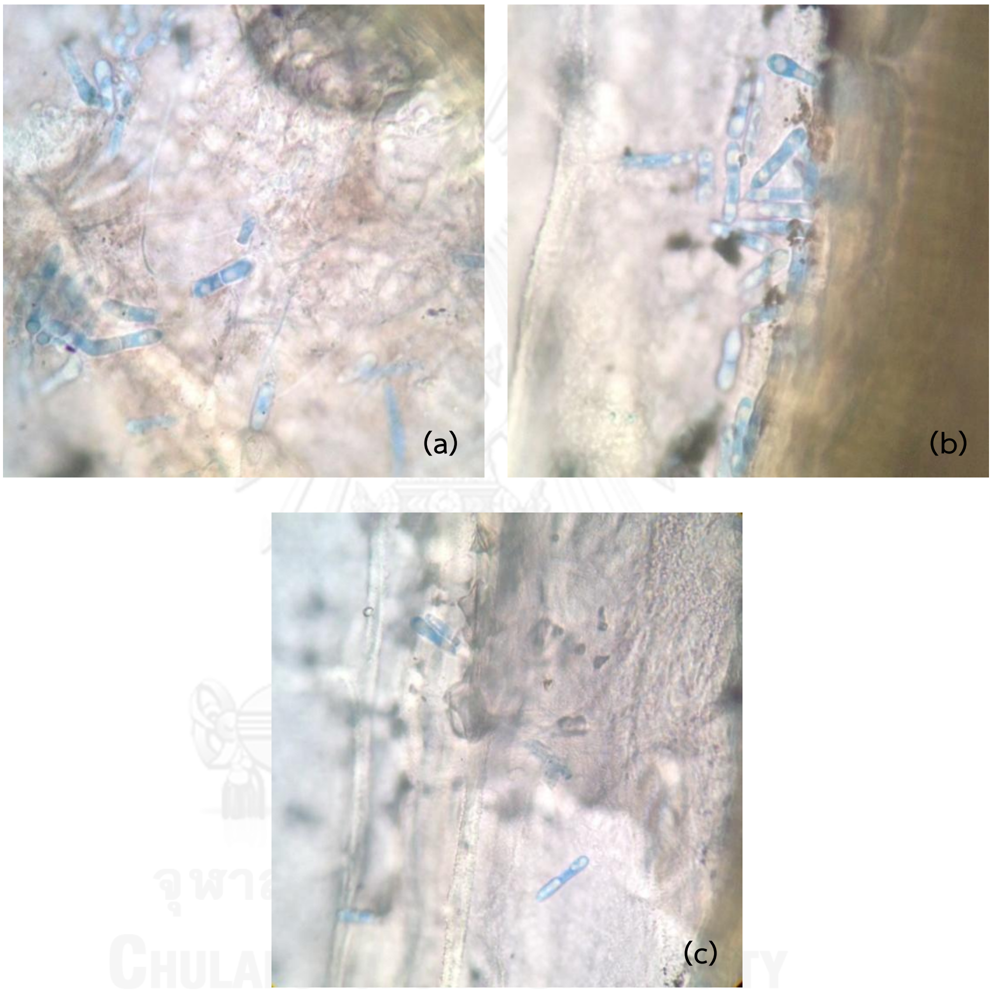
ก่อโรคพืช ซึ่งพบการเจริญของสายใยราก่อโรคพืชบริเวณที่ใบของข้าวโพดเกิดรอยโรค ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (b) และในชุดการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ พบว่าบริเวณที่เกิดรอยโรคนั้นใบของข้าวโพดซีดลงและพบสายใยของสปอร์เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (c) ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคพืช ที่พบว่าบริเวณขอบของรอยโรคไม่พบอาการใบซีดและการเจริญของสายใยราก่อโรคพืช ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (d)



รูปที่ 4.9 แสดงอาการของใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (c) และป้องกัน (d) การเจริญของราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบคือใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (a) และชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (b)

หลังจากนั้นจึงตรวจสอบลักษณะของสปอร์และสายใยราก่อโรคพืชจากใบข้าวโพดบริเวณที่เกิดรอยโรคเพื่อยืนยันว่าอาการที่พบในใบข้าวโพดเกิดจากราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ซึ่งปฏิบัติโดยตัดชิ้นส่วนของใบข้าวโพดบริเวณที่เกิดรอยโรค จากนั้นหยดสีย้อมรา (lactophenol cotton blue) 2-3 หยด และปิดทับด้วย cover slip จากนั้นตรวจดูลักษณะของสปอร์และสายใยราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งพบว่าในชุดควบคุมผลบวกที่ใส่เฉพาะสปอร์ราก่อโรคพืช พบว่าสปอร์ราก่อโรคพืชอยู่บนใบข้าวโพด และเกิด

การงอกของสปอร์เจริญเป็นเส้นใยมากมายดังแสดงในรูปที่ 4.10 (a) ส่วนในชุดการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช พบสปอร์ราก่อโรคพืชบนเนื้อเยื่อพืช แต่ไม่พบการงอกของสปอร์ โดยพบเพียงการบวมของสปอร์ดังแสดงในรูปที่ 4.10 (b) นอกจากนี้พบว่าในชุดการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคพืชนั้น สปอร์ราก่อโรคพืชมีจำนวนน้อยมากดังแสดงในรูปที่ 4.10 (c)



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของสปอร์และสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ในเนื้อเยื่อของใบข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (b) และป้องกัน (c) การเจริญของราก่อโรคพืชด้วยโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ตัวอย่างที่ 38 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกคือใส่สปอร์ของราก่อโรคพืช (a)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 ที่คัดแยกได้จากดิน สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Balint-Kurti และคณะ, 2007) ได้ ทั้งนี้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ผลิตจาก *B. subtilis* ส่วนใหญ่เป็นสารประเภทโปรตีน (Liu และคณะ, 2010; Liu และคณะ, 2007; Wong และคณะ, 2008; Zhang และคณะ, 2008) ดังนั้นขั้นตอนในการแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนจึงเลือกใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นในช่วง 40-80% และทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ด้วย DEAE ซึ่งพบว่าโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ เมื่อนำโปรตีนในช่วงลำดับส่วนนี้มาประมาณน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส พบว่ามีแถบโปรตีนเพียงหนึ่งแถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34.61 kDa ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS แบบ Q-ToF และเปรียบเทียบลายพิมพ์เพปไทด์กับฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI พบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชนี้ มีความใกล้เคียงกับลายพิมพ์เพปไทด์ของโปรตีนแฟลกเจลลินที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (gi|549699392) โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่มีผลทำให้เกิดการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 0.045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์นี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสายใยและการงอกของสปอร์ราก่อโรคพืช โดยส่งผลให้สายใยบวมและโป่งพอง ทั้งในจานเลี้ยงเชื้อและบนใบข้าวโพด

สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่นิยมใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย *B. subtilis* เนื่องจากได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสารที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชในช่วงกว้าง (Collins และ Jacobsen, 2003; Santoyo และคณะ, 2012) นอกจากนี้จากรายงานในงานวิจัยต่างๆพบว่าสารที่ผลิตจาก *B. subtilis* สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด (Liu และคณะ, 2007; Nagórska และคณะ, 2007; Zhou และคณะ, 2011) และสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงในระดับการค้าได้ (Cawoy และคณะ, 2011) โดยโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ผลิตจาก *B. subtilis* พบว่ามีหลายชนิดเช่น Bacisubin (Liu และคณะ, 2007), Chitinase (Liu และคณะ, 2011), Protease (Luo และคณะ, 2013), และ β-1,3-glucanase (Leelasuphakul และคณะ, 2006)

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย (Slininger และ Shea-

Wilbur, 1995) โดยปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ผลิตจาก *B. subtilis* N3 คือ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ทิพย์ศิรา ทองพิลา, 2554) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีแหล่งอาหารอุดมสมบูรณ์และแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมต่างๆภายในเซลล์ได้ง่าย เนื่องจากเป็นอาหารที่ประกอบด้วย โปรตีนเคซีน (casein) และกากถั่วเหลือง (soybean meal) ที่ถูกย่อยให้เป็นโมเลกุลเล็กๆจากการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน และโซเดียมคลอไรด์ช่วยรักษาความสมดุลของแรงดันออสโมติก (Carissimi และคณะ, 2009; Kumar และคณะ, 2009; Vijayakumari และคณะ, 2013) ดังนั้นจึงส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญและผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับขั้นตอนในการแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.5) พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อผ่านขั้นตอนในการแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนในแต่ละขั้นตอนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3, การตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 0-80% แอมโมเนียมซัลเฟต และการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ DEAE โดยเมื่อพิจารณาถึงค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน) พบว่าโปรตีนที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้ในแต่ละขั้นตอนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ด้วย DEAE (รูปที่ 4.3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยพบว่าถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ผลการทดลองนี้แสดงให้ทราบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืชนี้เป็นโปรตีนที่มีประจุลบ เนื่องจากวิธีการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ด้วย DEAE นั้น สารตัวกลางทำหน้าที่แลกเปลี่ยนประจุลบกับโปรตีนภายในคอลัมน์ ดังนั้นโปรตีนที่มีประจุลบจะสามารถจับกับสารตัวกลางได้ (Pharmacia LKB Biotechnology, 1991; Ren และคณะ, 2013; Zhao และคณะ, 2013b)

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจากความเหมือนของลายพิมพ์ของเพปไทด์พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 สามารถผลิตโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด (ตารางที่ 4.7) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ได้มีการรายงานมาบ้างแล้วว่าสามารถผลิตได้โดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส พรีเคอร์เซอร์ (Zhang และคณะ, 2009), เซรีนโปรตีเอส (Selitrennikoff, 2001; Zhang และคณะ, 2012), ไดไฮโดรลิโพเอไมด์ ดีไฮโดรจีเนส (Zhang และคณะ, 2009), และแฟลกเจลลิน (Ren และคณะ, 2013; Zhao และคณะ, 2013a;

Zhao และคณะ, 2013b) ทั้งนี้กลไกในการยับยั้งราก่อโรคพืชจากโปรตีนเหล่านี้บางชนิดมีรายงานแล้ว แต่บางชนิด โดยเฉพาะแฟลกเจลลินนั้นยังไม่มีรายงานแน่ชัด

สำหรับแถบของโปรตีนหลักที่มีบทบาทในการยับยั้งราก่อโรคพืชซึ่งพบในงานวิจัยนี้มีกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสลายพันธะเพปไทด์และโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของราก่อโรคพืช ซึ่งสุดท้ายส่งผลให้เกิดการแตกของเซลล์ (Selitrennikoff, 2001; Zhang และคณะ, 2012) โดยเอนไซม์ที่พบ ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มของ แอลฟา-อะไมเลส พรีเคอร์เซอร์ (Zhang และคณะ, 2009), เซรีน โปรตีเอส (Johnson และคณะ, 2008; Toyokawa และคณะ, 2010; Uyar และคณะ, 2011), และ คาร์บอกซีเพปทิเดส (Ishikawa และคณะ, 2001) ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (1,4-แอลฟา-ดี-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส) ทำหน้าที่ในการสลายพันธะ α-1-4 ของสายพอลิเพปไทด์ (Haq และคณะ, 2006) และพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Magnaporthe grisea* P131 ซึ่งก่อโรคใบไหม้ในข้าว (Zhang และคณะ, 2009) เอนไซม์เซรีน โปรตีเอส เป็นหนึ่งในโปรตีนที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตมากมาย (Perona และ Craik, 1995) และรวมทั้งยังสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิดเช่น *Monilinia* spp., *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* (Zhang และคณะ, 2012)

สำหรับโปรตีนซึ่งมีโมทิฟของพูเททีพ ดับเบิลยูดี รีพีท นั้น โดยปกติแล้วพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการต่างๆระดับเซลล์ เช่น การถอดรหัส, การส่งผ่านสัญญาณ และการเพิ่มจำนวน (Sompornpailin และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการควบคุมราโรคพืชโดยโปรตีนที่มีโมทิฟนี้โดยตรง แต่มีรายงานว่าโปรตีนซึ่งมีพูเททีพ ดับเบิลยูดี รีพีทจาก *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* สายพันธุ์ YAU B9601-Y2 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างโปรตีนชนิด mersacidin ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (Hao และคณะ, 2012)

โปรตีนไดไฮโดรลิโพเอไมด์ ดีไฮโดรจีเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชนั้น ยังไม่มีรายงานใดที่ยืนยันว่าโปรตีนไดไฮโดรลิโพเอไมด์ ดีไฮโดรจีเนสนี้ทำหน้าที่และเกี่ยวข้องกับการยับยั้งราก่อโรคพืช แต่มีรายงานว่าโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบเมแทบอลีซึมต่างๆของเซลล์ในกระบวนการไกลโคลิซิส (Mande และคณะ, 1996) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนอาจมีผลทางอ้อมต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคผ่านกระบวนการดังกล่าว

แบคทีเรีย *B. subtilis* ในแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตโปรตีนแฟลกเจลลินที่มีลำดับเพปไทด์ที่แตกต่างกัน (Simon และคณะ, 1977) โดยโปรตีนแฟลกเจลลิน มีหน้าที่สำคัญในการสร้างแฟลกเจลลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าของแบคทีเรีย (Gómez-Gómez และ

Boller, 2002) โดยองค์ประกอบของแฟลกเจลลาของแบคทีเรียนั้นประกอบด้วย 3 ส่วนคือ filament, hook, และ basal body ซึ่งโปรตีนแฟลกเจลลิน นี้ทำหน้าที่ในการสร้างฟิลาเมนต์ให้เรียงต่อกันเป็นสายยาว (Depamphilis และ Adler, 1971) จากงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีนแฟลกเจลลิน ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Monilinia fructicola*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia capsicum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Pythium irregulare*, และ *B. cinerea* (Ren และคณะ, 2013; Zhao และคณะ, 2013a; Zhao และคณะ, 2013b) ดังนั้นประสิทธิภาพของโปรตีนแฟลกเจลลิน ในการยับยั้งราก่อโรคพืชนั้นจึงจัดว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งราได้ในช่วงกว้าง (broad antifungal spectrum)

กลไกในการยับยั้งราก่อโรคพืชของโปรตีนแฟลกเจลลิน ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด (Ren และคณะ, 2013; Zhao และคณะ, 2013a; Zhao และคณะ, 2013b) แต่ในงานวิจัยที่ผ่านมาและในงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีนแฟลกเจลลิน มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช (รูปที่ 4.5, ตารางที่ 4.6, และ รูปที่ 4.6) โดยโปรตีนมีผลทำให้การเจริญของสายใยราก่อโรคพืชมีการเจริญผิดปกติ ลักษณะของสายใยมีอาการบวมและโป่งพอง และยับยั้งการงอกของสปอร์ อย่างไรก็ตามในแง่ที่มีผลต่อพืชนั้นมีการรายงานไว้ว่าโปรตีนแฟลกเจลลิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (plant innate immunity) (Gómez-Gómez และ Boller, 2002) ซึ่งเป็นกลไกที่ช่วยให้พืชสามารถต้านทานต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรคได้ โดยกลไกที่เกิดขึ้นพบว่าโปรตีนแฟลกเจลลิน ทำหน้าที่คล้าย elicitor ซึ่งคือโมเลกุลที่เข้าจับกับรีเซปเตอร์ (receptor) ของพืช เพื่อบ่งชี้ต่อพืชว่าเกิดการรุกรานของเชื้อก่อโรคขึ้น (Gómez-Gómez และ Boller, 2002) โดยรีเซปเตอร์ของพืช *Arabidopsis thaliana* ที่จับกับโปรตีนแฟลกเจลลิน คือ leucine-rich repeat receptor kinase flagellin-sensitive 2 (FLS2) (Chinchilla และคณะ, 2007) จากนั้นจึงเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช โดยกระตุ้นให้มีการสร้าง oxidative burst เพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์พืชบริเวณที่เกิดการรุกราน เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคไปยังส่วนอื่น และมีการสะสมแคลโลส (callose) เพิ่มมากขึ้นที่บริเวณผนังเซลล์ของพืช เพื่อชะลอการรุกรานจากเชื้อก่อโรค นอกจากนี้มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารเอธิลีน (ethylene) ซึ่งทำหน้าที่ไปกระตุ้นการแสดงออกจากยีน *PR1* และ *PR5* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PR protein (pathogenesis-related protein) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (Gómez-Gómez และ Boller, 2002; Selitrennikoff, 2001)

กลไกในการยับยั้งราก่อโรคพืชของโปรตีนแฟลกเจลลิน นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจสันนิษฐานได้ว่าโปรตีนแฟลกเจลลิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้อาจจะเกิดอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์บางชนิดที่อยู่บนผนังเซลล์และ/หรือสปอร์ของราที่มีลักษณะคล้ายกับ leucine-rich repeat receptor

kinase flagellin-sensitive 2 (FLS2) ของพืช หรืออาจเป็นไปได้ว่าบางส่วนของแฟลกเจลลิน อาจทำอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์อื่นบนผนังเซลล์และ/หรือสปอร์ของราแล้วส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของราได้ ดังนั้นจึงเป็นงานวิจัยที่หน้าสนใจที่จะศึกษากลไกของโปรตีนแฟลกเจลลิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชนี้ต่อไป

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ให้หลักฐานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 หรือน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย หรือโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลิน ที่ทำบริสุทธิ์ได้ล้วนมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในใบข้าวโพดทั้งในจานเลี้ยงเชื้อและบนใบข้าวโพด ดังนั้นจึงมีศักยภาพที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมปัญหาโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดที่มีสาเหตุจากรา *Bipolaris* sp. ได้ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร, 2552. ระบบข้อมูลทางวิชาการของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวโพดฝักสด. (ออนไลน์). http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=17; http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=18. 18 มกราคม 2557.

กระทรวงพาณิชย์, 2556. ข้อมูลตลาดส่งออกของไทยประจำปี 2556. (ออนไลน์). http://www2.ops3.moc.go.th/. 18 มกราคม 2557.

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิพย์ศิรา ทองพิลา, 2554. การคัดเลือกแบคทีเรียและการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในพืช, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2553. สารานุกรมภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย – ภูมิปัญญาข้าวไทย: โรคและศัตรูข้าว. (ออนไลน์). http://app1.bedo.or.th/rice/DiseaseInfo.aspx?id=5. 18 มกราคม 2557.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556. สถิติการส่งออกข้าว. (ออนไลน์). http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php. 24 เมษายน 2557.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2555 และแนวโน้มปี 2556. (ออนไลน์). http://www.oae.go.th/download/bapp/Outlook_2012-13.pdf. 23 เมษายน 2557.

สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว, 2550. สถานการณ์ข้าวปี 2550: สถานการณ์การผลิตและการค้าข้าวโลก.(ออนไลน์). http://riceproduct.org/index.php?option=com_content&task=view&id=19&Itemid=48. 18 มกราคม 2557.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2552. โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด ,แมลงและสัตว์ศัตรูข้าว-ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญและการป้องกันกำจัด และการจัดการวัชพืชในนาข้าว. (ออนไลน์). http://www.brrd.in.th/library/document/E-book/brrd5203005c1.pdf. 18 มกราคม 2557.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2556. (ออนไลน์). http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_web/download/journal/trends2556.pdf. 18 มกราคม 2557.

เอกสารวิชาการโรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด สถาบันวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ปี 2547. (ออนไลน์). http://210.246.186.28/fieldcrops/vcorn/index.htm. 18 มกราคม 2557.

Alcorn, J.L., 1988. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. Annual Reviews Phytopathology, 26: 37-56.

Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M. and Meredith, F., 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. Environmental Health Perspectives, 109(Suppl 2): 325–332.

Balint-Kurti, P.J., Zwonitzer, J.C., Pè, M.E., Pea, G., Lee, M. and Cardinal, A.J., 2007. Identification of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight and days to anthesis in two maize recombinant inbred line populations. Phytopathology, 98: 315-320.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilust*. Applied and Environmental Microbiology, 45(6): 1808-1815.

Berenjian, A., Chan, N.L.C., Mahanama, R., Talbot, A., Regtop, H., Kavanagh, J. and Dehghani, F., 2013. Effect of biofilm formation by *Bacillus subtilis* natto on menaquinone-7 biosynthesis. Molecular Biotechnology, 54: 371–378.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L., 2002. The purification of proteins is an essential first step in understanding their function, Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York.

Biswas, A., 2006. Narrow brown leaf spot disease of rice: a review. Journal of Mycopathological Research, 44(1): 113-115.

Bolker, M., 2001. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiology 147: 1395–1401.

Bollag, D.M., 1995. Ion-exchange chromatography, Peptide Analysis Protocols. Springer, pp. 11-22.

Bressan, W., 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. BioControl, 48(2): 233-240.

Buell, C.R., 2009. Poaceae genomes: going from unattainable to becoming a model clade for comparative plant genomics. Plant Physiology, 149(1): 111-6.

Carissimi, M., Giraudo, M.S., Germani, J.C. and Sand, S.T.V.D., 2009. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. BIOCIÊNCIAS, Porto Alegre,, 17(1): 48-58.

Carson, M.L., Stuber, C.W. and Senior, M.L., 2004. Identification and mapping of quantitative trait loci conditioning resistance to southern leaf blight of maize caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O. Phytopathology, 94: 862-867.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Casela, C.R. and Ferreira, A.S., 2002. Variability in isolates of *Puccinia polysora* in Brazil. Fitopatologia Brasileira, 27: 414-416.

Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P. and Ongena, M., 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. in Pesticides in the modern world - pesticides use and management, ed. M. Stoytcheva Rijeka, Croatia: InTech, pp. 273-302.

Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S. and Lumyong, S., 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(11): 1919-1928.

Chalfoun, N.R., Castagnaro, A.P. and Ricci, J.C.D., 2011. Induced resistance activated by a culture filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. Biological Control, 58: 319-329.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R. and Guo, J.h., 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology, 15(3): 848-864.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. and Boller, T., 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature, 448.

Choudhary, D.K. and Johri, B.N., 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research 164: 493-513.

Cintas, N.A. and Webster, R.K., 2001. Effects of rice straw management on *Sclerotium oryzae* inoculum, stem rot severity, and yield of rice in California. Plant Disease, 85(11): 1140-1144.

Collins, D.P. and Jacobsen, B.J., 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Biological Control, 26(2): 153-161.

Cutler, P., 2004. Protein purification protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Dai, D., Hu, W., Huang, G. and Li, W., 2011. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. African Journal of Biotechnology, 10(13): 2476-2485.

Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.A., DaMatta, F.M., Mielli, M.V. and Pereira, S.C., 2011. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. Phytopathology, 101(1): 92-104.

Dastur, J., 1942. Notes on some fungi isolated from 'black point' affected wheat kernels in the Central Provinces. Indian Journal of Agricultural Science, 12(5): 731-742.

Datnoff, L.E. and Lentini, R.S., 1994. Brown spot in Florida rice. Florida Cooperation Extension Service. University of Florida, 2.

Davies, K.G., 2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium, *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. Advances in Parasitology, 68: 211-245.

Depamphilis, M.L. and Adler, J., 1971. Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 105(1): 376-383.

Deutscher, M.P., 1990. Guide to protein purification. Methods in enzymology, 182. San Diego : Academic Press, United States.

Drechsler, C., 1934. Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. Phytopathology, 24: 953-983.

Emmert, E.A. and Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiology Letters, 171(1): 1-9.

Freeman, J. and Ward, E., 2004. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. Molecular Plant Pathology, 5(4): 235-252.

Ghazvini, H. and Tekauz, A., 2012. Molecular diversity in the barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*). Australasian Plant Pathology, 41(3): 283-293.

Gómez-Gómez, L. and Boller, T., 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends in Plant Science, 7(6): 251-256.

Guarro, J., Gené, J. and Stchigel, A.M., 1999. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews, 12(3): 454-500.

Hao, K., He, P., Blom, J., Rueckert, C., Mao, Z., Wu, Y., He, Y. and Borriss, R., 2012. The genome of plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain YAU B9601-Y2 contains a gene cluster for mersacidin synthesis. Journal of Bacteriology, 194(12): 3264-3265.

Haq, I.U., Ashraf, H., Ali, S. and Qadeer, M.A., 2006. Kinetic characterization of extracellular α-amylase from a derepressed mutant of *Bacillus licheniformis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 141: 251-264.

Harish, S., Saravanakumar, D., Radjacommare, R., Ebenezar, E.G. and Seetharaman, K., 2007. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. BioControl, 53(3): 555-567.

Huang, Q., Jiao, Z., Li, M., Qiu, D., Liu, K. and Shi, H., 2012. Preparation, characterization, antifungal activity, and mechanism of chitosan/TiO2 hybrid film against *Bipolaris maydis*. Journal of Applied Polymer Science, DOI: 10.1002/app.38322.

Idris, E.E., Bochow, H., Ross, H. and Borriss, R., 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. Journal of Plant Diseases and Protection, 111(6): 583–597.

Iltis, H.H., 2000. Homeotic sexual translocations and the origin of maize (*Zea Mays*, Poaceae): A new look at an old problem. Economic Botany, 54(1): 7-42.

Ishikawa, K., Ishida, H., Matsui, I., Kawarabayasi, Y. and Kikuchi, H., 2001. Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase/aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. Applied and Environmental Microbiology, 67(2): 673-679.

Janisiewicz, W.J. and Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Reviews Phytopathology, 40: 411–441.

Jia, Y., Correa-Victoria, F., McClung, A., Zhu, L., Liu, G., Wamishe, Y., Xie, J., Marchetti, M.A., Pinson, S.R.M., Rutger, J.N. and Correll, J.C., 2007. Rapid determination of rice cultivar responses to the Sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* using a micro-chamber screening method. Plant Disease, 91(5): 485-489.

Johnson, B.T., Shaw, L.N., Nelson, D.C. and Mayo, J.A., 2008. Extracellular proteolytic activities expressed by *Bacillus pumilus* isolated from endodontic and periodontal lesions. Journal of Medical Microbiology, 57(Pt 5): 643-651.

Kandhari, J., 2005. Important fungal diseases of rice In: Current trends in life science. Today and Tomorrow's Printers & Publishers, New Delhi, pp. 963-995.

Kavitha, S., Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M. and Jayakumar, R., 2005. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. Process Biochemistry, 40(10): 3236-3243.

Khan, M. and Patel, C.B., 2007. Plant growth promoting effect of *Bacillus firmus* strain NARS1 isolated from Central Himalayan region of India on *Cicer arientnum* at low temperature. African Crop Science Conference Proceedings, 8: 1179-1181.

Khush, G.S., 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Molecular Biology 35(1-2): 25-34.

Krupinsky, J.M., Berdahl, J.D., Schoch, C.L. and Rossman, A.Y., 2004. Leaf spot on switch grass (*Panicum virgatum*), symptoms of a new disease caused by *Bipolaris oryzae*. Canadian Journal of Plant Pathology, 26: 371-378.

Kumar, A., Saini, P. and Shrivastava, J.N., 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experimental Biology, 47(1): 57-62.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.

Lawrence, K., Zhou, X., Sudini, H., Miller, M., Appa, R.P., Surendranatha Reddy, E., Niranjana, S. and Nayaka, C., 2011. Plant growth-promoting activity of *Bacillus subtilis* mbi 600 (INTEGRAL®) and its compatibility with commonly used fungicides in rice sheath blight management. International Journal of Microbiology Research, 3(2): 120-130.

Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S., 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme and Microbial Technology, 38(7): 990-997.

Levy, Y. and Pataky, J.K., 1992. Epidemiology of Northern leaf blight on sweet corn. Phytoparasitica, 20(1): 53-66.

Li, J., Yang, Q., Zhao, L.H., Zhang, S.M., Wang, Y.X. and Zhao, X.Y., 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. Journal of Zhejiang University Science B, 10(4): 264-272.

Lian, L., Xie, L., Zheng, L. and Lin, Q., 2011. Induction of systemic resistance in tobacco against Tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. Biocontrol Science and Technology, 21(3): 281-292.

Liu, B., Huang, L., Buchenauer, H. and Kang, Z., 2010. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98: 305-311.

Liu, Y., Chen, Z., Ng, T.B., Zhang, J., Zhou, M., Song, F., Lu, F. and Liu, Y., 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. Peptides, 28(3): 553-559.

Liu, Y., Tao, J., Yan, Y., Li, B., Li, H. and Li, C., 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. Chinese Journal of Chemical Engineering, 19(1): 128-134.

Londo, J.P., Chiang, Y.C., Hung, K.H., Chiang, T.Y. and Schaal, B.A., 2006. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple

independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(25): 9578-9583.

Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119(3): 243-254.

Lugtenberg, B. and Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541-556.

Luo, Y., Sun, L., Zhu, Z., Ran, W. and Shen, Q., 2013. Identification and characterization of an anti-fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* protease from the *Bacillus subtilis* strain N7. Journal Microbiology, 51(3): 359-366.

Manamgoda, D.S., Cai, L., Bahkali, A.H., Chukeatirote, E. and Hyde, K.D., 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. Fungal Diversity, 51: 3-42.

Mande, S.S., Sarfaty, S., Allen, M.D., Perham, R.N. and Hol, W.G., 1996. Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrolipoamide acetyltransferase. Structure (London, England : 1993), 4(3): 277-286.

Marchetti, M.A. and Petersen, H.D., 1984. The role of *Bipolaris oryzae* in floral abortion and kernel discoloration in rice. Plant Disease, 68: 288-291.

Martin, T., 2011. *Setosphaeria turcica*, fungal mating and plant defence, Doctoral thesis, Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden, 2011.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H., 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science, 64(3): 265-271.

Montesinos, E., 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS Microbiology Letters, 270(1): 1-11.

Morejon, K.R., Moraes, M.H.D. and Bach, E.E., 2006. Identification of *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 247-250.

Motlagh, M.R. and Kaviani, B., 2008. Characterization of new *Bipolaris* spp.: the causal agent of rice brown spot disease in the North of Iran. International Journal of Agriculture and Biology, 10: 638–642.

Nagaraja, A. and Reddy, B.A., 2010. Banded blight - a new record on finger millet in Karnataka. Journal of Mycopathological Research, 48(1): 169-170.

Nagórska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica, 54(3): 495-508.

Navi, S., Bandyopadhyay, R., Hall, A. and Bramel-Cox, P., 1999. A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain. International Crops Research Institute for Semi Arid Tropics.

Ongena, M. and Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16(3): 115-125.

Pal, K.K. and Gardener, B.M., 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, 2: 1117-1142.

Pernezny, K., Elliott, M., Palmateer, A. and Havranek, N., 2011. Guidelines for identification and management of plant disease problems: Part II. Diagnosing plant diseases caused by fungi, bacteria and viruses. The Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: 249 p.

Perona, J.J. and Craik, C.S., 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. Protein Science, 4(3): 337-360.

Pharmacia LKB Biotechnology, 1991. Ion exchange chromatography: principles and methods. Pharmacia LKB Biotechnology.

Picco, A.M. and Rodolfi, M., 2002. *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*: a preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. Aerobiologia, 18: 163–167.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek, 81: 537–547.

Ren, J.J., Shi, G.L., Wang, X.Q., Liu, J.G. and Wang, Y.N., 2013. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. World Journal Microbiology Biotechnology, 29: 2343–2352.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, s.G., Donofrio, N.M., Czymmek, K.J., Paré, P.W. and Bais, H.P., 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Communicative & Integrative Biology, 3(2): 130-138.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. and Paré, P.W., 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 134(3): 1017-1026.

Saleh, A.A., Ahmed, H.U., Todd, T.C., Travers, S.E., Zeller, K.A., Leslie, J.F. and Garrett, K.A., 2010. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. Molecular ecology, 19(1): 79-91.

Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.d.C. and Govindappa, M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Science and Technology, 22(8): 855-872.

Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W. and Crous, P.W., 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. Mycologia, 98(6): 1041–1052.

Scopes, R.K., 1994. Protein purification: principles and practice. Springer. 380 p.

Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. Apply and Environmental Microbiology, 67(7): 2883–2894.

Selkirk, C., 2004. Ion-exchange chromatography, Protein Purification Protocols. Springer, pp. 125-131.

Shabana, Y.M., Abdel-Fattah, G.M., Ismail, A.E. and Rashad, Y.M., 2008. Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris maydis*) using some phenolic antioxidants. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 438-444.

Shaigan, S., Seraji, A. and Moghaddam, S.A.M., 2008. Identification and investigation on antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on tea seedlings white foot and root rot (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) in vitro condition. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(19): 2346-2350.

Shanmugam, V., Ronen, M., Shalaby, S., Larkov, O., Rachamim, Y., Hadar, R., Rose, M.S., Carmeli, S., Horwitz, B.A. and Lev, S., 2010. The fungal pathogen *Cochliobolus heterostrophus* responds to maize phenolics: novel small molecule signals in a plant-fungal interaction. Cellular Microbiology, 12(10): 1421–1434.

Sheehan, D. and FitzGerald, R., 1996. Ion-exchange chromatography, Protein Purification Protocols. Springer, pp. 145-150.

Shoemaker, R.A., 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from '*Helminthosporium*'. Canadian Journal of Botany, 37(5): 879-887.

Simon, M.I., Emerson, S.U., Shaper, J.H., Bernard, P.D. and Glazer, A.N., 1977. Classification of *Bacillus subtilis* flagellins. Journal of Bacteriology 200-204.

Slaton, N.A., Gbur, E.E., Cartwright, R.D., DeLong, R.E., Norman, R.J. and Brye, K.R., 2004. Grain yield and kernel smut of rice as affected by preflood and midseason nitrogen fertilization. in Arkansas Agronomy 96(1): 91-99.

Slininger, P.J. and Shea-Wilbur, M.A., 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Apply Microbiology Biotechnology, 43(5): 794-800.

Sompornpailin, K., Makita, Y., Yamazaki, M. and Saito, K., 2002. A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. Plant Molecular Biology, 50: 485-495.

Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56: 845–857.

Strable, J. and Scanlon, M.J., 2009. Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harbor Protocols, 2009(10): 33-41.

Sweeney, M. and McCouch, S., 2007. The complex history of the domestication of rice. Annals of botany, 100(5): 951-957.

Sweets, L.E. and Wrather, A., 2000. Integrated pest management: corn diseases. IPM 1001: 2-23.

Technow, F., Bürger, A. and Melchinger, A.E., 2013. Genomic prediction of Northern corn leaf blight resistance in maize with combined or separated training sets for heterotic groups. Genomic, 3: 197-203.

Thakur, R.P. and Mathur, K., 2002. Downy mildews of India. Crop Protection, 21(4): 333-345.

Toyokawa, Y., Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S. and Yasuda, M., 2010. Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(6): 1867-1875.

Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yilmaz, E.I., 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. EurAsian Journal of BioSciences, 5: 1-9.

Vijayakumari, S.J., Sasidharannair, N.K., Nambisan, B. and Mohandas, C., 2013. Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial

production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. The Iranian Journal of Microbiology, 5(2): 136-141

Walton, J., Ransom, R. and Pitkin, J., 1997. Northern corn leaf spot: chemistry, enzymology, and molecular genetics of a host-selective phytotoxin, Plant-Microbe Interactions. Springer US, pp. 94-123.

Welz, H.G. and Geiger, H.H., 2000. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. Plant Breeding 119: 1-14.

Wong, J.H., Hao, J., Cao, Z., Qiao, M., Xu, H., Bai, Y. and Ng, T.B., 2008. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Applied Microbiology, 105(6): 1888-1898.

Xu, S., Chen, J., Liu, L., Wang, X., Huang, X. and Zhai, Y., 2007. Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China. Journal of Integrative Plant Biology, 49(4): 487-496.

Ye, Y.f., Li, Q.q., Fu, G., Yuan, G.q., Miao, J.h. and Lin, W., 2012. Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on Southern corn leaf blight. Journal of Integrative Agriculture, 11(1): 90-99.

Yu, X., Ai, C., Xin, L. and Zhou, G., 2010. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology, 47: 138-145.

Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A. and Romero, D., 2013. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. Environmental Microbiology, doi: 10.1111/1462-2920.12271.

Zhang, B., Xie, C. and Yang, X., 2008. A novel small antifungal peptide from *Bacillus* strain B-TL2 isolated from tobacco stems. Peptides, 29(3): 350-355.

Zhang, C.X., Zhao, X., Han, F., Yang, M.F., Chen, H., Chida, T. and Shen, S.H., 2009. Comparative proteome analysis of two antagonist *Bacillus subtilis* strains. Journal Microbiology Biotechnology, 19(4): 351–357.

Zhang, D., Spadaro, D., Valente, S., Garibaldi, A. and Gullino, M.L., 2012. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. International Journal of Food Microbiology, 153: 453–464.

Zhang, G., Wang, F., Qin, J., Wang, D., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, S. and Pan, H., 2013. Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*

No.05, a new biocontrol agent, against *Setosphaeria turcica*. Biological Control, 64(1): 90-98.

Zhao, X., Zhao, X., Wei, Y., Shang, Q. and Liu, Z., 2013a. Isolation and identification of a novel antifungal protein from a rhizobacterium *Bacillus subtilis* strain F3. Journal of Phytopathology, 161: 43-48.

Zhao, X., Zhou, Z.j., Han, Y., Wang, Z.z., Fan, J. and Xiao, H.z., 2013b. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiological Research, 168: 598– 606.

Zhou, X., Lu, Z., Lv, F., Zhao, H., Wang, Y. and Bie, X., 2011. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. Journal of Food Science, 76(5): M254-M259.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3	กรัม
แบคโตเปบโทน (Bacto peptone)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมผงวุ้น 15 กรัม ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose Broth (PDB) Himedia, India	24	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป PDB ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น 15 กรัม ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)

ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3	กรัม
แบคโตเปบโทน (Bacto peptone)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป Tryptic Soy Broth (TSB) Dickinson and company, France	30	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป TSB ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose Broth (PDB)

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose Broth (PDB) Himedia, India	24	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. กลีเซอรอล 15 %

กลีเซอรอล 87 %	17.24	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	82.76	มิลลิลิตร

ผสมกลีเซอรอลและน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 7.5

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121.14 กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้ต้องนำสารละลายมาเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3. การเตรียมถุงไดแอไลซ์

ตัดถุงไดแอไลซ์ที่มีขนาด cutoff ที่ 3500 MW ความยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร โดยความยาวของถุงไดแอไลซ์นั้นขึ้นกับปริมาตรของโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง จากนั้นนำถุงไดแอไลซ์ไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสในสารละลาย 1% EDTA (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นเวลา 10 นาที และล้าง EDTA ออกจากถุงไดแอไลซ์ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุประมาณ 4-5 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดกลิ่นของ EDTA ถุงไดแอไลซ์ที่ผ่านการต้มแล้วจึงจะสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการไดแอไลซิสได้

4. สารละลาย ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 1%

เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (EDTA)	2	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

5. กลีเซอรอล 30% ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5

กลีเซอรอล 87 %	345	มิลลิลิตร
50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5	655	มิลลิลิตร

ผสมกลีเซอรอลและ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ให้เข้ากัน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	46.8	กรัม
50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5	800	มิลลิลิตร

7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

8. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	72.6	กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 400 มิลลิลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%

โซเดียมโดเดซิสซัลเฟต (SDS) (ปฏิบัติในตู้ดูดควัน)	15	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	150	มิลลิลิตร

10. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

11. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	24	กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 400 มิลลิลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. สารละลาย 10x รันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer)

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30.2	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	144	กรัม
โซเดียมโดเดซิสซัลเฟต (SDS)	10	กรัม

ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำสารละลายไปใช้ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

13. 2x denaturing buffer

สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8	5	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%	8	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล 87%	4	มิลลิลิตร
บรอมฟีนอลบลู	0.02	กรัม

ผสมสารละลายทุกชนิดเข้าด้วยกัน และแบ่งสารละลายใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 950 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้เติม ทู-เมอร์แคบโตเอธานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

14. 4x SDS-PAGE sample buffer

สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8	5	มิลลิลิตร
DTT (DL-Dithiothreitol)	1.851	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.4	กรัม
บรอมฟีนอลบลู	0.05	กรัม
กลีเซอรอล 87%	12	มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ	12	มิลลิลิตร

15. สีย้อมคูแมสซีบลู (Coomassie blue staining solution)

สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250	1	กรัม
50**%** เมธานอล (methanol)	500	มิลลิลิตร
10% กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	400	มิลลิลิตร

16. สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

40**%** เมธานอล (methanol)	400	มิลลิลิตร
10% กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	500	มิลลิลิตร

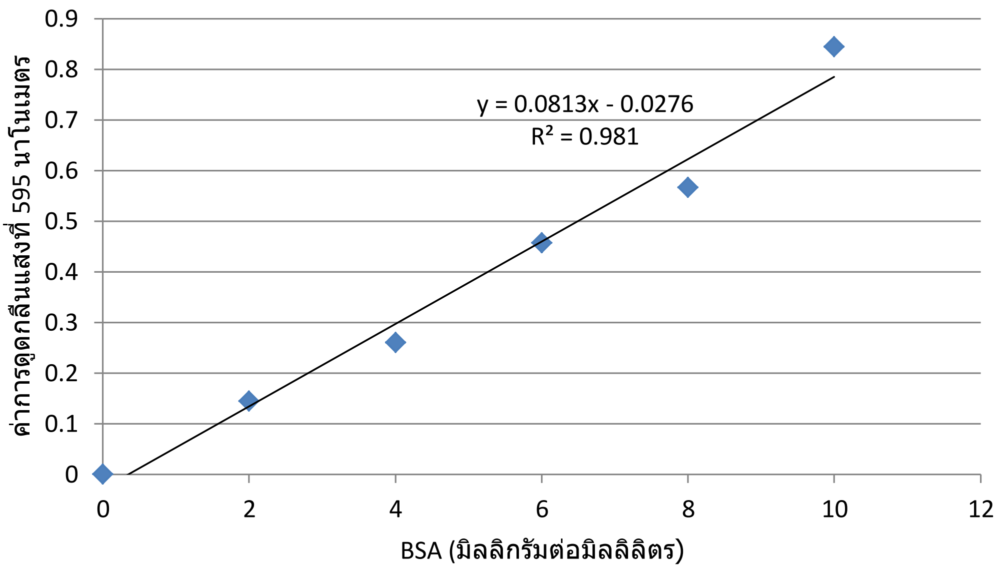
17. fix solution

เมธานอล (methanol)	100	มิลลิลิตร
กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH)	100	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล 87%	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	750	มิลลิลิตร

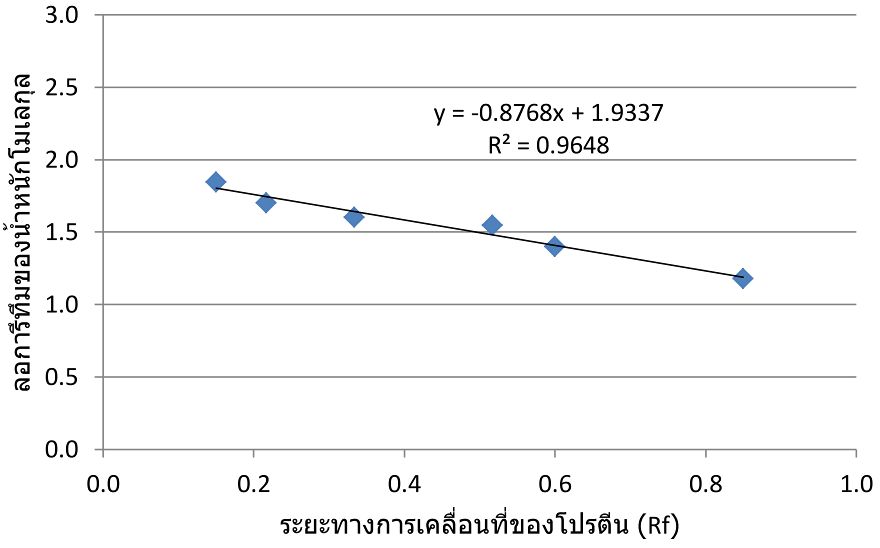
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

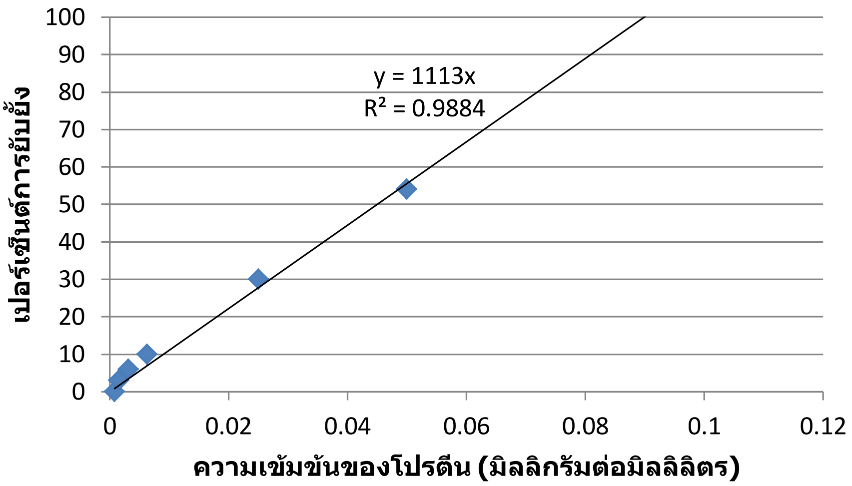
1. กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโบไวน์เซรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน



2. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่เคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล



3. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนจากโปรตีนที่ผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของสายใยราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ง

1. **ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ผลิตจาก *B. subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS แบบ Q-ToF)**

1.1 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28.1) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	**gi|549696214**	alpha-amylase precursor [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]
2.	**gi|3298505**	alpha-amylase precursor [*Bacillus subtilis*]
3.	**gi|451348337**	alpha-amylase [*Bacillus amyloliquefaciens* IT-45]
4.	**gi|494883205**	alpha-amylase [*Bacillus* sp. 5B6]
5.	**gi|154687528**	phosphoglyceromutase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42]
6.	**gi|386756890**	alpha-amylase [*Bacillus* sp. JS]
7.	**gi|305673005**	alpha-amylase [*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23]
8.	**gi|52081959**	phosphoglyceromutase [*Bacillus licheniformis* DSM 13 = ATCC 14580]

1.2 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28.1) กับโปรตีน alpha-amylase precursor (gi|549696214)

Protein View: gi|549696214
alpha-amylase precursor [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]
Database: NCBInr
Score: 1341
Nominal mass (Mr): 72359
Calculated pI: 5.62
Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
This protein sequence matches the following other entries:
gi|549780655 from *Bacillus amyloliquefaciens*
gi|549060176 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|549696214 against nr.

Search parameters
MS data file: S28.1.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 40%
Matched peptides shown in ***bold***.

```
1    MFKKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLSGPAA ANAETAHKSN EVTDSSVKNG
```

1 MFKKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLSGPAA ANAETAHKSN EVTDSSVKNG

51 TILHAWNWSF NTLTENMKEI R**DAGYAAIQT** **SPINQVK**EGN QGDKSMSNWY

101 WLYQPTSYQI GNR**YLGTEQE** **FKDMCAAAEK** YGVK**VIVDAV** **VNHTTSDYGA**

151 **ISDEIKRIPN** **WTHGNTQIK**N WSDRWDITQN ALLGLYDWNT QNTEVQAYLK

201 GFLER**ALNDG** **ADGFRYDAAK** HIELPDDGNY GSQFWPNIAN TSAEFQYGEI

251 LQDSASR**DTA** **YANYMNVTAS** **NYGHSIR**SAL KNR**NLSVSNI** **SHYASDVSAD**

301 **K**LVTWVESHD TYANDDEEST WMSDDDIR**LG** **WAVIGSRSGS** **TPLFFSRPEG**

351 **GGNGVR**FPGK SQIGDRGSAL FKDQAITAVN QFHNEMAGQP EELTNPNGNN

401 QIFMNQRGSK **GVVLANAGSS** **SVTINTSTK**L PDGRYDNR**AG** **AGSFQVANGK**

451 **LTGTINAR**SA AVLYPDDIGN APHVFLENYQ TEAVHSFNDQ LTVTLRANAK

501 TTK**AVYQINN** **GQETAFKDGD** **RLTIGKEDPI** **GTTYNVK**LTG TNGEGASR**TQ**

551 **EYTFVK**KDPS QTNIIGYQNP DHWGNVNAYI YK**HDGGGAIE** **LTGSWPGK**AM

601 TK**NADGIYTL** **TLPANADTAN** **AK**VIFNNGSA QVPGQNHPGF DYVQNGLYNN

651 SGLNGYLPH

Unformatted sequence string: 659 residues (for pasting into other applications).

1.3 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28.2) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	gi|384267502	putative WD repeat-containing protein [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
2.	gi|384264562	phosphoserine aminotransferase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
3.	gi|522023162	hypothetical protein [*Lewinella cohaerens*]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.4 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 28-32 (ตัวอย่างที่ 28.2) กับโปรตีน putative WD repeat-containing protein (gi|384267502) และ phosphoserine aminotransferase (gi|384264562)

Protein View: gi|384267502

putative WD repeat-containing protein [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]

Database:	NCBInr
Score:	659
Nominal mass (Mr):	48315
Calculated pI:	9.16
Taxonomy:	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

This protein sequence matches the following other entries:

gi|504232204 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|380500855 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|384267502 against nr.

Search parameters

MS data file:	S28.2.mgf
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 31%

Matched peptides shown in ***bold***.

```
1   MKKKTASLRM KTLAAGAAVA AALSVGAVSD LPGAKWLHPA AAQAAETVFK
51  QNHAASGFLA GRYDAQAMSP TMFNWSRESR FTSTADGALK WEKNVPANPQ
101 NGAGAAVDGD GTVFIQSKDG KLTAYHPDGT VKWVTENLGT TYTLTPVLGT
151 NGVIYLPSHD KKLYFIDKET GNILTSVPLS GAPSSDAAIG SDGTLYVSTL
201 DNYIYAIKPT SPSTWTQKWK FKTNGVVGSA PVLASNGTLY TATYNNIFYA
251 INSGTGQVKW SKTTSNGFKG YPVIDRDGTV YAGNQDGNLY AYTSTGAVKW
301 TFPLNGFSSS SLAIDHNGNV YIGSGSGELF SISKTGNMNW SFYTDGPVRT
351 APLIDADGNV YFGSDDKNVY AVDADGNEKW RYQTDSNVIS SPVLAEDGTL
401 YVGTYTKLLA FGAKNNKKES ASSARILFLF RGLNKYAFFM RKFFKAVHTV
451 I
```

Matched (bold) residues: 51–77 (QNHAASGFLA GRYDAQAMSP TMFNWSR), 81–132 (FTSTADGALK WEKNVPANPQ NGAGAAVDGD GTVFIQSKDG KLTAYHPDGT VK), 263–299 (TTSNGFKG YPVIDRDGTV YAGNQDGNLY AYTSTGAVK), 335–349 (TGNMNW SFYTDGPVR), 368–379 (NVY AVDADGNEK).

Unformatted sequence string: 451 residues (for pasting into other applications).

Protein View: gi|384264562

phosphoserine aminotransferase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]

Database: NCBInr

Score: 444

Nominal mass (Mr): 39549

Calculated pI: 5.96

Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

This protein sequence matches the following other entries:

gi|504230230 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|380497915 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

gi|542006217 from *Bacillus amyloliquefaciens* EGD-AQ14

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|384264562 against nr.

Search parameters

MS data file: S28.2.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 27%

Matched peptides shown in ***bold***.

```
1   MERTTNFNAG PAALPLDVLQ KAQKEFVNFN DTGMSVMELS HRSTEYDAVH
51  QKAKSLLKEL MDIPDDYDIL FLQGGASLQF SMLPMNFLTP EKTAHFIVTG
101 AWSEKALAEA KLFGNTSVTA TSADSNHNHI PEADLSGIKD GAYLHITSNN
151 TIFGTQWKEF PNSPIPLVAD MSSDILSRKI DVKTFDVIYG GAQKNLGPSG
201 VTVVIMKKSW LENENANVPK ILKYSTHTKA DSLYNTPPTF AIYMLSLVLE
251 WLAENGGVEA AERRNQEKAD VLYGTIDASG GFYAGHAAKD SRSHMNVTFT
301 LRDSSLTKKF VEEAKAAKMI GLGGHRSVGG CRASIYNAVS LADCEKLAQF
351 MRKFQQENE
```

Unformatted sequence string: 359 residues (for pasting into other applications).

1.5 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.1) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	**gi|494888363**	nitrate reductase [*Bacillus* sp. 5B6]
2.	**gi|452857429**	extracellular serine protease [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036]
3.	**gi|568179157**	nitrate reductase [*Bacillus amyloliquefaciens* LFB112]

4.	gi|308175531	extracellular serine protease [*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7]
5.	gi|515504277	peptidase S8 [*Bacillus siamensis*]
6.	gi|305676356	respiratory nitrate reductase subunit alpha [*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23]
7.	gi|386760473	peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin [*Bacillus* sp. JS]
8.	gi|305676435	extracellular serine protease [*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23]

1.6 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.1) กับโปรตีน nitrate reductase (gi|494888363) และโปรตีน extracellular serine protease (gi|452857429)

Protein View: gi|494888363

nitrate reductase [*Bacillus* sp. 5B6]

Database: NCBInr
Score: 497
Nominal mass (Mr): 139284
Calculated pI: 6.11
Taxonomy: *Bacillus* sp. 5B6

This protein sequence matches the following other entries:
gi|385151132 from *Bacillus* sp. 5B6
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|494888363 against nr.

Search parameters

MS data file: 37.1.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 10%

Matched peptides shown in ***bold***.

```
1     MKKKKMSPLL RRLNYFSPIE HHSNNHSQTT SEDRDWENVY RNRWQYDKVV

51    RSTHGVNCTG SCSWNIYVKN GIVTWEGQNL NYPSTGPDMP DFEPRGCPRG

101   ASFSWYIYSP LRVKYPYVRG VLINLWREAL QAHQNPLDAW KSIVENPEKA

151   KSYKQARGKG GFVRAEWPEV LKLISASLLY TVMKYGPDRN VGFSPIPAMS

201   MISHASGSRF MSLIGGPMLS FYDWYADLPP ASPQIWGDQT DVPESSDWYN

251   SGYIITWGSN VPLTRTPDAH FLAEARYKGA KVISISPDFA ESSKFADDWL

301   SIRQGTDGAL AMAMGHVILQ EFYVNQETER FIEYAKQYTD FPFFVTLSKE
```

351 NGVYTAGRFL HAKDIGRQTK NDHWKPAVWN EQTNEFAIPQ GTMGSRWDGQ

401 QKWNLHMIDE DTGEQIKPRL SVLGIEDEIG MVRIPYFSND GNKVLERNLP

451 IKKLDLNGEE TYVTTVFDLI LANYGVNRGI GGQSAASYDD PRPFTPAWQE

501 QITGIKR**EAV** **IQIAREFAQN** **AIDTDGR**SMI IVGAGINHWF NSDTIYRAVL

551 NLVLLVGAQG VNGGGWAHYV GQEK**LRPAEG** **WQTIATAK**DW EGVPKLQNGT

601 SFFYFATDQW RYEDQPISDL ASPIATSSRY KHHADYNVLA ARLGWLPSYP

651 TFNQNGIDLY KEAEK**AGAAT** **PEDVGAYVAS** **R**LQEKKLKFA IEDPDNEVNF

701 PRNLFVWR**AN** **LISSSGK**GHE YFLKHLLGTT NGLMNDDSDS IRPEEIKWRE

751 QAPEGKLDLL INLDFRMAGT ALYSDIVLPA ATWYEKHDLS STDMHPFIHP

801 FAPAISAPWE SKSDWDIFKA LSKAVSDLAE EVDMEPVKEV VATPLLHDTM

851 QELAQPFGKI NDWSKGECEA IPGKTMPNIH VVERDYKHIF HK**MTALGPHT**

901 **ALKPSGTK**GM SWSIADEYES LKQR**LGETDS** **NSVAK**GCPNI SEAKQAAEAI

951 LTLSSTSNGK VAVK**AWESLE** **NITNLK**LKDL AEEREEECFT FEQITAQPK**T**

1001 **VITSPAFTGS** **EK**GGRR**YSPF** **TTNVEK**LIPW RTLTGRQSYY VDHELMMEFG

1051 ETMATFKPIL QHRPFLSKRP DQEGKEIVLN YLTPHNKWSV HSMYFDSLPM

1101 LTLFRGGPTV WMNKDDAADT DIKDNDWIEC FNRNGVVVAR AVLSHRIPKG

1151 MAFMHHAQDR **HINVPGTK**LT NNRGGTHNSP TRIHVKPTQM IGGYAQLSYG

1201 FNYYGPTGNQ RDLNVVIRKL KEVDWLED

Unformatted sequence string: 1228 residues (for pasting into other applications).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Protein View: gi|452857429

extracellular serine protease [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036]

Database:	NCBInr
Score:	497
Nominal mass (Mr):	85868
Calculated pI:	6.40
Taxonomy:	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036

This protein sequence matches the following other entries:

gi|505231380 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|452081689 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|452857429 against nr.

Search parameters

MS data file: 37.1.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 14%
Matched peptides shown in ***bold***.

1 MKKGIIRYLL PAFVLSFTLS TSSQAAPASK PQTPDLEKAE VFGDIDMTTS

51 KQTTVIVELK EKSLAEAKEL GKAQTKSQLK SERAKVKKKA LKTIKHGKIN

101 REYEQVFSGF SMKLPANEIP KLLSDQDVKA VYPNVTYHTD QLKDKDITLS

151 KDAVSPQMDD SAPYIGANDA WKLGYTGKGV K**VAIIDTGVE** **YK**HPDLKKNF

201 GQYKGYDFVD NDYDPEETPS GDPR**GASTDH** **GTHVAGTVAA** **NGTIKGVAPD**

251 **ATLLAYR**VLG PGGSGTTENV IAGIERAVQD GADVMNLSLG NSVNNPDWAT

301 STALDWAMSE GVTAVTSNGN SGPNNWTVGS PGTSREAISV GATQLPLNEY

351 AVSFGSYSSA K**VMGYNKEDD** **IK**ALNKKETE LIEAGIGEQK DFEGKDLMGK

401 VAVVKRGSIA FVDKADNAKK AGAIGMVVYN NAPGEIEANV PGMSVPTIK**L**

451 **SSEDGEKLVS** **QLK**AGGTK**AT** **FNLSVAKSLT** **EQMADFSSR**G PVMDTWMIKP

501 DVSAPGVNIV STIPTHDPAD PYGYGSKQGT SMASPHVAGA AAVIKQAKPK

551 WSPEQIKAAL MNTAETLTDA DGDVYPHNAQ GAGSIRIMKA IKADSLVAPG

601 SYSYGTFMKD KGNETKKETF TIENQSSIRK SYQLEYSFNG TGITASGTDR

651 **VVIPAHQTGK** FNAKVKVNAK KVK**AGTYEGT** **VTVR**EGGKTV AK**VPTLLIVK**

701 EPDYPRVTSI DVQDGTTQGT YQIETYLPAG AEELAFLVYD SNLDFVGQAG

751 IYKKQDKGYQ YFDWNGKVNG DNALPAGEYY MLAYAANKGK SSQVLTEKPF

801 IIE

Unformatted sequence string: 803 residues (for pasting into other applications).

1.7 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.2) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	gi|154685878	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42]
2.	gi|308173427	dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit of both pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes [*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.	gi|375363628	leucyl aminopeptidase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]
4.	gi|493688262	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus sonorensis*]
5.	gi|452856816	leucyl aminopeptidase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036]
6.	gi|311067977	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus atrophaeus* 1942]
7.	gi|157692139	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus pumilus* SAFR-032]
8.	gi|294498116	pyruvate dehydrogenase complex E3 component, dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus megaterium* QM B1551]
9.	gi|569810017	dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex [*Bacillus hemicellulosilyticus* JCM 9152]
10.	gi|545132929	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus amyloliquefaciens*]

1.8 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.2) กับโปรตีน dihydrolipoamide dehydrogenase (gi|154685878)

Protein View: gi|154685878
dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42]

Database:	NCBInr
Score:	1263
Nominal mass (Mr):	49862
Calculated pI:	4.95
Taxonomy:	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42

This protein sequence matches the following other entries:
gi|384265012 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2
gi|387897997 from *Bacillus amyloliquefaciens* Y2
gi|429505015 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AS43.3
gi|530569207 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5033
gi|530614172 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113
gi|549698252 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
gi|556557225 from *Bacillus amyloliquefaciens* CC178
gi|494651719 from *Bacillus*
gi|154351729 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42
gi|380498365 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2
gi|385149081 from *Bacillus* sp. 5B6
gi|387172107 from *Bacillus amyloliquefaciens* Y2
gi|393805371 from *Bacillus* sp. 916
gi|429486605 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AS43.3
gi|530333367 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5033

gi|530337226 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113
gi|542013096 from *Bacillus amyloliquefaciens* EGD-AQ14
gi|549062214 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
gi|556019154 from *Bacillus amyloliquefaciens* CC178
gi|589092251 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* TrigoCor1448
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|154685878 against nr.

Search parameters
MS data file: 37.2.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 44%
Matched peptides shown in ***bold***.

1 MVVGDFPIET DTLVIGAGPG GYVAAIRAAQ LGQKVTVVEK **ATLGGVCLNV**

51 **GCIPSKALIN** **AGHR**YENAKH SDDMGITAEN VTVDFTKVQE WKASVVNK**LT**

101 **GGVAGLLKGN** **KVDVIKGEAY** **FVDSNSVRVM** **DENSAQTYTF** **KNAIIATGSR**

151 **PIELPNFK**YS ER**VLNSTGAL** **ALK**EIPKKLV VIGGGYIGTE LGTAYANFGT

201 ELVILEGGDE ILPGFEKQMS SLVTRRLK**KK** **GNVEIHTSAM** **AKGVEERPDG**

251 **VTVTFEVK**GE EK**TVDADYVL** **ITVGRRPNTD** **ELGLEQVGIE** **MTDR**GVIKTD

301 KQCR**TNVPNI** **YAIGDIIDGP** **PLAHK**ASYEG KIAAEAISGE PAEIDYLGIP

351 AVVFSEPELA SVGYTEAQAK **EEGIEVVAAK** **FPFAANGRAL** **SLNETDGFMK**

401 LITRKEDGLV IGAQIAGASA SDMISELSLA IEGGMTAEDI AMTIHAHPTL

451 GEITMEAAEV AIGSPIHIVK

Unformatted sequence string: 470 residues (for pasting into other applications).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.9 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.3) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	gi|384265809	carboxypeptidase Taq [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
2.	gi|375363628	leucyl aminopeptidase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]
3.	gi|452856816	leucyl aminopeptidase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5036]
4.	gi|384266016	dihydrolipoamide dehydrogenase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]

5.	gi|384267571	levansucrase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
6.	gi|14278884	flagellin [*Bacillus subtilis*]
7.	gi|498017568	aminopeptidase A [*Bacillus mojavensis*]

1.10 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.3) กับโปรตีน carboxypeptidase Taq (gi|384265809) และโปรตีน leucyl aminopeptidase (gi|375363628)

Protein View: gi|384265809

carboxypeptidase Taq [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]

Database: NCBInr

Score: 1062

Nominal mass (Mr): 57986

Calculated pI: 4.87

Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

This protein sequence matches the following other entries:

gi|387898817 from *Bacillus amyloliquefaciens* Y2

gi|504231122 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|380499162 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2

gi|387172927 from *Bacillus amyloliquefaciens* Y2

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|384265809 against nr.

Search parameters

MS data file: 37.3.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carboxymethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 46%

Matched peptides shown in **bold**.

1 MDLHTYEK**EF** **FDLLKR**VSHY VEAIALMHWD LRTGAPKKGS DDR**AESIGQL**

51 **SADVFQIQTS** **DR**MKELIDIL LAHAEELPED TVKAAELAKK DYDHNKK**IPE**

101 **DEYKEYVILT** **SKAETAWEDA** **KAASDFSMFA** **PYLEK**LINFN KRFISYWGYE

151 DHPYNALLDI FEPGVTVK**VL** **DQLFSELKEA** **IIPLIKKVTE** **SGNKPDTSFI**

201 **TKTFPKEQQR** **DLSLYFLK**EF GYDFDGGR**LD** **ETVHPFATTI** **NR**GDVRVTTR

251 **YDENDFR**TAI FGTIHECGHA IYEQNIDEAL SGTNLSDGAS MGIHESQSLF

301 YENFIARNQH FWTAYYEK**MV** **EASPDQFQDV** **KREDFVRAVN** **EAKPTFIRIE**

351 **ADELTYPLHI** **IIR**YEIEKAI FSNEVTVEEL PALWNQK**YHD** **YLGITPPSDA**

401 **K**GILQDVHWA GGDFGYFPSY ALGYMYAAQL K**HTMLDDLPE** **FDQLIERGDF**

451 **EPIKQWLTEK** VHQHGRR**KMP** **LDIIK**DATGE ELNVQYLIEY LVGKYSNLYL

Unformatted sequence string: 500 residues (for pasting into other applications).

Protein View: gi|375363628

leucyl aminopeptidase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]

Database: NCBInr

Score: 774

Nominal mass (Mr): 53641

Calculated pI: 4.88

Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946

This protein sequence matches the following other entries:

gi|451345666 from *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45

gi|568178620 from *Bacillus amyloliquefaciens* LFB112

gi|489243798 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|371569622 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946

gi|407076378 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* M27

gi|449849424 from *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45

gi|544267319 from *Bacillus amyloliquefaciens* UASWS BA1

gi|566057731 from *Bacillus amyloliquefaciens* LFB112

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|375363628 against nr.

Search parameters

MS data file: 37.3.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carboxymethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 38%

Matched peptides shown in ***bold***.

1 **MFYASDQLRH** **PETLVIGLFQ** **K**STLNGFTK**E** **LDDKLDGHLT** **QLLK**DGDVSA

51 KRNRVSK**VYP** **PAATGMK**R**IY** **FIGLGREADY** **SFEDTKECFA** **RVFQQIHQDK**

101 **K**QEVSVLLDT FVSGEVPAAD AAHALSESCL LAVYEVQDYK HK**SNEPDQEL**

151 **KSVCAVTEED** **LREVQAGLNV** **GAAYGQGTNS** **AR**TLVNMPGN MLTATDLASY

201 AAELAAKYDF ECEILEKDEM EELGMGGLLA VNKGSSEPPK MIVLKYQGKD

251 QWEDVIGLVG K**GITFDTGGY** **SIKPK**TGIVG MKSDMGGAAS VLGAMEIIGE

301 LRPEQNVLAV IPSTDNMISS DAMKPDDVIV SLSGK**TIEIL** **NTDAEGRLVL**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

351 **ADGITYAK**QH GASVLVDVAT LTGGVIVALG NEMTGAMTNH AAFYEQVAES

401 AK**ESGEPIWQ LPITEKDK**KR VR**NSQMADLN NSPGR**EGHAI MAGAFLGEFA

451 ENTPWVHLDI AGTATANKAT CFGPAGATGV MAR**TLAVLTE R**FTPER

Unformatted sequence string: 496 residues (for pasting into other applications).

1.11 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.4) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	gi|549699392	Flagellin A [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]
2.	gi|14278884	flagellin [*Bacillus subtilis*]
3.	gi|384265008	macrolactin synthesis [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
4.	gi|384266251	phage major capsid protein, HK97 family [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]
5.	gi|375362520	phage major capsid protein, HK97 family [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]
6.	gi|375362549	gamma-glutamyltransferase [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]
7.	gi|154688122	RocF [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42]

1.12 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-44 (ตัวอย่างที่ 37.4) กับโปรตีน Flagellin A (gi|549699392)

Protein View: gi|549699392

Flagellin A [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]

Database: NCBInr

Score: 1383

Nominal mass (Mr): 35431

Calculated pI: 4.95

Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3

This protein sequence matches the following other entries:

gi|549783040 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|549063354 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|549699392 against nr.

Search parameters

MS data file: S37.4.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 71%
Matched peptides shown in ***bold***.

```
1   MRINHNIAAL NTSRQLNAGS NSAAKNMEKL SSGLRINRAG DDAAGLAISE
51  KMRSQIRGLD MASKNAQDGI SLIQTSEGAL NETHSILQRM SELATQAAND
101 TNTDSDRSEL QKEMDQLSSE VTRISTDTEF NTKKLLDGTA KDLTFQIGAN
151 EGQTMTLSIN KMDSESLKVG TTYTAQADGT LKSGDGNSTA TWADEEVTDG
201 KVTKEAGYYD DKGALVGSEK LEEGEKLSKG IDISSSAKAA SSALTTIKTA
251 IDTVSSERAK LGAVQNRLEH TINNLGTSSE NLTSAESRIR DVDMASEMME
301 YTKNNILTQA SQAMLAQANQ QPQQVLQLLK G
```

Unformatted sequence string: 331 residues (for pasting into other applications).

1.13 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) กับโปรตีนในฐานข้อมูลมาตรฐาน NCBI

1.	gi|549699392	Flagellin A [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]
2.	gi|14278884	flagellin [*Bacillus subtilis*]
3.	gi|154685874	MlnI [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42]
4.	gi|375362520	phage major capsid protein, HK97 family [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]
5.	gi|495688415	Flagellin (Fragment) [*Desulfotomaculum hydrothermale*]
6.	gi|169826738	flagellin [*Lysinibacillus sphaericus* C3-41]

1.14 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ (finger print) ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในช่วงลำดับส่วนที่ 45-50 (ตัวอย่างที่ 38) กับโปรตีน Flagellin A (gi|549699392)

Protein View: gi|549699392
Flagellin A [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3]
Database: NCBInr
Score: 984
Nominal mass (Mr): 35431
Calculated pI: 4.95
Taxonomy: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
This protein sequence matches the following other entries:
gi|549783040 from *Bacillus amyloliquefaciens*

gi|549063354 from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|549699392 against nr.

Search parameters
MS data file: S38.1.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Protein sequence coverage: 52%
Matched peptides shown in ***bold***.

1 MR**INHNIAAL** **NTSR**QLNAGS NSAAKNMEKL SSGLRINR**AG** **DDAAGLAISE**

51 **K**MRSQIRGLD MASKNAQDGI SLIQTSEGAL NETHSILQRM SELATQAAND

101 TNTDSDRSEL QK**EMDQLSSE** **VTRISTDTEF** **NTKK**LLDGTA KDLTFQIGAN

151 EGQTMTLSIN KMDSESLK**VG** **TTYTAQADGT** **LKSGDGNSTA** **TWADEEVTDG**

201 **KVTKEAGYYD** **DKGALVGSEK** **LEEGEKLSKG** **IDISSSAKAA** **SSALTTIKTA**

251 **IDTVSSER**AK LGAVQNR**LEH** **TINNLGTSSE** **NLTSAESRIR** **DVDMASEMME**

301 **YTK**NNILTQA SQAMLAQANQ QPQQVLQLLK G

Unformatted sequence string: 331 residues (for pasting into other applications).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุดารัตน์ นุชวงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2553 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ในระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงานประชุมวิชาการ The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013) "Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity" ณ The Emerald Hotel, Bangkok ระหว่างวันที่ 16-19 ตุลาคม 2556 ในหัวข้อ Antifungal activity from Bacillus subtilis N3 against phytopathogen Bipolaris sp. โดยได้รับรางวัล Best paper award and Complimentary award in poster competition นอกจากนี้งานวิจัยบางส่วนยังจะนำไปเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ The 10th International Mycological Congress, Bangkok,Thailand ซึ่งจะจัดขึ้นที่ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ระหว่างวันที่ 13-18 สิงหาคม 2557 ในหัวข้อ Antifungal protein from Bacillus subtilis N3 against phytopathogen Bipolaris sp.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University