



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การแยกแยะที่เรียจากดินที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช		
ชื่อนิสิต	นางสาวธนวรรณ เต็มทรัพย์อนันต์	เลขประจำตัว	5832323123
ภาควิชา	จุลชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2561		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

Project : Isolation of bacteria from soil with antifungal activity against plant pathogenic fungi

Student : Miss Thanawan Termsapanan

Advisor : Asst. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science

Abstract

This research aimed to isolate bacteria from 13 rhizosphere soils of different plants consisting lemon, mulberry, grape, tamarind, mango, banana, lychee, milkwood pine, sweet tamarind, jackfruit, teak, Karonda and lettuce. The isolated bacteria were tested for their ability to inhibit 7 fungi that cause plant diseases which were *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Pyricularia oryzae* and *Phytophthora palmivora*. The top two isolates that were able to inhibit several types of fungi with the highest percentage were D9B56Y and G6B106. D9B56Y which was isolated from milkwood pine soil was able to inhibit *P. oryzae* and *F. moniliforme* at 45.83% and 34.48%, respectively; whereas G6B106 which was isolated from lettuce soil was able to inhibit *C. gloeosporioides*, *F. solani* and *P. oryzae* at 35.14%, 30.23% and 45.83%, respectively. Identification using morphological characteristics indicated that both isolates were Gram positive, endospore forming bacteria. Molecular genetics by analysis of nucleotide sequences of 16S rDNA and comparison with the database revealed that D9B56Y was closed related to *Bacillus amyloliquefaciens* MS622 (KY780539.1) 100.00%, and G6B106 was closed related to *Bacillus amyloliquefaciens* FS1092 (CP038028.1) 99.93%. Inhibition efficacy using cell-free supernatant of these isolated mixed with media at 1:1 ratio demonstrated that D9B56Y and G6B106 were able to inhibit the growth of all 7 fungi tested. Both isolates showed highest inhibition against *P. oryzae* at 64.52% and 100.00%, respectively. These preliminary results suggested that both D9B56Y and G6B106 can be developed for using in biological control against plant pathogenic fungi.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการเป็นอย่างดี สูง ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่าง ๆ พร้อมกับได้อบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดียิ่งใน การทำโครงการเสมอมา ตลอดจนช่วยตรวจทาน แก้ไข ปรับปรุงโครงการการเรียนการสอนเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงตามที่ได้ตั้งใจไว้

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนเพื่อดำเนินการ โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ประจำปีการศึกษา 2561 รวมทั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และสถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาคจุลชีววิทยาทุก ๆ ท่าน ที่ให้ความรู้ประสบการณ์และคำปรึกษาแก่ ผู้ทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บุคลากรภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก และ ให้ใช้สารเคมีในส่วนกลางในการทำงานวิจัยในโครงการนี้ รวมถึงขอบพระคุณพี่ ๆ ปริญาโทและปริญา เอกที่ช่วยให้คำแนะนำ วิธีการ และเทคนิคในการทำวิจัยในหลายขั้นตอน และที่สำคัญคือเพื่อน ๆ นิสิต ระดับปริญาตรีภาคจุลชีววิทยาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รับฟัง ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจ โดยเฉพาะ นางสาว ชีรนาฏ ธนาพงศ์ภัก ที่คอยทำงานวิจัยเคียงข้างกันมาตลอด เป็นกำลังใจ และผ่าน อุปสรรคต่าง ๆ มาด้วยกัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	10
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
บทที่ 2 เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์	
2.1 เครื่องมือ	11
2.2 เคมีภัณฑ์	12
2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์	13
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 การแยกแบคทีเรียจากดิน และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา	14
3.1.1 แยกแบคทีเรียจากดิน	14
3.1.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา	14
3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	15
3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	15
3.2.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุล	16
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อ	18

3.3.1	เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	18
3.3.2	ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืช	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง		19
4.1	การแยกแบคทีเรียจากดิน และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา	19
4.1.1	ผลการแยกแบคทีเรียจากดิน	19
4.1.2	ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา	20
4.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106	134
4.2.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ D9B56Y และ G6B106	134
4.2.2	ลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของ D9B56Y และ G6B106	135
4.3	การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	136
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง		141
เอกสารอ้างอิง		143
ภาคผนวก		147

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 สารสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR	16
ตารางที่ 3.2 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำปฏิกิริยา PCR	17
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการเจริญเติบโตของราทั้ง 7 ชนิด	20
ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยวิธี dual culture assay	22
ตารางที่ 4.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยวิธี dual culture assay	37
ตารางที่ 4.4 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยวิธี dual culture assay	53
ตารางที่ 4.5 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยวิธี dual culture assay	68
ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยวิธี dual culture assay	84
ตารางที่ 4.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยวิธี dual culture assay	100
ตารางที่ 4.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง <i>P. pulvimora</i> ด้วยวิธี dual culture assay	116
ตารางที่ 4.9 การยับยั้งราทั้ง 7 ชนิดได้สูงที่สุดโดยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต	133
ตารางที่ 4.10 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด	136
ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด	140

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โรคใบไหม้ของต้นข้าวที่เกิดจากเชื้อ <i>M. oryzae</i>	2
รูปที่ 1.2 อาการฝักเน่าของข้าวโพดที่เกิดจาก <i>F. verticillioides</i>	3
รูปที่ 1.3 อาการใบไหม้ (late blight) ของมันฝรั่งที่เกิดจาก <i>P. infestans</i>	3
รูปที่ 1.4 สปอร์ของ <i>F. oxosporum</i>	4
รูปที่ 1.5 สปอร์ของ <i>Puccinia</i>	5
รูปที่ 1.6 สปอร์ของ <i>B. graminis</i>	5
รูปที่ 1.7 ฝักข้าวโพดที่มีสปอร์ของ <i>U. maydis</i>	6
รูปที่ 1.8 สารเคมีที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม	7
รูปที่ 1.9 โครงสร้างทางเคมีของ iturin, surfactin และ fengycin	8
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งของรา และตำแหน่งของแบคทีเรียบนเพลท ด้วยวิธี dual culture assay	15
รูปที่ 4.1 ลักษณะของโคโลนีของไอโซเลต D9B56 (ชาย) และ G6B106 (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB	134
รูปที่ 4.2 ลักษณะของไอโซเลต D9B56Y (ชาย) และ G6B106 (ขวา) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,000X)	134
รูปที่ 4.3 ลักษณะเอนโดสปอร์ของไอโซเลต D9B56Y (ชาย) และ G6B106 (ขวา)	135
รูปที่ 4.4 อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากไอโซเลต D9B56Y และ G6B106	135

บทที่ 1

บทนำ

1.1 โรคพืชที่เกิดจากรา

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและมีประโยชน์มากกับสังคมยุคใหม่ โดยมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาเครื่องสำอางและอาหาร ในทางตรงกันข้าม ราเป็นภัยคุกคามต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และแมลง ที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตและความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ราและผลิตภัณฑ์จากรายังมีผลกระทบในทางลบต่อการเกษตรซึ่งเป็นภัยคุกคามร้ายแรงต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ด้วย (Hernandez และ Martinez, 2018)

การเกษตรมีความสำคัญกับคนไทยมาก เพราะนอกจากเป็นแหล่งอาหารหลักของคนไทยแล้วยังมีผลต่อเศรษฐกิจของไทยด้วย ดังนั้นการรักษาคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งสำคัญ ปัญหาหลักของผลผลิตทางการเกษตรมักจะเริ่มตั้งแต่ขณะปลูก เพราะมักจะมีศัตรูพืชที่ก่อปัญหาให้กับพืชหลายชนิด ศัตรูพืชที่เป็นปัญหาต่อพืชมากที่สุดคือ รา ที่นอกจากจะก่อปัญหาขณะปลูกแล้วยังสามารถก่อปัญหาหลังการเก็บเกี่ยวได้ (Alexander และคณะ 2011) ผลกระทบของราที่มีต่อมนุษย์ เริ่มจากการทำลายพืชที่เป็นอาหาร ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบต่อความยากจนทั่วโลก โดยสถิติจากการเก็บเกี่ยวโลกปี 2552-2553 จาก www.fao.org หรือ FAOSTAT1 พบว่าการสูญเสียพืชสำคัญทั่วโลก 5 อันดับแรก ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่ง และ ถั่วเหลือง มีสาเหตุจากราโรคพืช ซึ่งหากไม่เกิดความสูญเสียนี้หรือเกิดการลดลงของการสูญเสียก็จะมีพืชที่เป็นอาหารให้ 8.5% ของประชากรเจ็ดพันล้านคนในปี 2011 ได้ (Almeida และคณะ 2019)

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญที่สุดของโลก โดยเป็นอาหารของประชากรมนุษย์ มากกว่าครึ่งโลก (Londo และคณะ 2006) ข้าวและข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ได้รับความนิยมมากในแถบเอเชีย โดยมีพื้นที่ในการเพาะปลูกมาก เช่น ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน และบังกลาเทศ มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 13.6 ล้านเฮกตาร์ และในจีนมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 13 ล้านเฮกตาร์ (Nath และคณะ 2019) ข้าวและข้าวสาลีได้รับความนิยมในการบริโภคและเพาะปลูกทำให้ข้าวต้องมีการเพิ่มผลผลิตของเมล็ดข้าวและการปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดข้าว

ให้ดียิ่งขึ้นอีก เพื่อให้เพียงพอกับประชากรบนโลก (Gao และคณะ 2011) แต่ข้าวมักจะถูกคุกคามโดยราโรคพืช ทำให้ข้าวถูกทำลายทั่วโลกในระยะของการปลูก เช่น โรคไหม้ในข้าว (rice blast) ที่เกิดจาก *Magnaporthe oryzae* (Chen และคณะ 2018) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โรคใบไหม้ของต้นข้าวที่เกิดจากเชื้อ *M. oryzae*

(<http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=112-1.html>)

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) จัดอยู่ในตระกูลหญ้า Poaceae (Gramineae) พันธุ์ Maydeae ข้าวโพดสามารถเพาะปลูกได้และเป็นหนึ่งในพืชอาหารที่ได้รับความนิยมมากที่สุด ข้าวโพดได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมให้เหมาะกับสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้สามารถปลูกได้ง่ายและทำให้ข้าวโพดมีมูลค่าและมีค่าทางเศรษฐกิจสูงเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก เพราะนอกจากเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์แล้ว ยังถูกนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมในการผลิตผลิตภัณฑ์และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Xu และคณะ 2018) นอกจากนี้ข้าวโพดถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์อีกด้วย (Li และคณะ 2018) แต่ผลผลิตของข้าวโพดมักจะถูกทำลายโดยราที่ก่อโรค ราที่มักก่อโรคในต้นข้าวโพดคือ *Fusarium verticillioides* (teleomorph *Gibberella moniliformis*) ซึ่งก่อให้เกิดเมล็ดเน่า (seed rot), รากเน่า (root rot), ฝักเน่า (ear rot) และก้านเน่า (stalk rot) ในข้าวโพดดังรูปที่ 1.2 ราในสกุลนี้ยังสามารถผลิตสารพิษที่เรียกว่า fumonisin ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (Kharazian และคณะ 2017)



รูปที่ 1.2 อาการฝักเน่าของข้าวโพดที่เกิดจาก *F. verticillioides*

(https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/8460/toxp_203.JPG?sequence=1&isAllowed=y)

มันฝรั่งเป็นพืชทางการเกษตรที่สามารถปลูกได้ง่ายเพราะสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีในทั่วโลก ทำให้มันฝรั่งถูกปลูกมากเป็นอันดับที่ 4 รองจากข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยประเทศที่ปลูกมันฝรั่งมากที่สุดคือ ประเทศจีน ซึ่งเป็นผลสำรวจโดยองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO, 2013) (Yildizhan, 2017) มันฝรั่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ผู้คนทั่วโลกนิยมบริโภค แต่มันฝรั่งมักจะถูกทำลายโดย *Phytophthora infestans* ทำให้ต้นมันฝรั่งเป็นโรคใบไหม้ (late blight) ดังรูปที่ 1.3 และส่งผลให้สูญเสียผลผลิต (Pacilly และคณะ 2018)



รูปที่ 1.3 อาการใบไหม้ (late blight) ของมันฝรั่งที่เกิดจาก *P. infestans*

(https://th.wikipedia.org/wiki/ไฟทอปธอรา_อินเฟสตันส)

ถั่วเหลืองเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่สำคัญทั่วโลก โดยเมล็ดถั่วเหลืองมีน้ำมันมากและมักถูกเอาไปสกัดน้ำมัน ซึ่งเมล็ดถั่วเหลืองเป็นแหล่งสกัดน้ำมันหลักของโลก นอกจากนี้เมล็ดถั่วเหลืองยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูงอีกด้วย (Stuart และคณะ 2018) แต่ต้นถั่วเหลืองมักเกิดโรคใบจุด (leaf spot) และฝักจุด (pod spot) ที่มีสาเหตุจาก *Pycnidial spored* ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตอย่างมาก (Irinnyi และคณะ 2009)

โรคพืชที่เกิดจากรามีอีกหลายโรค เช่น โรคเหี่ยว (wilt) ที่เกิดจาก *Fusarium* (Khan และคณะ 2017), โรคราสนิม (rust) ที่เกิดจาก *Puccinia* และโรคราน้ำค้าง (mildew) ที่เกิดจาก *Blumeria* (Dracatos และคณะ 2018), โรคเขม่าดำ (smut) ที่เกิดจาก *Ustilago* (Snetselaar และ McCann, 2017), และโรคใบไหม้หรือโรคใบจุดตาเสื่อที่เกิดจาก *Phytophthora* (Morrison และคณะ 2017) เป็นต้น

โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxosporum* เป็นโรคที่คุกคามผลผลิตทางการเกษตรของมะเขือเทศ โดยส่วนมากเชื้อนี้จะทำให้มะเขือเทศเน่า โดยสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากรากของต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค นอกจากนี้เชืวยังมีสปอร์อยู่ในดินดังรูปที่ 1.4 และทำให้พืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เกิดโรคได้อีกด้วย (Mohammed และคณะ 2019)



รูปที่ 1.4 สปอร์ของ *F. oxosporum*

(<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Fusarium%20oxosporum>)

โรคราสนิม เป็นโรคที่เกิดจากราสนิม (Phylum Basidiomycota, Order Pucciniales) เป็นกลุ่มเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใหญ่ที่สุด โรคนี้เป็นสาเหตุทำให้สูญเสียผลผลิตทางการเกษตรกรรมอย่างมากมาย เช่น ผลผลิตของข้าวโพด โดยราเหล่านี้จะเพิ่มจำนวนบนใบข้าวโพด และมีการสร้างสปอร์สีน้ำตาลดังรูปที่ 1.5

เมื่อมีการงอกของสปอร์ผ่านปากใบเข้าไปจะทำให้เกิดการติดเชื้อและเกิดวงจรการติดเชื้อขึ้นภายในใบ สร้างความเสียหายต่อต้นข้าวโพด (Rochi และคณะ 2018)



รูปที่ 1.5 สปอร์ของ *Puccinia*

(ภาพจาก:

<https://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/PucciniaGraminis.aspx>)

โรคราน้ำค้าง เกิดจาก *Blumeria graminis* ที่ส่วนมากก่อให้เกิดการติดเชื้อในต้นข้าวสาลี ทำให้สูญเสียผลผลิตและส่งผลกระทบต่อคุณภาพของข้าวสาลีอีกด้วย เชื้อนี้ไม่ได้ก่อโรครากับเมล็ดของข้าวสาลีโดยตรง เพราะอาการของโรคแสดงออกในบางเมล็ดเท่านั้น แต่อาจเกิดจากการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อของต้นพืชโดยอาจมีการงอกของสปอร์ (Li และคณะ 2017) ดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 สปอร์ของ *B. graminis*

(ภาพจาก: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/5712>)

โรคเขม่าดำ เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Ustilago maydis* และพบว่าก่อโรคในข้าวโพด เชื้อนี้ทำลายบริเวณฝักข้าวโพดเป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่ถือว่าเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากการสูญเสีย

ผลผลิตน้อยมาก แต่ราชนิดนี้สามารถเหนียวนำไปห่อที่มีการสร้างสารพิษ เช่น *Aspergillus* spp. และ *Fusarium* spp. ให้เจริญบนผลผลิตทางการเกษตร ทำให้หากผู้บริโภครับประทานเข้าไปจะได้รับอันตรายจากสารพิษเหล่านี้ได้ โดยราชนิดนี้จะเห็นได้ชัดที่บริเวณฝักของข้าวโพด ซึ่งมีการสร้างสปอร์สีดำชัดเจน (Abbas และคณะ 2017) ดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 ฝักข้าวโพดที่มีสปอร์ของ *U. maydis*

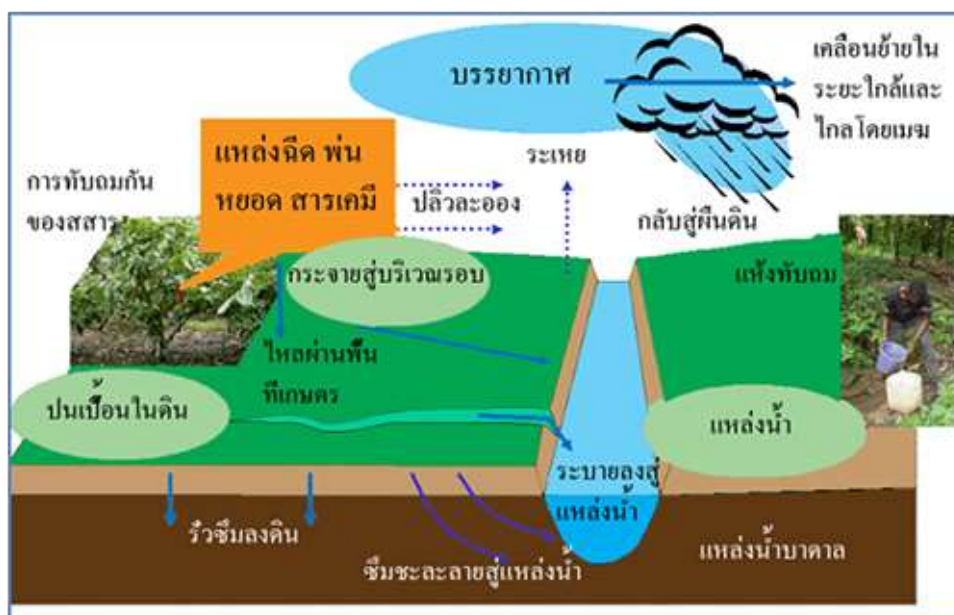
(https://www.allposters.com/-sp/Corn-Zea-Mays-Infected-with-Corn-Smut-Ustilago-Maydis-Posters_i6016227_.htm)

ทั้งนี้ มีการจัดอันดับราที่ก่อโรคและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ 10 อันดับแรก จากการสำรวจของประชาคมระหว่างประเทศ คือ (1) *Magnaporthe oryzae*, (2) *Botrytis cinerea*, (3) *Puccinia* spp., (4) *Fusarium graminearum*, (5) *Fusarium oxysporum*, (6) *Blumeria graminis*, (7) *Mycosphaerella graminicola*, (8) *Colletotrichum* spp., (9) *Ustilago maydis*, และ (10) *Melampsora lini* (DEAN และคณะ 2012)

1.2 การควบคุมราโรคพืช

ปัจจุบันมีการแก้ไขปัญหที่เกิดจากราโดยใช้สารเคมี เช่น 1,3-dimethylxanthine ซึ่งมีสมบัติยับยั้งรา (Borowiecki และคณะ 2018) สารเคมีที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งคือ โพรพิเนบ (propineb) แต่สารเคมีเหล่านี้ต้องการระยะเวลาในการสลายไป เช่น จากการทดลองใช้โพรพิเนบในกล้วยและดิน

พบว่าครึ่งชีวิตของโพรฟิเนบในกล้วยและดินมีค่าอยู่ระหว่าง 4.4 ถึง 13.3 วัน ตามลำดับ (Song และคณะ 2018) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารเคมีที่ใช้ในการทำลายราจะมีการตกค้างในผลิตภัณฑ์พืชและสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในรูปที่ 1.8 และอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายหากได้รับประทานพืชนั้นเข้าไป และเนื่องจากการระบาดของของราได้เพิ่มขึ้นอย่างมากในรอบหลายปีที่ผ่านมา สารเคมีที่ใช้กันในปัจจุบันมีความเป็นพิษหรือมีแนวโน้มว่าจะทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ได้ และยังอาจส่งผลทำให้เราพัฒนาเพื่อต้านทานต่อสารเคมีขึ้นได้ (Lazzarini และคณะ 2018) ดังนั้นจึงมีความต้องการสารใหม่ที่มีสมบัติที่ดีขึ้นเพื่อการยับยั้งรา



รูปที่ 1.8 สารเคมีที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม

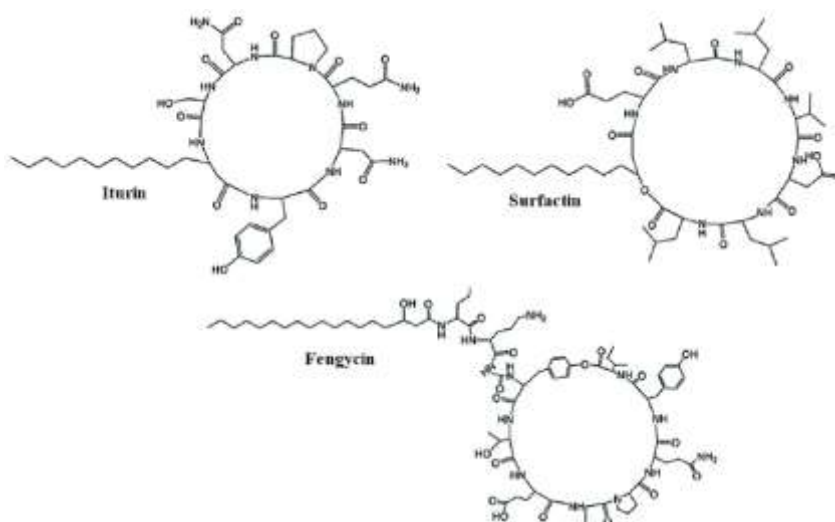
<https://biothai.net/node/8688>

นอกจากการใช้สารเคมีแล้ว ยังมีการใช้วิธีการอื่น ๆ ในการควบคุมการเจริญของราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น การควบคุม *Magnaporthe oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในข้าวและทำลายความมั่นคงด้านอาหารทั่วโลก โดยเฉพาะพื้นที่ที่ปลูกข้าวเป็นอาหารหลักนั้น หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าว หากสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมของ *M. oryzae* ได้ ก็จะทำให้สามารถสร้างกลยุทธ์ที่ช่วยให้เซลล์ *M. oryzae* ลดการเจริญเติบโตของรานี้ในข้าวได้ประมาณ 10-30% (Fernandez และ Wilson, 2014)

อีกวิธีหนึ่งที่ปลอดภัย ไม่มีสารตกค้าง และเป็นวิธีทางธรรมชาติมากที่สุด คือ การใช้การควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) ซึ่งเป็นการใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นปฏิปักษ์กับราที่ก่อโรค เช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งราโรคพืช แหล่งที่สามารถพบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้มี

หลากหลาย เช่น ในดิน ในน้ำ สิ่งปฏิภูล หรือแม้กระทั่งในสัตว์และพืช (Czajkowski และคณะ 2016) แบคทีเรียปฏิภูลที่มีรายงานแล้ว ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Paenibacillus* และเนื่องจากแบคทีเรียพวก Bacilli ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในฐานะตัวแทนการควบคุมโรคพืชในเชิงพาณิชย์ จึงมีการใช้เชื้อเหล่านี้ในภาวะเลียนแบบระบบนิเวศเพื่อควบคุมรา (Khalaf และ Raizada, 2018)

Bacillus ยังเป็นที่รู้จักกันในด้านที่เป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) รวมไปถึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมศัตรูพืชและโรคต่าง ๆ ได้ (Hollensteiner และคณะ 2016) มีรายงานว่า *Bacillus* หลายสปีชีส์สามารถผลิตเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งผลิตสารระเหยมวลโมเลกุลต่ำพวกลิโปเพปไทด์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราโรคพืช เช่น surfactin, fengycin, polymyxin, bacitracin และกลุ่มของ iturin (Torres และคณะ 2016) ดังรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 โครงสร้างทางเคมีของ iturin, surfactin และ fengycin

(https://www.researchgate.net/figure/The-structures-of-iturin-surfactin-and-fengycin-all-share-a-common-structure_fig1_321229104)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารระเหยอินทรีย์ หรือ Volatile Organic Compounds (VOC) ได้ โดยเป็นกลุ่มของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราและการงอกของสปอร์ราที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ตัวอย่างของสารระเหยอินทรีย์กลุ่มนี้ เช่น 2-nonanone, 2-methylpyrazine และ β -benzene ethanamine แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้ และยังคงมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (Gao และคณะ 2018) โดยปกติแล้ว *Bacillus* จะพบได้ในดิน เช่น สามารถแยก *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ DA12 จากดิน และเมื่อตรวจสอบ

ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา โดยยังพบว่า สารสกัดบิวทานอลจาก *B. amyloliquifaciens* DA12 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Fusarium graminearum* ได้อย่างมาก และเมื่อตรวจสอบพบว่าสารสกัดบิวทานอลเป็นสาร iturin A และพบว่ามีสารสร้างสารระเหยอินทรีย์ด้วย (Lee และคณะ 2017)

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมราโรคพืชได้หลากหลายชนิด โดยมีรายงานการทดลองกลไกการยับยั้งราของสารสกัดจาก *Bacillus* และพบว่าสามารถขัดขวางการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของพลาสมาเมมเบรนของรา ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านและเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์รา (Gao และคณะ 2009) อีกตัวอย่างหนึ่ง เช่น *Bacillus atrophaeus* และ *Bacillus mojavensis* มีรายงานว่าสามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช เช่น *Fusarium* sp. และ *Fulvia fulva* ที่ก่อโรคในต้นมะเขือเทศ, *Fusarium* sp. และ *Vesinfectum* sp. ที่ก่อโรคในต้นฝ้าย โดยมีกลไกการยับยั้งโดยการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา ได้แก่ protease, cellulase, lipase, และ chitinase เป็นต้น (Mohamad และคณะ 2018) นอกจากนี้ มีเอนไซม์ oxalate decarboxylase (OxDC) ที่พบใน *Bacillus subtilis* โดย OxDC สามารถกระตุ้นการสลายตัวของกรดออกซาลิกและทำให้พืชต้านทานต่อการติดเชื้อราได้ (Qi และคณะ 2017) นอกจากนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราโรคพืชได้แล้ว แบคทีเรียเหล่านี้ยังสามารถลดการสร้างสารพิษจากราได้ เช่น *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเป็นราสายพันธุ์ที่มักจะปนเปื้อนพืชอาหารหลากหลายชนิด โดยรากลุ่มนี้สามารถสร้างสารพิษ ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตทางเศรษฐกิจและทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตราย ซึ่งโดยปกติการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินสามารถปนเปื้อนได้ทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต *Bacillus* spp. ที่สามารถแยกได้จากดินสามารถผลิตลิโปเปปไทด์ออกมา ทำให้การเจริญเติบโตของ *A. parasiticus* ลดลง และลดความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน AFB1 ที่ผลิตจาก *A. parasiticus* (González Pereyra และคณะ 2018)

นอกจาก *Bacillus* แล้วยังมีแบคทีเรียอื่นที่สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ เช่น เอนโดไฟท์แบคทีเรีย (endophytic bacteria) ซึ่งพบได้ในพืชทั่วไป เพราะเป็น microbiome ของพืชอยู่แล้ว โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช และทำหน้าที่เป็น biocontrol ต่อเชื้อที่ก่อโรคในพืชเหล่านี้ผ่านกลไกต่าง ๆ รวมทั้งการผลิตสารระเหยด้วย เช่น *Pseudomonas stutzeri* (E25) และ *Stenotrophomonas maltophilia* (CR71) แสดงการยับยั้งราโรคพืชได้ดีกับ *Botrytis cinerea* โดยการปล่อยสารอินทรีย์ระเหย และสารที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนั้นเป็นสารประกอบที่

ประกอบด้วยซัลเฟอร์ เช่น ไดเมทิลดิสซัลไฟด์ ซึ่งทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนสายพันธุ์ร่วมของเอนโดไฟท์ และนำไปใช้ในการควบคุมราโรคพืชได้ (Rojas-Solis และคณะ 2018)

ปัจจัยสำคัญที่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งราโรคพืชได้ คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านราโรคพืช มีรายงานว่า *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการต้านราโรคพืชจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของราได้ เช่น โคติเนส, กลูคาเนส, เซลลูเลส, ไลเปส และโปรตีเอส (Bjelic และคณะ 2018) งานวิจัยของ Khan และคณะ พบว่า *B. subtilis* 30VD-1 ที่สามารถทำให้เส้นใยของรบบางลงโดยการทำงานของกลูคาเนส และ/หรือโคติเนส โดยยังรายงานว่ายีน *nagZ* ซึ่งประมวลรหัสให้ β -N-อะซีทิลเฮกโซซามินิเดส ยังสามารถทำลายไคโมลินและโมโนเมอร์ของ N-อะซีทิลกลูโคซามิน ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของไคตินได้อีกด้วย (Khan และคณะ 2018)

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อฝึกวางแผน และออกแบบการทดลองด้วยตนเอง
2. เพื่อค้นหาแบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราที่ก่อโรคในพืช
3. แยก และพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย

ได้แบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราโรคพืช โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนี้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมราโรคพืชทดแทนสารเคมีเพื่อลดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม และเป็นมิตรกับสิ่งมีชีวิตด้วย

บทที่ 2

เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 เครื่องมือ

กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH 30 ของบริษัท Olympus, Japan

เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

เครื่องซั่งละเอียดรุ่น A 200s ของบริษัท Forma Science, USA

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น ss-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan

เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น 200H ของบริษัท Hittich zentrifugen, Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น รุ่น T-42K ของบริษัท Beckman, USA

เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA

จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ Sterilized Petri Dish Plastic, Polystyrene (Standard) 60 x 15 mm. บริษัท BIOSCAN, China

จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ Sterilized Petri Dish Plastic, virgin polystyrene 15x90 mm บริษัท Hycon Plastics, Thailand

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electronic Co., Japan

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 บริษัท ISSCO, USA

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท Memmert, Germany

ตู้อบแห้ง (hot air oven) บริษัท Memmert, Germany

ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร บริษัท Nichiryo, Japan

หลอดไมโครพิวซ์ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท F.L. medical s.r.l., Italy

ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน บริษัท Millipore, USA

ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ภาชนะเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ บริษัท Mupid-2 Advance, Japan

ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel document) บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA

Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร

2.2 เคมีภัณฑ์

คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ของบริษัท Merck, Germany

ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJet Genomic DNA purification kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany

ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

ผงวุ้น (agar)

ผงสกัดจากมันฝรั่ง (Potato dextrose) ของบริษัท HiMedia Laboratories, USA

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA

เอทานอล ของบริษัท J.T. Baker, USA

ไอโอดีน (Iodine) ของบริษัท Merck, Germany

1 Kb DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand

DNAzol[®] Reagent ของบริษัท Invitrogen, USA

GoTaq[®] Green Master Mix ของบริษัท Promega, USA

2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับ (5'-->3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกแบคทีเรียจากดิน และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา

3.1.1 แยกแบคทีเรียจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต้นพืช ได้แก่ ต้นมะนาว ต้นหม่อน ต้นองุ่น ต้นมะขามเทศ ต้นมะม่วง ต้นกล้วย ต้นลิ้นจี่ ต้นตีนเป็ด ต้นมะขามหวาน ต้นขนุน ต้นสัก ต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่ และต้นผักสลัด บันทึกลักษณะของดิน เช่น เนื้อดิน ความชื้น สี

นำดินมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยชั่งดิน 1 กรัม และนำไปเจือจางในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจางที่ 10^{-2} และนำ 1 มิลลิลิตร จากความเจือจางนี้ไปเจือจางในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร ต่อไปจนได้ความเจือจางที่ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} และ 10^{-8}

ดูดสารแขวนลอยดินที่ความเจือจาง 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} และ 10^{-8} มาความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก.1) จากนั้น spread plate จำนวน 2 ซ้ำต่อหนึ่งตัวอย่าง และนำเพลทไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แล้วนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นนำเพลทไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.1.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา

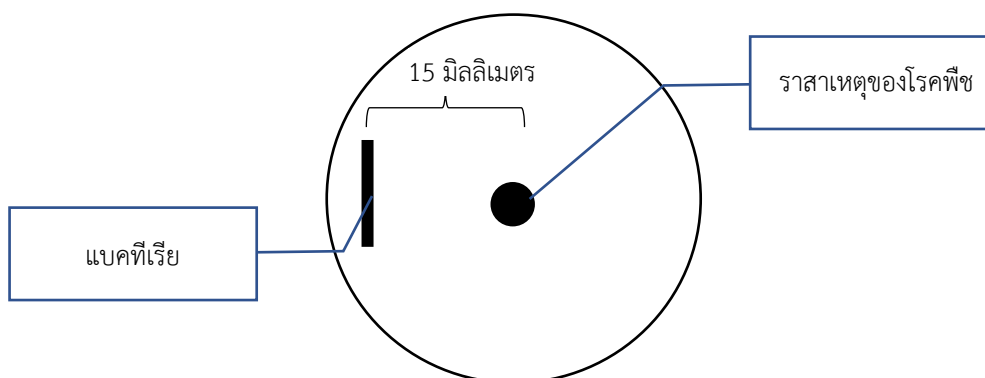
1) เตรียมราที่ต้องการนำมาทดสอบ

เลี้ยงราที่ต้องการนำมาทดสอบ ได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Pyricularia oryzae* และ *Phytophthora palmivora* โดยเลี้ยงรา 6 ชนิดแรกบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก.2) และเลี้ยง *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง V8 (ภาคผนวก ก.3) บ่มเพลทที่ 25°C เป็นเวลา 4-5 วัน

2) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา โดยวิธี dual culture assay

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato dextrose สำหรับทดสอบการยับยั้งรา 6 ชนิด ได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. proliferatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* และ *Flexivirga oryzae* และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง V8 สำหรับทดสอบการยับยั้ง *P. palmivora* โดยเจาะรูบนราด้วย cork borer และใช้ hook เกี่ยวรูบนรา จากนั้นวางรูบนราสาเหตุของโรคพืชไว้ตรงกลางเพลท ชีดแบคที่เรียให้ห่างจากราประมาณ 15 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3.1 จากนั้นนำเพลทไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 3-5 วัน และวัดระยะที่เกิดบริเวณที่ยับยั้งและนำไปคำนวณ โดยใช้สูตร

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



รูป 3.1 ตำแหน่งของรา และตำแหน่งของแบคทีเรียบนเพลท ด้วยวิธี dual culture assay

3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- 1) spread plate บนอาหารแข็งชนิด LB นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี
- 2) ทดสอบสมบัติการย้อมติดสีแกรม (Gram stain)
- 3) ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์

3.2.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

1) สกัด DNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อใช้เป็น DNA แม่แบบ

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 2 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJet Genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific) โดยเติม 180 μ l Gram-positive bacteria lysis buffer และ 18 μ l lysozyme 10 mg/ml ลงในตะกอนเซลล์ บ่มที่ 37°C 30 นาที เติม 200 μ l lysis solution และ 20 μ l Proteinase K จากนั้น vortex และบ่มที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาที เติม 20 μ l RNase A จากนั้น vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 400 μ l 50% ethanol และ mix ด้วยปิเปตต์ ย้ายสารละลายไปใส่ใน column แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 1 นาที เติม 500 μ l wash buffer I จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม 500 μ l wash buffer II แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์เปล่า 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม 200 μ l elution ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลาย DNA ที่แยกได้ที่ -20°C

2) ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16sDNA

เตรียมปฏิกิริยาโดยเติมสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 ลงหลอด PCR ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 สารสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Gotaq® Green Master Mix, 2X	50	1X
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 27F 10 μ M	2.0	0.1-1.0 μ M
รีเวิร์สไพรเมอร์ 1492R 10 μ M	2.0	0.1-1.0 μ M
DNA แม่แบบ		<250 ng
-D9B56 (conc. 13.7)	30	
-G6B106 (conc. 31.9)	12.5	
เติมน้ำปราศจากนิวคลีโอสให้เต็ม	100	N.A.

3) ทำปฏิกิริยา PCR โดยมีภาวะตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำปฏิกิริยา PCR

Step	Temp	Time	number of cycles
Initial Denaturation	95°C	1 min	
Denaturation	95°C	30 sec	30-35
Primer Annealing	55°C	45 sec	
Extension	72°C	2 min per kb	
Final Extension	72°C	7 min	

3) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ gel electrophoresis

เตรียม agarose gel 0.8% (ภาคผนวก ข.1) จากนั้นนำเข้าไมโครเวฟเพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ผสมสี SERVA DNA Stain G ลงในเจล และเทลง tray ที่ใส่ comb ไว้แล้ว ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว นำ comb ออก จากนั้นนำเจลพร้อม tray ไปวางในถาดที่มี 10X TAE Buffer (ภาคผนวก ข.2) ท่วมเจล จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เตรียมได้มาไหลลงในหลุม พร้อมด้วย GeneRuler™ 1kb DNA marker ทำ gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 100 V. ประมาณ 30 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยแสงยูวี ตัดเจลที่มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 1,500 kb ซึ่งคาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของบริเวณ 16sDNA ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์โดยใช้ชุดเครื่องมือตัดเจล เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

4) การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำเจลที่มีแถบ DNA ที่เตรียมได้มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) โดยเติม Binding buffer ปริมาตรเท่ากับน้ำหนักเจล แล้วบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที ใส่สารละลาย 800 μ l ลงในคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที เทส่วนล่างทิ้ง เติมสารละลายที่เหลือ และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เติม 700 μ l wash buffer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm 1 นาที ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์เปล่า 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม 30 μ l elution buffer แล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm 1 นาที วัดความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ แล้วส่งไปหาลำดับ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม BioEdit เพื่อ merge ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 เส้น คือจากฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และจากรีเวิร์สไพรเมอร์ และสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ จากนั้นนำไปเข้าอัลกอริธึม blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ใน LB broth 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปวัด OD₆₀₀ ให้ได้ประมาณ 0.5 และดูด 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน LB broth ใหม่ที่มีปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในขวดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm ที่ 4°C นำส่วนใสมากรองเมื่อขจัดเซลล์แบคทีเรีย ผ่าน milipore filter ขนาด 0.45 μm จะได้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืช

เตรียมราที่ต้องการนำมาทดสอบ ได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *P. oryzae* และ *P. palmivora* โดยเลี้ยงรา 6 ชนิดแรกบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato dextrose agar (PDA) และเลี้ยง *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง V8 บ่มเพลทที่ 25°C เป็นเวลา 4-5 วัน

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.1 มาผสมกับอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 55°C ด้วยอัตราส่วน 1:1 หรือผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง V8 อุณหภูมิ 55°C ด้วยอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน

ทดสอบความสามารถการยับยั้ง โดยเจาะรูบนเพลทด้วย cork borer และใช้ hook เกี่ยวรู้น รามาวางตรงกลางเพลทที่เตรียมไว้ นำเพลทไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 3-5 วัน สำหรับชุดควบคุมเลี้ยงรบบนอาหารแข็งที่มีเพียง PDA หรือ V8 ที่ผสมกับอาหารเหลว LB ในอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรา แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกแยะที่เรียจากดิน และการทดสอบความสามารถในการ ยับยั้งรา

4.1.1 ผลการแยกแยะที่เรียจากดิน

จากการสังเกตลักษณะของดินตัวอย่างที่เก็บมาจากบริเวณต่าง ๆ พบลักษณะดังนี้

ดินจากบริเวณต้นมะนาว

ลักษณะดิน: ดินร่วนเม็ดละเอียด เนื้อดินนิ่ม ไม่มีรากพืช มีสีน้ำตาลอมแดง

ดินจากบริเวณต้นหม่อน

ลักษณะดิน: ดินร่วน เป็นเม็ด ๆ เกาะกันเป็นก้อนแข็ง มีรากพืชเล็กน้อย สีน้ำตาลอมแดง

ดินจากบริเวณต้นองุ่น

ลักษณะดิน: ดินร่วน เป็นผงละเอียด มีรากพืชเล็กน้อย มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ

ดินจากบริเวณต้นมะขามเทศ

ลักษณะดิน: ดินสีน้ำตาลเข้มอมแดง เม็ดดินแข็งและขนาดใหญ่ บางส่วนจับกันเป็นก้อนใหญ่ มีเศษพืชปนอยู่ เช่น กิ่งไม้ ใบไม้

ดินจากบริเวณต้นมะม่วง

ลักษณะดิน: ดินร่วน ชื้น ลักษณะเป็นเม็ดเกาะกันเป็นก้อนแข็ง ไม่มีรากพืช สีน้ำตาลแดง

ดินจากบริเวณต้นกล้วย

ลักษณะดิน: ดินร่วนสีน้ำตาลเข้ม เนื้อดินเป็นเม็ด ไม่ค่อยชื้น มีเศษพืชเล็กน้อย

ดินจากบริเวณต้นลิ้นจี่

ลักษณะดิน: ดินร่วนเม็ดละเอียดสีน้ำตาลแดง มีความชื้นมากและมีเศษพืช

ดินจากบริเวณต้นตีนเป็ด

ลักษณะดิน: ดินร่วนกึ่งเหนียว เนื้อดินแน่นแต่ละเอียด สามารถเกาะกันเป็นก้อนได้ มีเศษพืชเล็กน้อย

ดินจากบริเวณต้นมะขามหวาน

ลักษณะดิน: ดินเหนียวสีน้ำตาลแดง เนื้อดินละเอียด ไม่ค่อยมีเศษพืช

ดินจากบริเวณต้นขนุน

ลักษณะดิน: ดินสีน้ำตาลเข้ม เป็นเม็ดเกาะกันเป็นก้อน มีเศษพืชเล็กน้อย

ดินจากบริเวณต้นสัก

ลักษณะดิน: ดินร่วนกึ่งเหนียว เนื้อดินละเอียด สีน้ำตาลแดง ไม่มีเศษพืช

ดินจากบริเวณต้นมะม่วงหาว มะนาวโห่

ลักษณะดิน: ดินร่วนเนื้อละเอียด สีน้ำตาล มีรากพืชเล็กน้อย

ดินจากบริเวณต้นผักสลัด





ลักษณะดิน: เนื้อดินละเอียดมาก ค่อนข้างแห้ง สีน้ำตาลดำ มีใยมะพร้าว







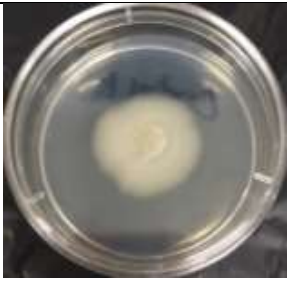



เมื่อนำตัวอย่างดินมาเจือจาง และ spread เพลท พบว่า ที่ความเจือจางต่าง ๆ มีโคโลนีลักษณะต่าง ๆ ขึ้น โดยมีความแตกต่างกัน เช่น สีของโคโลนี ขอบของโคโลนี ความมันหรือด้านของโคโลนี เป็นต้น โดยแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ 131 ไอโซเลต แบ่งเป็นประเภทเจริญเร็ว 66 ไอโซเลต และเจริญปกติ 75 ไอโซเลต

4.1.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการเจริญของรา 7 ชนิด บนเพลทควบคุมแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการเจริญเติบโตของราทั้ง 7 ชนิด







ชนิดของรา	ผลการเจริญเติบโตของรา		ลักษณะการเจริญ
	ด้านบน	ด้านล่าง	
<i>C. gloeosporioides</i>			เส้นใยภายในอาหารและเส้นใยเหนืออาหารมีสีขาว ลักษณะฟู
<i>F. proliferatum</i>			เส้นใยภายในอาหารมีสีเหลืองและเส้นใยเหนือ

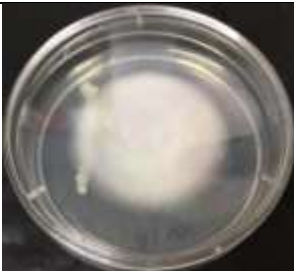
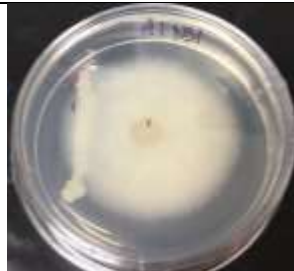










			อาหารมีสีขาว ลักษณะฟู
<i>F. solani</i>			เส้นใยภายใน อาหารมีสีครีม และเส้นใยเหนือ อาหารมีสีขาว ลักษณะฟู
<i>P. oryzae</i>			เส้นใยภายใน อาหารมีสีเขียว เข้ม ด้านนอกสี ขาวและเส้นใย เหนืออาหารมีสี ขาว ไม้ฟู
<i>F. moniliforme</i>			เส้นใยภายใน อาหารมีสีเหลือง และเส้นใยเหนือ อาหารมีสีขาว ลักษณะฟู
<i>A. furcatum</i>			เส้นใยภายใน อาหารและเส้นใย เหนืออาหารมีสี ขาว ไม้ฟู
<i>P. pulvimora</i>			เส้นใยภายใน อาหารและเส้นใย เหนืออาหารมีสี ขาวใส ลักษณะ โคโลนีเป็นดอก กุหลาบ



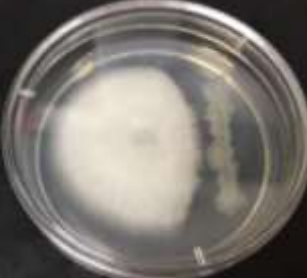









ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา โดยวิธี dual culture assay โดยเจาะรูที่มีรูเสาเหตุของโรคพืชด้วย cork borer นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บริเวณกลางเพลท จากนั้นขีดแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโดยใช้ลูบ ให้ห่างจากราประมาณ 15 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน และสังเกตการเจริญของรา ผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งราทั้ง 7 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 - 4.8 ดังต่อไปนี้







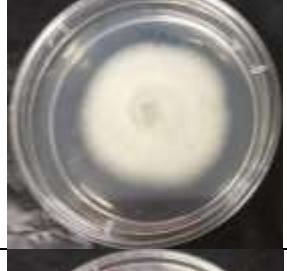





*ทดสอบเพียง 87 ไอโซเลตเนื่องจากเมื่อทำการ re-streak พบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตไม่เจริญ



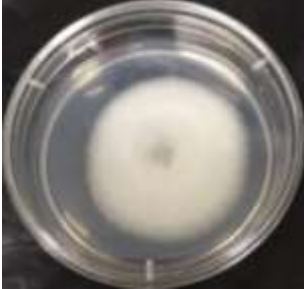
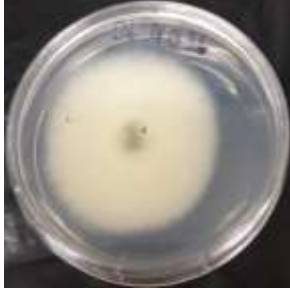








ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture assay













เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	cm.	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	3.5	35			
ควบคุม 2	3.7	37			
ควบคุม 3	3.9	39			
เฉลี่ย	3.7	37			













A1NB1	3.2	32	13.51%		
A2NB2	4	40	-8.11%		
A4NB4	3	30	18.92%		
A5NB5	3.1	31	16.22%		
A9NB9	3.6	36	2.70%		
A10NB10	3.6	36	2.70%		













B1NB11	3.1	31	16.22%		
B2NB12	3.3	33	10.81%		
B3NB13	3.9	39	-5.41%		
B5NB15	3.8	38	-2.70%		
B8NB18	4	40	-8.11%		
B10NB20	3.7	37	0.00%		













C1NB21	3.4	34	8.11%		
C3NB23	4	40	-8.11%		
C4NB24	3.6	36	2.70%		
C5NB25	3.7	37	0.00%		
C6NB26	3.4	34	8.11%		
D3NB33	3.1	31	16.22%		













D5NB35	3.7	37	0.00%		
D6NB36	3.5	35	5.41%		
D8NB38	3.1	31	16.22%		
E7NB50	3.9	39	-5.41%		
E9NB53	3.2	32	13.51%		
E10NB55	3.8	38	-2.70%		













F1NB59 ส้ม	2.2	22	40.54%		
F3NB62	3.5	35	5.41%		
F4NB63	3.5	35	5.41%		
F6NB65	4.2	42	-13.51%		
F8NB68	4.1	41	-10.81%		
F9NB69	3.2	32	13.51%		









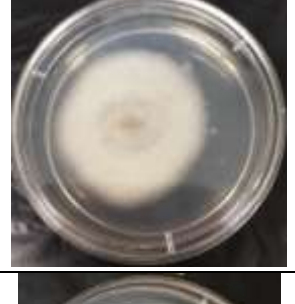
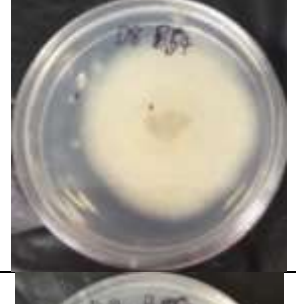


F10NB72	3.5	35	5.41%		
G1NB73	3.8	38	-2.70%		
G3NB76	3.4	34	8.11%		
G5NB80	3.9	39	-5.41%		
G6NB81	3.8	38	-2.70%		
G7NB83	3.2	32	13.51%		

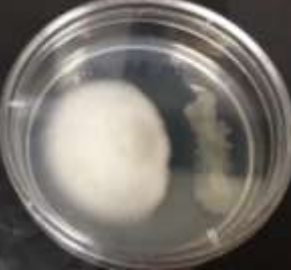











G10NB87	3.1	31	16.22%		
H1NB88	2.8	28	24.32%		
H3NB96	3.1	31	16.22%		
H5NB102	2.2	22	40.54%		
A2B2	2.9	29	21.62%		
A4B4	2.9	29	21.62%		


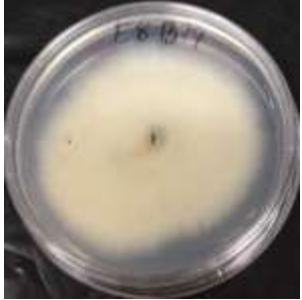





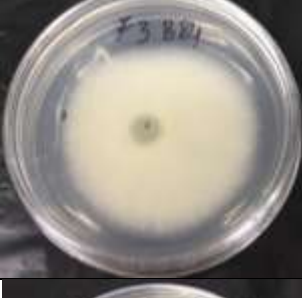

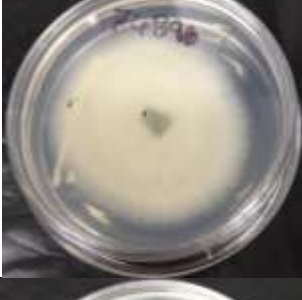


A5B5	3.1	31	16.22%		
A7B7	3	30	18.92%		
A10B10	2.7	27	27.03%		
B1B11	2.5	25	32.43%		
B4B14	2.6	26	29.73%		
B5B15	2.4	24	35.14%		









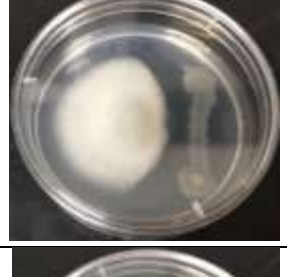



B7B17	2.9	29	21.62%		
B9B19	3	30	18.92%		
C2B23	2.9	29	21.62%		
C3B24	2.6	26	29.73%		
C4B25	3	30	18.92%		
C5B27	3	30	18.92%		







C6B28	3	30	18.92%		
C7B29	4	40	-8.11%		
C8B31	3.7	37	0.00%		
C9B32	3.2	32	13.51%		
C10B33	3.1	31	16.22%		
D3B39	3.1	31	16.22%		

D4B46	3.1	31	16.22%		
D5B47	4.2	42	-13.51%		
D6B52	3.6	36	2.70%		
D7B53	4.1	41	-10.81%		
D8B54	3.7	37	0.00%		
D9B56 ขาว	2.8	28	24.32%		

D9B56Y	2.7	27	27.03%		
D10B57	3.3	33	10.81%		
E1B58	3.8	38	-2.70%		
E3B61	3.5	35	5.41%		
E4B62	4	40	-8.11%		
E7B71	3.3	33	10.81%		

E8B74	4.3	43	-16.22%		
E10B77	2.8	28	24.32%		
F1B79	3.3	33	10.81%		
F3B84	3.3	33	10.81%		
F4B90	3.9	39	-5.41%		
F5B91	2.1	21	43.24%		













F7B93	3	30	18.92%		
F8B94	3.6	36	2.70%		
F10B99	2.4	24	35.14%		
G1B100	3.2	32	13.51%		
G2B101	2.8	28	24.32%		
G3B103	2.7	27	27.03%		









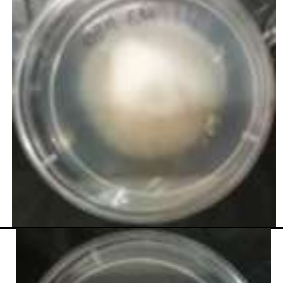



G4B104	2.9	29	21.62%		
G5B105	2.2	22	40.54%		
G6B106	2.4	24	35.14%		













จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ 37 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B1NB11, B2NB12, B5NB15, C5NB25, D5NB25, E7NB50, F8NB68, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราของชุดทดลองและชุดควบคุม













ตารางที่ 4.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยวิธี dual culture assay













เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	cm.	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	3.6	36			













ควบคุม 2	3.8	38			
ควบคุม 3	3.5	35			
เฉลี่ย	3.6	36.3			
A1NB1	3.5	35	3.58%		
A2NB2	3.4	34	6.34%		
A4NB4	2.6	26	28.37%		
A5NB5	3.3	33	9.09%		










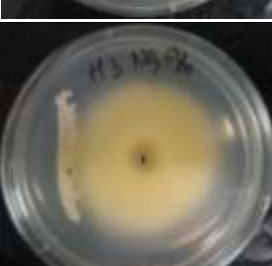


A9NB9	3.4	34	6.34%		
A10NB10	3.6	36	0.83%		
B1NB11	3.6	36	0.83%		
B2NB12	3.2	32	11.85%		
B3NB13	3.7	37	-1.93%		
B5NB15	3.8	38	-4.68%		











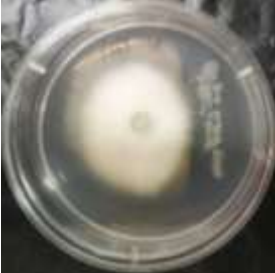

B8NB18	3.8	38	-4.68%		
B10NB20	3.9	39	-7.44%		
C1NB21	3.6	36	0.83%		
C3NB23	3.8	38	-4.68%		
C4NB24	3.5	35	3.58%		
C5NB25	3.5	35	3.58%		













C6NB26	3.8	38	-4.68%		
D3NB33	3.6	36	0.83%		
D5NB35	3.8	38	-4.68%		
D6NB36	3.6	36	0.83%		
D8NB38	4	40	-10.19%		
E7NB50	3.6	36	0.83%		













E9NB53	3.7	37	-1.93%		
E10NB55	3.6	36	0.83%		
F1NB59 ส้ม	3.6	36	0.83%		
F3NB62	3.5	35	3.58%		
F4NB63	4	40	-10.19%		
F6NB65	3.8	38	-4.68%		













F8NB68	4	40	-10.19%		
F9NB69	3.8	38	-4.68%		
F10NB72	3.7	37	-1.93%		
G1NB73	3.4	34	6.34%		
G3NB76	4	40	-10.19%		
G5NB80	3.6	36	0.83%		









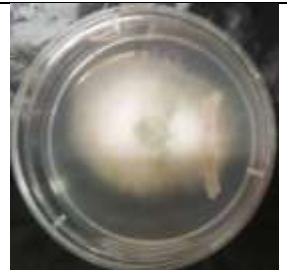



G6NB81	3.6	36	0.83%		
G7NB83	3.6	36	0.83%		
G10NB87	3.4	34	6.34%		
H1NB88	3.5	35	3.58%		
H3NB96	3.9	39	-7.44%		
H5NB102	3.9	39	-7.44%		













A2B2	3.1	31	14.60%		
A4B4	3.1	31	14.60%		
A5B5	2.9	29	20.11%		
A7B7	2.8	28	22.87%		
A10B10	3.2	32	11.85%		
B1B11	3.1	31	14.60%		






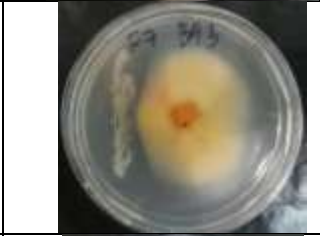








B4B14	2.5	25	31.13%		
B5B15	2.9	29	20.11%		
B7B17	3.1	31	14.60%		
B9B19	2.2	22	39.39%		
C2B23	2.7	27	25.62%		
C3B24	3.2	32	11.85%		









C4B25	2.2	22	39.39%		
C5B27	2.8	28	22.87%		
C6B28	2.7	27	25.62%		
C7B29	3.7	37	-1.93%		
C8B31	3.7	37	-1.93%		
C9B32	3.7	37	-1.93%		

C10B33	3.8	38	-4.68%		
D3B39	3.4	34	6.34%		
D4B46	3	30	17.36%		
D5B47	3.9	39	-7.44%		
D6B52	3.8	38	-4.68%		
D7B53	3.6	36	0.83%		

D8B54	4	40	-10.19%		
D9B56 ขาว	2.7	27	25.62%		
D9B56Y	2.8	28	22.87%		
D10B57	3.8	38	-4.68%		
E1B58	4.1	41	-12.95%		
E3B61	3.7	37	-1.93%		











E4B62	3.8	38	-4.68%		
E7B71	2.9	29	20.11%		
E8B74	3.8	38	-4.68%		
E10B77	3.3	33	9.09%		
F1B79	3.6	36	0.83%		
F3B84	3.7	37	-1.93%		







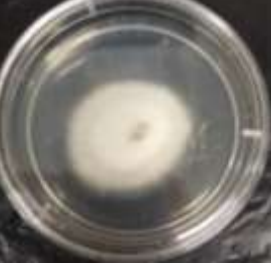





F4B90	3.6	36	0.83%		
F5B91	2.2	22	39.39%		
F7B93	3.1	31	14.60%		
F8B94	3.8	38	-4.68%		
F10B99	2.5	25	31.13%		
G1B100	2.8	28	22.87%		
G2B101	2.8	28	22.87%		













G3B103	2.5	25	31.13%		
G4B104	3.2	32	11.85%		
G5B105	3	30	17.36%		
G6B106	3	30	17.36%		









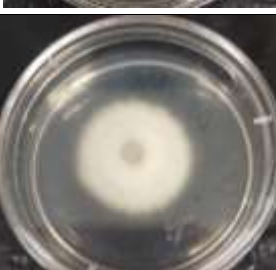



จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. proliferatum* ได้ 31 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B2NB12, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราของชุดทดลองและชุดควบคุม



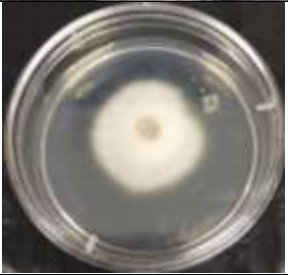



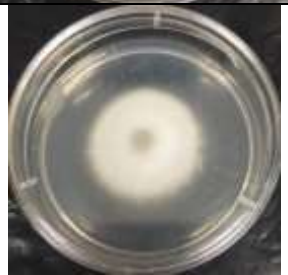
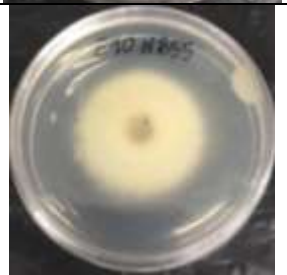




ตารางที่ 4.4 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *F. solani* ด้วยวิธี dual culture assay





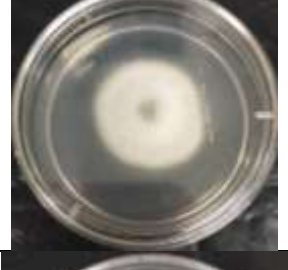
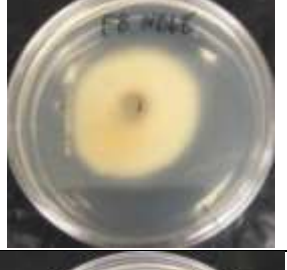






เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	cm	mm		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	3.3	33			
ควบคุม 2	3.6	36			
ควบคุม 3	3.4	34			
เฉลี่ย	3.4	34.3			
A1NB1	3.5	35	-2.04%		
A2NB2	3.7	37	-7.87%		





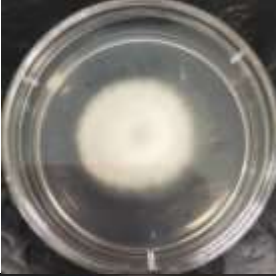







A4NB4	3	30	12.54%		
A5NB5	3.1	31	9.62%		
A9NB9	3.5	35	-2.04%		
A10NB10	3.5	35	-2.04%		
B1NB11	3.2	32	6.71%		
B2NB12	2.7	27	21.28%		









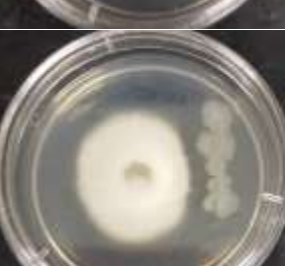



B3NB13	3.4	34	0.87%		
B5NB15	3.5	35	-2.04%		
B8NB18	3.7	37	-7.87%		
B10NB20	3.4	34	0.87%		
C1NB21	3.3	33	3.79%		
C3NB23	3.4	34	0.87%		








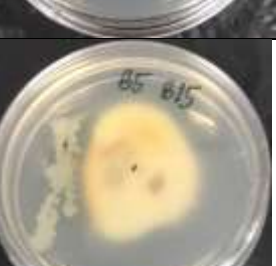



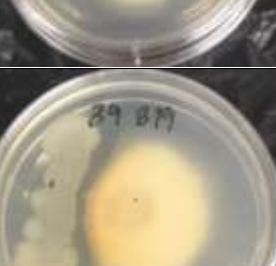
C4NB24	3.4	34	0.87%		
C5NB25	3.4	34	0.87%		
C6NB26	3.3	33	3.79%		
D3NB33	3.4	34	0.87%		
D5NB35	3.5	35	-2.04%		
D6NB36	3.5	35	-2.04%		

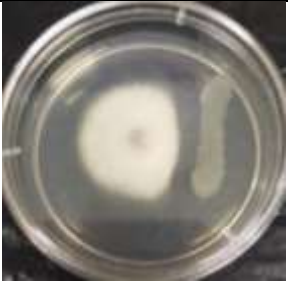











D8NB38	3.4	34	0.87%		
E7NB50	3.2	32	6.71%		
E9NB53	3.5	35	-2.04%		
E10NB55	3.6	36	-4.96%		
F1NB59 ส้ม	3.5	35	-2.04%		
F3NB62	3.7	37	-7.87%		

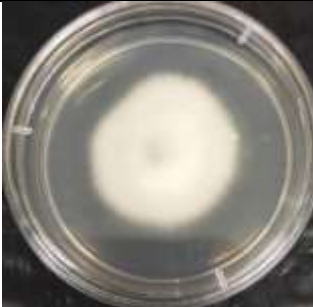











F4NB63	3.7	37	-7.87%		
F6NB65	3.5	35	-2.04%		
F8NB68	3.3	33	3.79%		
F9NB69	3.4	34	0.87%		
F10NB72	3.5	35	-2.04%		
G1NB73	3.7	37	-7.87%		





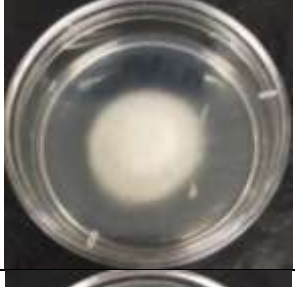
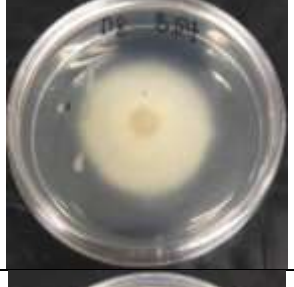






G3NB76	3.5	35	-2.04%		
G5NB80	3.4	34	0.87%		
G6NB81	3.6	36	-4.96%		
G7NB83	3.5	35	-2.04%		
G10NB87	3.4	34	0.87%		
H1NB88	3.3	33	3.79%		










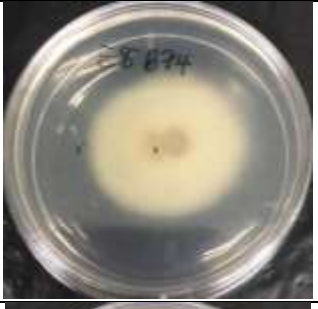


H3NB96	3.3	33	3.79%		
H5NB102	3.3	33	3.79%		
A2B2	3.1	31	9.62%		
A4B4	2.8	28	18.37%		
A5B5	2.9	29	15.45%		
A7B7	2.7	27	21.28%		


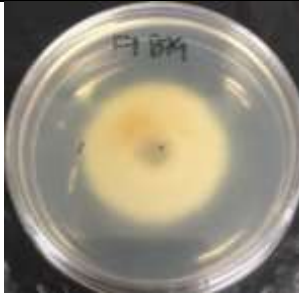
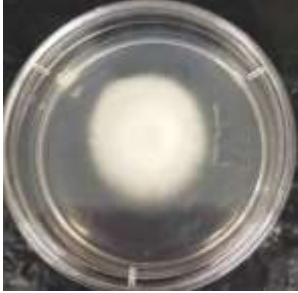





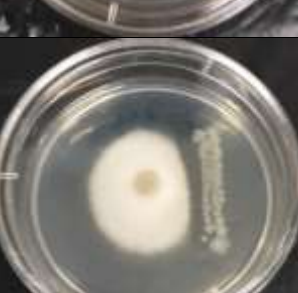


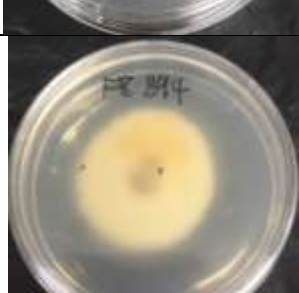
A10B10	2.9	29	15.45%		
B1B11	2.7	27	21.28%		
B4B14	2.7	27	21.28%		
B5B15	3	30	12.54%		
B7B17	2.9	29	15.45%		
B9B19	2.9	29	15.45%		













C2B23	2.9	29	15.45%		
C3B24	2.9	29	15.45%		
C4B25	2.7	27	21.28%		
C5B27	2.5	25	27.11%		
C6B28	2.6	26	24.20%		
C7B29	3.4	34	0.87%		

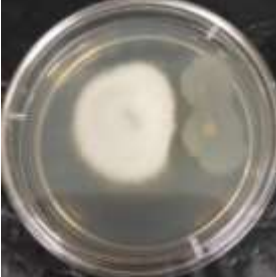

C8B31	3.5	35	-2.04%		
C9B32	3.7	37	-7.87%		
C10B33	3.5	35	-2.04%		
D3B39	3.3	33	3.79%		
D4B46	2.8	28	18.37%		
D5B47	3.6	36	-4.96%		

D6B52	3.5	35	-2.04%		
D7B53	3.3	33	3.79%		
D8B54	3.3	33	3.79%		
D9B56 ขาว	2.5	25	27.11%		
D9B56 เหลือง	3	30	12.54%		
D10B57	3.5	35	-2.04%		

E1B58	3.5	35	-2.04%		
E3B61	3.3	33	3.79%		
E4B62	3.4	34	0.87%		
E7B71	2.5	25	27.11%		
E8B74	3.5	35	-2.04%		
E10B77	2.6	26	24.20%		



F1B79	3.7	37	-7.87%		
F3B84	3.3	33	3.79%		
F4B90	3.6	36	-4.96%		
F5B91	2.7	27	21.28%		
F7B93	2.5	25	27.11%		
F8B94	3.4	34	0.87%		




F10B99	2.8	28	18.37%		
G1B100	2.8	28	18.37%		
G2B101	2.7	27	21.28%		
G3B103	3.2	32	6.71%		
G4B104	2.6	26	24.20%		
G5B105	2.6	26	24.20%		













					
G6B106	2.9	29	15.45%		













จากการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. solani* ได้ 31 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B2NB12, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ข้าว, D9B56 เหลือง, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราของชุดทดลองและชุดควบคุม













ตารางที่ 4.5 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture assay













เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	(cm)	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	2.1	21			
ควบคุม 2	2.6	26			













ควบคุม 3	2.7	27			
ควบคุม 4	3.5	35			
ควบคุม 5	3.1	31			
ควบคุม 6	3.3	33			
เฉลี่ย	2.9	29			
A1NB1	3.1	31	-6.90%		













A2NB2	2.8	28	3.45%		
A4NB4	1.7	17	41.38%		
A5NB5	2.9	29	0.00%		
A9NB9	2.1	21	27.59%		
A10NB10	2.9	29	0.00%		
B1NB11	2.8	28	3.45%		













B2NB12	2.1	21	27.59%		
B3NB13	3.1	31	-6.90%		
B5NB15	2.8	28	3.45%		
B10NB20	3.3	33	-13.79%		
C1NB21	3.4	34	-17.24%		
C3NB23	3.2	32	-10.34%		













C4NB24	3.3	33	-13.79%		
C5NB25	3.1	31	-6.90%		
C6NB26	2.9	29	0.00%		
D3NB33	3.3	33	-13.79%		
D5NB35	2.5	25	13.79%		
D6NB36	2.9	29	0.00%		













D8NB38	2.7	27	6.90%		
E7NB50	2.5	25	13.79%		
E9NB53	3	30	-3.45%		
E10NB55	3.4	34	-17.24%		
F1NB59 ส้ม	2.9	29	0.00%		
F3NB62	2.8	28	3.45%		













F4NB63	2.9	29	0.00%		
F6NB65	2.9	29	0.00%		
F8NB68	3.3	33	-13.79%		
F9NB69	3	30	-3.45%		
F10NB72	2.6	26	10.34%		
G1NB73	3.3	33	-13.79%		













G3NB76	2.7	27	6.90%		
G5NB80	2.9	29	0.00%		
G6NB81	1.9	19	34.48%		
G7NB83	3.3	33	-13.79%		
G10NB87	2.8	28	3.45%		
H1NB88	2.8	28	3.45%		













H3NB96	2.6	26	10.34%		
H5NB102	3.3	33	-13.79%		
A2B2	1.3	13	55.17%		
A4B4	1.9	19	34.48%		
A5B5	2.3	23	20.69%		
A7B7	1.5	15	48.28%		













A10B10	1.2	12	58.62%		
B1B11	1.4	14	51.72%		
B4B14	1.9	19	34.48%		
B5B15	2	20	31.03%		
B7B17	1.8	18	37.93%		
B9B19	1	10	65.52%		













C2B23	2.2	22	24.14%		
C3B24	2	20	31.03%		
C4B25	2	20	31.03%		
C5B27	1.7	17	41.38%		
C6B28	1.3	13	55.17%		
C7B29	3.4	34	-17.24%		



C8B31	3.3	33	-13.79%		
C9B32	3.3	33	-13.79%		
C10B33	3	30	-3.45%		
D3B39	1.8	18	37.93%		
D4B46	2.1	21	27.59%		
D5B47	2.8	28	3.45%		

D6B52	2.8	28	3.45%		
D7B53	3.1	31	-6.90%		
D8B54	3.4	34	-17.24%		
D9B56 ขาว	1.4	14	51.72%		
D9B56Y	1.8	18	37.93%		
D10B57	2.7	27	6.90%		

E1B58	2.9	29	0.00%		
E3B61	2.4	24	17.24%		
E4B62	2.8	28	3.45%		
E7B71	1.5	15	48.28%		
E8B74	2.9	29	0.00%		
E10B77	2	20	31.03%		

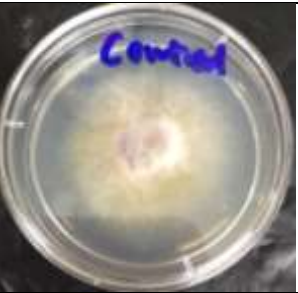



F1B79	3.4	34	-17.24%		
F3B84	3.2	32	-10.34%		
F4B90	3	30	-3.45%		
F5B91	2.3	23	20.69%		
F7B93	2.1	21	27.59%		
F8B94	3.3	33	-13.79%		


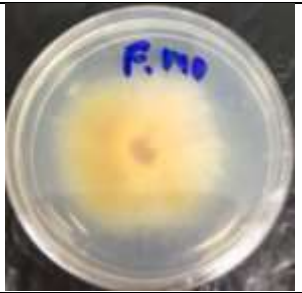










F10B99	1.3	13	55.17%		
G1B100	1.5	15	48.28%		
G2B101	1.5	15	48.28%		
G3B103	1.5	15	48.28%		
G4B104	1.5	15	48.28%		
G5B105	2.1	21	27.59%		


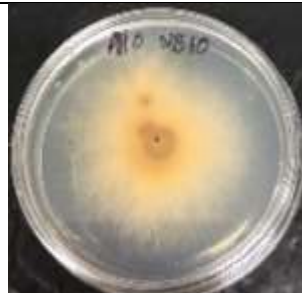










G6B106	1.8	18	37.93%		
--------	-----	----	--------	--	---













จากการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้ 32 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, A5NB5, B2NB12, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของรากของชุดทดลองและชุดควบคุม


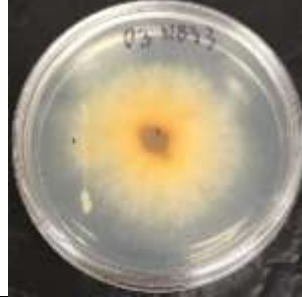










ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยวิธี dual culture assay



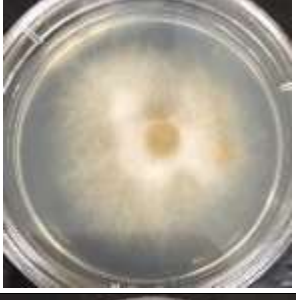









เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	cm.	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	4.2	42			
ควบคุม 2	4.4	44			





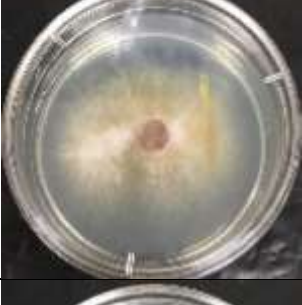
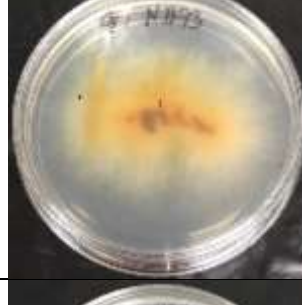
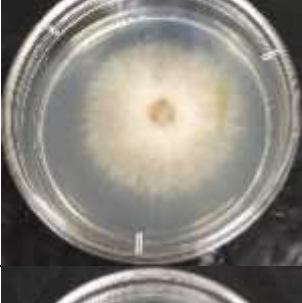





ควบคุม 3	4.4	44			
เฉลี่ย	4.3	43			
A1NB1	4.5	45	-4.65%		
A2NB2	4.3	43	0.00%		
A4NB4	3.3	33	23.26%		
A5NB5	3.9	39	9.30%		
A9NB9	4.5	45	-4.65%		










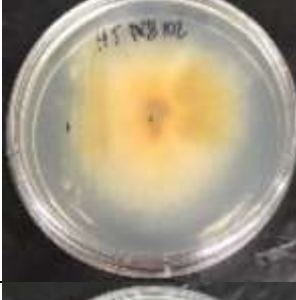


A10NB10	4.4	44	-2.33%		
B1NB11	4.1	41	4.65%		
B2NB12	3.2	32	25.58%		
B3NB13	4.3	43	0.00%		
B5NB15	4.4	44	-2.33%		
B8NB18	4.5	45	-4.65%		








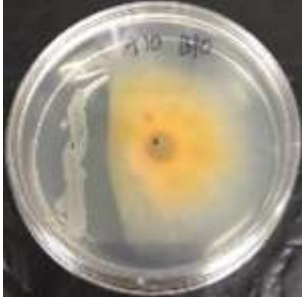




B10NB20	3.9	39	9.30%		
C1NB21	4.3	43	0.00%		
C3NB23	4.4	44	-2.33%		
C4NB24	4	40	6.98%		
C5NB25	4.2	42	2.33%		
C6NB26	4.5	45	-4.65%		













D3NB33	4.4	44	-2.33%		
D5NB35	4.2	42	2.33%		
D6NB36	4	40	6.98%		
D8NB38	4.4	44	-2.33%		
E7NB50	4.4	44	-2.33%		
E9NB53	4.3	43	0.00%		













E10NB55	4.5	45	-4.65%		
F1NB59 ส้ม	4.5	45	-4.65%		
F3NB62	4.3	43	0.00%		
F4NB63	3.7	37	13.95%		
F6NB65	4.1	41	4.65%		
F8NB68	4.3	43	0.00%		


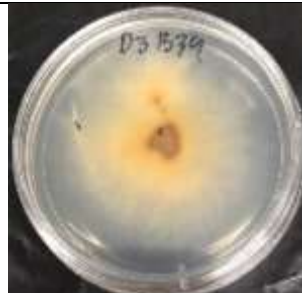

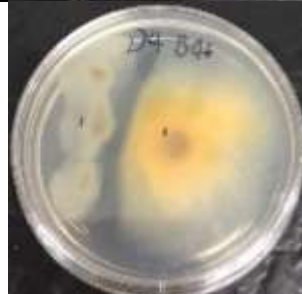








F9NB69	4.8	48	-11.63%		
F10NB72	4.2	42	2.33%		
G1NB73	4.7	47	-9.30%		
G3NB76	4.3	43	0.00%		
G5NB80	4.6	46	-6.98%		
G6NB81	3.8	38	11.63%		













G7NB83	4.4	44	-2.33%		
G10NB87	4.1	41	4.65%		
H1NB88	4.1	41	4.65%		
H3NB96	4.3	43	0.00%		
H5NB102	4.2	42	2.33%		
A2B2	3.4	34	20.93%		












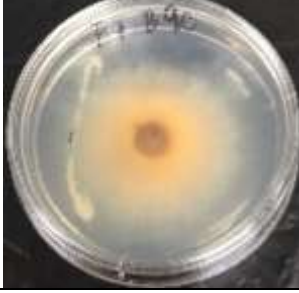
A4B4	3.2	32	25.58%		
A5B5	3.4	34	20.93%		
A7B7	3.2	32	25.58%		
A10B10	3.5	35	18.60%		
B1B11	3.1	31	27.91%		
B4B14	3.2	32	25.58%		








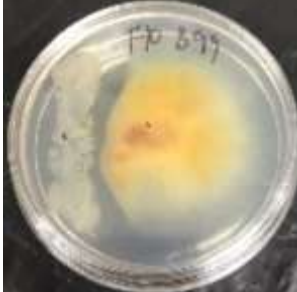




B5B15	3.1	31	27.91%		
B7B17	3.2	32	25.58%		
B9B19	3.3	33	23.26%		
C2B23	3.2	32	25.58%		
C3B24	3	30	30.23%		
C4B25	3.3	33	23.26%		









C5B27	3.2	32	25.58%		
C6B28	3.2	32	25.58%		
C7B29	4.5	45	-4.65%		
C8B31	4.4	44	-2.33%		
C9B32	4.2	42	2.33%		
C10B33	4.2	42	2.33%		

D3B39	4.3	43	0.00%		
D4B46	3.1	31	27.91%		
D5B47	4.5	45	-4.65%		
D6B52	4.5	45	-4.65%		
D7B53	4.4	44	-2.33%		
D8B54	4	40	6.98%		

D9B56 ขาว	3.3	33	23.26%		
D9B56Y	3.1	31	27.91%		
D10B57	4.5	45	-4.65%		
E1B58	4.1	41	4.65%		
E3B61	4.4	44	-2.33%		
E4B62	4.5	45	-4.65%		











E7B71	3.4	34	20.93%		
E8B74	4.4	44	-2.33%		
E10B77	3.2	32	25.58%		
F1B79	4.5	45	-4.65%		
F3B84	4.3	43	0.00%		
F4B90	4.3	43	0.00%		


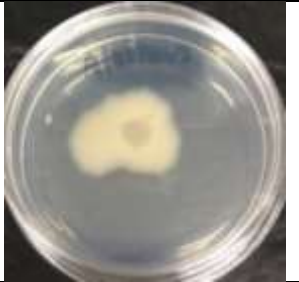










F5B91	3.1	31	27.91%		
F7B93	3.5	35	18.60%		
F8B94	4.1	41	4.65%		
F10B99	3.3	33	23.26%		
G1B100	3.3	33	23.26%		
G2B101	3.2	32	25.58%		













G3B103	3	30	30.23%		
G4B104	3.1	31	27.91%		
G5B105	3.4	34	20.93%		
G6B106	3	30	30.23%		













จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. moniliforme* ได้ 32 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B2NB12, F4NB63, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราของชุดทดลองและชุดควบคุม













ตารางที่ 4.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยวิธี dual culture assay













เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	(cm)	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	2.8	28			
ควบคุม 2	2.7	27			
ควบคุม 3	2.7	27			
ควบคุม 4	1.7	17			
ควบคุม 5	2	20			













ควบคุม 6	2.3	23			
ควบคุม 7	2.2	22			
ควบคุม 8	2.4	24			
ควบคุม 9	2.4	24			
เฉลี่ย	2.4	24			
A1NB1	2.5	25	-4.17%		
A2NB2	3.1	31	-29.17%		













A4NB4	1.6	16	33.33%		
A5NB5	2.3	23	4.17%		
A9NB9	2.5	25	-4.17%		
A10NB10	2.3	23	4.17%		
B1NB11	2.4	24	0.00%		
B2NB12	1.6	16	33.33%		













B3NB13	2.4	24	0.00%		
B5NB15	2.4	24	0.00%		
B8NB18	2.6	26	-8.33%		
B10NB20	2.4	24	0.00%		
C1NB21	2.1	21	12.50%		
C3NB23	2.2	22	8.33%		













C4NB24	2.4	24	0.00%		
C5NB25	2.6	26	-8.33%		
C6NB26	2.5	25	-4.17%		
D3NB33	2.9	29	-20.83%		
D5NB35	2.4	24	0.00%		
D6NB36	2.4	24	0.00%		













D8NB38	2.2	22	8.33%		
E7NB50	2.4	24	0.00%		
E9NB53	2.5	25	-4.17%		
E10NB55	2.5	25	-4.17%		
F1NB59 ส้ม	2.3	23	4.17%		
F3NB62	2.6	26	-8.33%		













F4NB63	2.6	26	-8.33%		
F6NB65	2.3	23	4.17%		
F8NB68	2.9	29	-20.83%		
F9NB69	2.2	22	8.33%		
F10NB72	3.1	31	-29.17%		
G1NB73	2.4	24	0.00%		













G3NB76	2.6	26	-8.33%		
G5NB80	3.4	34	-41.67%		
G6NB81	2.4	24	0.00%		
G7NB83	3.3	33	-37.50%		
G10NB87	2.5	25	-4.17%		
H1NB88	2.4	24	0.00%		













H3NB96	2.9	29	-20.83%		
H5NB102	2.5	25	-4.17%		
A2B2	2.2	22	8.33%		
A4B4	1.8	18	25.00%		
A5B5	2	20	16.67%		
A7B7	1.9	19	20.83%		













A10B10	1.6	16	33.33%		
B1B11	1	10	58.33%		
B4B14	2	20	16.67%		
B5B15	1.5	15	37.50%		
B7B17	2.1	21	12.50%		
B9B19	1.9	19	20.83%		













C2B23	1.4	14	41.67%		
C3B24	1.2	12	50.00%		
C4B25	2.1	21	12.50%		
C5B27	2.3	23	4.17%		
C6B28	1.6	16	33.33%		
C7B29	2.8	28	-16.67%		

C8B31	2.1	21	12.50%		
C9B32	2.2	22	8.33%		
C10B33	2.3	23	4.17%		
D3B39	2.7	27	-12.50%		
D4B46	1.9	19	20.83%		
D5B47	2.5	25	-4.17%		

D6B52	2.7	27	-12.50%		
D7B53	2.2	22	8.33%		
D8B54	2.3	23	4.17%		
D9B56 ขาว	1.6	16	33.33%		
D9B56Y	1.3	13	45.83%		
D10B57	2.6	26	-8.33%		

E1B58	2.4	24	0.00%		
E3B61	2.5	25	-4.17%		
E4B62	3	30	-25.00%		
E7B71	2.1	21	12.50%		
E8B74	2.5	25	-4.17%		
E10B77	1.4	14	41.67%		





F1B79	2.7	27	-12.50%		
F3B84	2.3	23	4.17%		
F4B90	2.7	27	-12.50%		
F5B91	1.2	12	50.00%		
F7B93	2	20	16.67%		
F8B94	2.6	26	-8.33%		







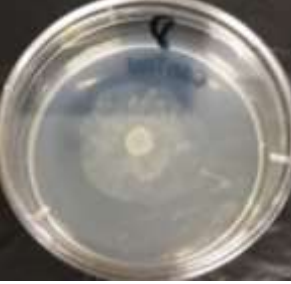


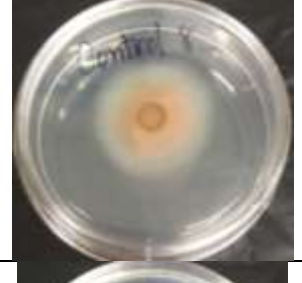


F10B99	2.1	21	12.50%		
G1B100	1.5	15	37.50%		
G2B101	1.7	17	29.17%		
G3B103	2.5	25	-4.17%		
G4B104	2.2	22	8.33%		
G5B105	1.5	15	37.50%		













					
G6B106	1.3	13	45.83%		













จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *A. furcatum* ได้ 30 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B2NB12, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B1B11, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของรา ของชุดทดลองและชุดควบคุม













ตารางที่ 4.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย 87 ไอโซเลต ในการยับยั้ง *P. pulvimora* ด้วยวิธี dual culture assay













เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง		% การยับยั้ง	ภาพผลการทดลอง	
	(cm)	mm.		ด้านบน	ด้านล่าง
ควบคุม 1	3.3	33			
ควบคุม 2	3.2	32			








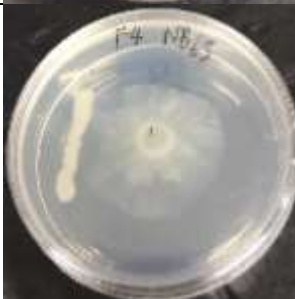




ควบคุม 3	3.2	32		
ควบคุม 4	2.4	24		
ควบคุม 5	2.7	27		
ควบคุม 6	3.1	31		
ควบคุม 7	2.7	27		
ควบคุม 8	3.1	31		













ควบคุม 9	2.7	27			
เฉลี่ย	2.9	29			
A1NB1	4.6	46	-58.62%		
A2NB2	3	30	-3.45%		
A4NB4	2.3	23	20.69%		
A5NB5	4.4	44	-51.72%		
A9NB9	4.6	46	-58.62%		













A10NB10	4.4	44	-51.72%		
B1NB11	2.2	22	24.14%		
B2NB12	3.2	32	-10.34%		
B3NB13	4.7	47	-62.07%		
B5NB15	3.1	31	-6.90%		
B8NB18	4.3	43	-48.28%		













B10NB20	3.7	37	-27.59%		
C1NB21	4.4	44	-51.72%		
C3NB23	4.4	44	-51.72%		
C4NB24	4.5	45	-55.17%		
C5NB25	3.5	35	-20.69%		
C6NB26	4.6	46	-58.62%		













D3NB33	4.2	42	-44.83%		
D5NB35	3.7	37	-27.59%		
D6NB36	2.7	27	6.90%		
D8NB38	4.5	45	-55.17%		
E7NB50	4.2	42	-44.83%		
E9NB53	4.7	47	-62.07%		













E10NB55	4.8	48	-65.52%		
F1NB59 ส้ม	2.8	28	3.45%		
F3NB62	4.3	43	-48.28%		
F4NB63	2.8	28	3.45%		
F6NB65	4.7	47	-62.07%		
F8NB68	3.7	37	-27.59%		













F9NB69	4.2	42	-44.83%		
F10NB72	4.6	46	-58.62%		
G1NB73	4.2	42	-44.83%		
G3NB76	4.1	41	-41.38%		
G5NB80	4.6	46	-58.62%		
G6NB81	4.6	46	-58.62%		













G7NB83	4.7	47	-62.07%		
G10NB87	2.8	28	3.45%		
H1NB88	2.8	28	3.45%		
H3NB96	4.7	47	-62.07%		
H5NB102	4.4	44	-51.72%		
A2B2	2.3	23	20.69%		













A4B4	2.5	25	13.79%		
A5B5	2.1	21	27.59%		
A7B7	2.6	26	10.34%		
A10B10	2.7	27	6.90%		
B1B11	3.2	32	-10.34%		
B4B14	3.4	34	-17.24%		













B5B15	2.2	22	24.14%		
B7B17	3.2	32	-10.34%		
B9B19	3.4	34	-17.24%		
C2B23	2.9	29	0.00%		
C3B24	3.3	33	-13.79%		
C4B25	2.2	22	24.14%		









C5B27	2.5	25	13.79%		
C6B28	3.2	32	-10.34%		
C7B29	4	40	-37.93%		
C8B31	4.5	45	-55.17%		
C9B32	4.2	42	-44.83%		
C10B33	4.6	46	-58.62%		

D3B39	4.6	46	-58.62%		
D4B46	3.4	34	-17.24%		
D5B47	4.8	48	-65.52%		
D6B52	4.6	46	-58.62%		
D7B53	4.6	46	-58.62%		
D8B54	4.3	43	-48.28%		

D9B56 ขาว	3.4	34	-17.24%		
D9B56 Y	1.9	19	34.48%		
D10B57	4.4	44	-51.72%		
E1B58	4.8	48	-65.52%		
E3B61	4.5	45	-55.17%		
E4B62	4.6	46	-58.62%		

E7B71	1.9	19	34.48%		
E8B74	4.8	48	-65.52%		
E10B77	2	20	31.03%		
F1B79	4.7	47	-62.07%		
F3B84	4.3	43	-48.28%		
F4B90	4.7	47	-62.07%		

F5B91	3.8	38	-31.03%		
F7B93	3.2	32	-10.34%		
F8B94	4.8	48	-65.52%		
F10B99	3.6	36	-24.14%		
G1B100	2.2	22	24.14%		
G2B101	2	20	31.03%		

G3B103	2.4	24	17.24%		
G4B104	3.1	31	-6.90%		
G5B105	3	30	-3.45%		
G6B106	2.7	27	6.90%		

จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *P. pulviforma* ได้ 37 ไอโซเลต ได้แก่ A4NB4, B1NB11, B2NB12, B5NB15, C5NB25, D5NB35, E7NB50, F8NB68, A2B2, A4B4, A5B5, A7B7, A10B10, B4B14, B4B14, B5B15, B7B17, B9B19, C2B23, C3B24, C4B25, C5B27, C6B28, D4B46, D9B56 ชาว, D9B56Y, E7B71, E10B77, F5B91, F7B93, F10B99, G1B100, G2B101, G3B103, G4B104, G5B105 และ G6B106 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราของชุดทดลองและชุดควบคุม

ผลการทดลองโดยรวมพบว่าแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งราทั้ง 7 ชนิดได้ โดยผลการทดลองของแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตนี้ สรุปลไว้ในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การยับยั้งราทั้ง 7 ชนิดได้สูงที่สุดโดยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต

ลำดับ	แบคทีเรีย	% การยับยั้ง						
		<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>A. furcatum</i>	<i>P. pulviforma</i>
1	D9B56Y	27.03%	22.87%	27.91%	45.83%	34.48%	12.54%	37.93%
2	E7B71	10.81%	20.11%	20.93%	12.50%	34.48%	27.11%	48.28%
3	E10B77	24.32%	9.09%	25.58%	41.67%	31.03%	24.20%	31.03%
4	G2B101	24.32%	22.87%	25.58%	29.17%	31.03%	21.28%	48.28%
5	A5B5	16.22%	20.11%	20.93%	16.67%	27.59%	15.45%	20.69%
6	B5B15	35.14%	20.11%	27.91%	37.50%	24.14%	12.54%	31.03%
7	C4B25	18.92%	39.39%	23.26%	12.50%	24.14%	21.28%	31.03%
8	G1B100	13.51%	22.87%	23.26%	37.50%	24.14%	18.37%	48.28%
9	A2B2	21.62%	14.60%	20.93%	8.33%	20.69%	9.62%	55.17%
10	A4NB4	18.92%	28.37%	23.26%	33.33%	20.69%	12.54%	41.38%
11	A4B4	21.62%	14.60%	25.58%	25.00%	13.79%	18.37%	34.48%
12	C5B27	18.92%	22.87%	25.58%	4.17%	13.79%	27.11%	41.38%
13	A7B7	18.92%	22.87%	25.58%	20.83%	10.34%	21.28%	48.28%
14	G6B106	35.14%	17.36%	30.23%	45.83%	6.90%	15.45%	37.93%
15	A10B10	27.03%	11.85%	18.60%	33.33%	6.90%	15.45%	58.62%

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทั้ง 7 ชนิดพบว่าแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งราได้ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ A4NB4, A2B2, A4B4 และ A5B5 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นมะนาว, A7B7 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นหม่อน, A10B10 จากดินบริเวณต้นมะขามเทศ, B5B15 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นมะม่วง, C4B25 และ C5B27 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นกล้วย, D9B56Y ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นตีนเป็ด, E7B71 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นมะขามหวาน, E10B77 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นมะม่วงหาว มะนาวโห่, G1B100, G2B101 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นสัก และ G6B106 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นผักกาดหอม จึงคัดเลือกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืชที่ตีดีที่สุด และหลากหลายมากที่สุด เพื่อนำไประบุเอกลักษณ์ ก่อนการนำไปใช้ทางการป้องกันโรคพืชทางชีวภาพต่อไป แบคทีเรียสองไอโซเลตดังกล่าว ได้แก่ D9B56Y ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นตีนเป็ด ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* และ *F. moniliforme* ได้ดีที่สุด ที่ 45.83% และ 34.48%

ตามลำดับ และ G6B106 ที่แยกได้จากดินบริเวณต้นผักกาดหอม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้ดีที่สุดในที่ 35.14%, 30.23% และ 45.83% ตามลำดับ

4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

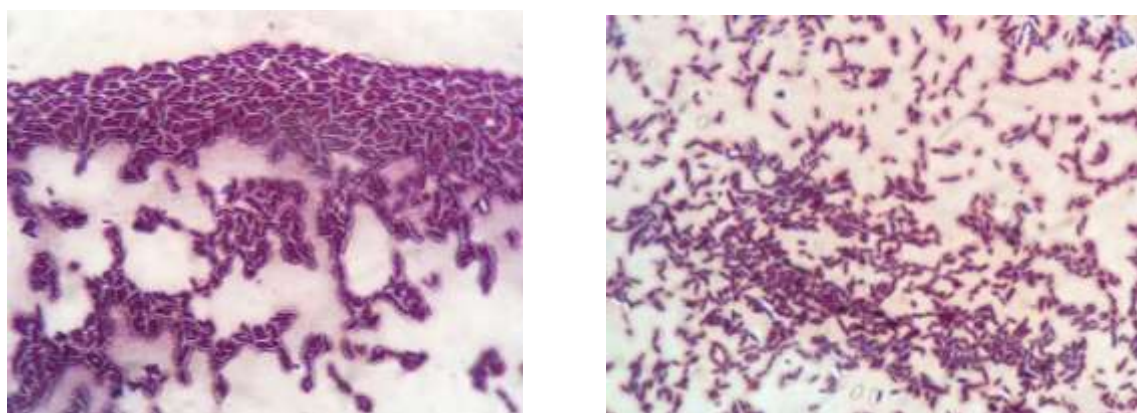
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ D9B56Y และ G6B106

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีพบว่า โคโลนีของ D9B56 เหลือง มีสีขาวขุ่น ลักษณะด้าน ขอบไม่เรียบ และโคโลนีของ G6B106 มีสีขาวขุ่นแต่บริเวณขอบค่อนข้างใส ลักษณะด้าน ขอบไม่เรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



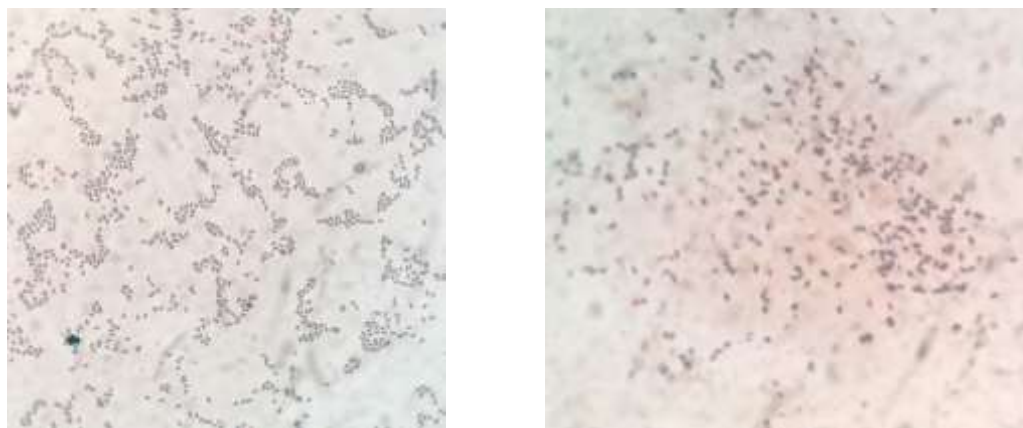
รูปที่ 4.1 ลักษณะของโคโลนีของไอโซเลต D9B56 (ซ้าย) และ G6B106 (ขวา)
บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB

ผลของการย้อมแกรม พบว่าทั้ง D9B56Y และ G6B106 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต รูปร่างทรงกระบอกหรือรูปท่อน (rod) ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะของไอโซเลต D9B56Y (ซ้าย) และ G6B106 (ขวา) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(1,000X)

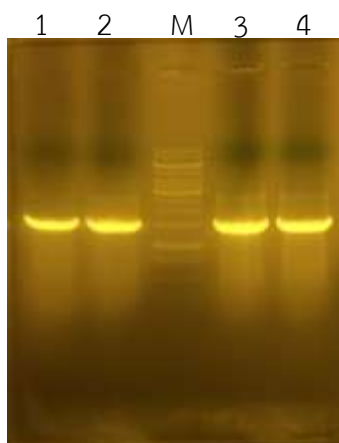
ผลของการย้อมสปอร์พบว่า ทั้ง D9B56Y และ G6B106 มีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ โดยตำแหน่งของสปอร์อยู่ที่บริเวณกลางของเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะเอนโดสปอร์ของไอโซเลต D9B56Y (ชาย) และ G6B106(ขวา)

4.2.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของ D9B56Y และ G6B106

จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ 16s rDNA ของ D9B56Y และ G6B106 ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 27F และ 1492R แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการทำ agarose gel electrophoresis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งจากรูปพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส



รูปที่ 4.4 อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากไอโซเลต D9B56Y และ G6B106

ช่องที่ 1 และ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากไอโซเลต D9B56Y

ช่อง M 1 Kb DNA ladder

ช่องที่ 3 และ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากไอโซเลต G6B106



หลังจากทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้แล้ว ส่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าสู่โปรแกรม BioEdit เพื่อ merge ให้ได้เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์ ดังแสดงในภาคผนวก ค.1 และค.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยนำไปเข้าอัลกอริธึม blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต D9B56Y มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* MS622 (KY780539.1) 100.00% และไอโซเลต G6B106 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* FS1092 (CP038028.1) 99.93% ดังแสดงในภาคผนวก ค.3 และ ค.4















4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย














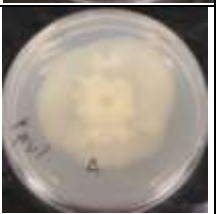
การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งราสาเหตุของโรคพืช 7 ชนิด ปฏิบัติโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่กรองผ่าน milipore filter 0.45 μ l มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด PDA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด V8 ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55°C โดยใช้อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 1:1 เมื่อเทเพลทและรอจนอาหารแข็งแล้ว วางชิ้นส่วนของราที่ตัดด้วย cork borer ลงตรงกลางเพลทที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย






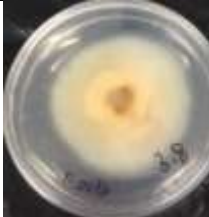



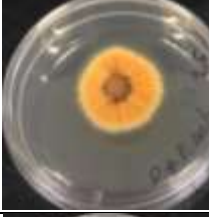




จากการทดสอบโดยใช้เทคนิคนี้ซึ่งเทียบกับชุดควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 0% พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งราทั้ง 7 ชนิดได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 4.10





ตารางที่ 4.10 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด

ชนิดของรา	การเจริญของรา(mm.)				%การยับยั้ง	ภาพการเจริญของรา	
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย		ด้านหน้า	ด้านหลัง
<i>C. gloeosporioides</i>							
ชุดควบคุม 1	36	39	37		-		

ชุดควบคุม 2	37	40	38	37.8	-		
น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	25	25	14	21.3	43.56%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	27	26	26	26.3	30.34%		
<i>F. proliferatum</i>							
ชุดควบคุม	38	35	35	36	-		
น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	28	25	30	27.6	23.15%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	36	33	34	34.3	4.63%		
<i>F. moniliforme</i>							
ชุดควบคุม	35	35	38	36	-		

น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	29	28	30	29	19.44%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	24	23	25	24	33.33%		
<i>A. furcatum</i>							
ชุดควบคุม	30	32	31	31	-		
น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	16	14	15	14	54.84%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	15	15	15	15	51.61%		
<i>P. pulvimora</i>							
ชุดควบคุม1	44	46	47	43.8	-		
ชุดควบคุม2	43	43	40		-		

น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	22	20	23	21.67	50.57%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	27	25	24	25.3	42.21%		
<i>F. solani</i>							
ชุดควบคุม1	39	36	38	36.2	-		
ชุดควบคุม2	36	33	35				
น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	26	26	25	25.6	29.03%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	20	23	21	21.3	41.01%		
<i>P. oryzae</i>							
ชุดควบคุม	31	30	32	31	-		

น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	11	11	11	11	64.52%		
น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106	-	-	-	-	100.00%		

ทั้งนี้สามารถสรุปประสิทธิภาพการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตได้ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.11 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต D9B56Y และ G6B106 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด

ชนิดของรา	%การยับยั้ง	
	น้ำเลี้ยงเชื้อ D9B56Y	น้ำเลี้ยงเชื้อ G6B106
<i>C. gloeosporioides</i>	43.56%	30.34%
<i>F. proliferatum</i>	23.15%	4.63%
<i>F. moniliforme</i>	19.44%	33.33%
<i>A. furcatum</i>	54.84%	51.61%
<i>P. pulvimora</i>	50.57%	42.21%
<i>F. solani</i>	29.03%	41.01%
<i>P. oryzae</i>	64.52%	100.00%

จากตารางที่ 4.11 จะเห็นว่าทั้ง D9B56Y และ G6B106 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ได้ดีที่สุด ที่ 64.52% และ 100.00%

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แยกแบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการยับยั้งราโรคที่ก่อโรคในพืช พิสูจน์เอกลักษณ์ และทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียดังกล่าว

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรากพืช 13 แหล่ง ได้แก่ ต้นมะนาว ต้นหม่อน ต้นองุ่น ต้นมะขามเทศ ต้นมะม่วง ต้นกล้วย ต้นลิ้นจี่ ต้นตีนเป็ด ต้นมะขามหวาน ต้นขนุน ต้นสัก ต้นมะม่วงหาว มะนาวโห่ และต้นผักกาดหอม พบแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 131 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่เจริญเร็ว 66 ไอโซเลต และกลุ่มที่เจริญปกติ 75 ไอโซเลต

จากการทดสอบการยับยั้งราโรคพืช โดยใช้วิธี dual culture assay และใช้ราโรคพืช 7 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *P. oryzae*, *F. moniliforme*, *A. furcatum*, และ *P. pulvimora* พบว่ามี 15 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราโรคพืชทั้ง 7 ชนิดได้ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ได้แก่ D9B56, E7B71, E10B77, G2B101, A5B5, B5B15, C4B25, G1B100, A2B2, A4NB4, A4B4, C5B27, A7B7, G6B106 และ A10B10 จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ได้แก่ D9B56 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* และ *F. moniliforme* ได้ดีที่สุด และ G6B106 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้ดีที่สุด เพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ก่อนการนำไปศึกษาด้านการควบคุมทางชีวภาพเพิ่มเติมต่อไป

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยการสกัด DNA และเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต D9B56Y มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* MS622 (KY780539.1) 100.00% และแบคทีเรีย G6B106 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* FS1092 (CP038028.1) 99.93% ดังนั้นในเบื้องต้นสามารถระบุสกุลของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตได้ว่าอยู่ในสกุล *Bacillus* แต่การระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้โดยใช้เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จะไม่สามารถปฏิบัติได้เนื่องจาก *Bacillus* กลุ่มนี้ ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้นนั้น มีความใกล้เคียงของลำดับในบริเวณนี้สูงมาก (Fan และคณะ 2017; Fritze, 2004) ในการระบุ

ปีซีสี่ให้แน่ชัดสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับ housekeeping gene หลาย ๆ ยีน เช่น *gyrA*, *pycA*, *mdh*, *mbi*, และ *mutS* เป็นต้น (Ko และคณะ 2004)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งราสาเหตุของโรคพืช 7 ชนิดพบว่าทั้ง D9B56Y และ G6B106 สามารถยับยั้งราสาเหตุของโรคพืชได้ทั้ง 7 ชนิดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกัน โดยทั้ง D9B56Y และ G6B106 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae* ได้ดีที่สุด ที่ 64.52% และ 100.00% ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งสาเหตุของโรคพืชทั้ง 7 ชนิดของ E10B77 จากผลการทดลองของ นางสาวธีรนาฏ ธนาพงศ์ภัค พบว่าสามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน

จากประสิทธิภาพการยับยั้งราโรคพืชทั้ง 7 ชนิดของ *Bacillus* sp. D9B56Y และ G6B106 และประสิทธิภาพการยับยั้งราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย แสดงแนวโน้มที่เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชได้ สำหรับงานวิจัยที่สามารถศึกษาเพิ่มเติมได้แก่ ศึกษาชนิดของสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเพื่อยับยั้งรา, ศึกษาอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา, ศึกษากลไกการยับยั้งราก่อโรค, และศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคในภาคสนาม เป็นต้น การนำแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชในทางการเกษตรมีการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับภาคสนาม โดยมีจุดมุ่งหมายเดียวกันคือ เพื่อลดการเกิดโรคในพืช และลดการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ (Khan และคณะ 2018; Li และคณะ 2016; Rajaofera และคณะ 2018)

เอกสารอ้างอิง

- Abbas, H.K., Shier, W.T., Plasencia, J., Weaver, M.A., Bellaloui, N., Kotowicz, J.K., Butler, A.M., Accinelli, C., de la Torre-Hernandez, M.E., Zablotowicz, R.M. 2017. Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. Food Control, **71**, 57-63.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Proctor, R.H. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. Fungal Genetics and Biology, **48**(5), 485-495.
- Almeida, F., Rodrigues, M.L., Coelho, C. 2019. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. Frontiers in Microbiology, **10**(214).
- Bjelić, D., Ignjatov, M., Marinković, J., Milošević, D., Nikolic, Z., Gvozdanić-Varga, J., Karaman, M. 2018. *Bacillus* isolates as potential biocontrol agents of *Fusarium* clove rot of garlic. Zemdirbyste-Agriculture, **105**(369–376).
- Borowiecki, P., Winska, P., Bretner, M., Gizinska, M., Koronkiewicz, M., Staniszevska, M. 2018. Synthesis of novel proxyphylline derivatives with dual anti-*Candida albicans* and anticancer activity. European Journal of Medicinal Chemistry, **150**, 307-333.
- Chen, Y., Wu, X., Li, C., Zeng, Y., Tan, X., Zhang, D., Liu, Y. 2018. MoPer1 is required for growth, conidiogenesis, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. Rice, **11**(1), 64.
- Czajkowski, R., Ozymko, Z., Lojkowska, E. 2016. Application of zinc chloride precipitation method for rapid isolation and concentration of infectious *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. lytic bacteriophages from surface water and plant and soil extracts. Folia Microbiologica, **61**(1), 29-33.
- DEAN, R., VAN KAN, J.A.L., PRETORIUS, Z.A., HAMMOND-KOSACK, K.E., DI PIETRO, A., SPANU, P.D., RUDD, J.J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J., FOSTER, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, **13**(4), 414-430.
- Dracatos, P.M., Haghdoost, R., Singh, D., Park, R.F. 2018. Exploring and exploiting the boundaries of host specificity using the cereal rust and mildew models. New Phytologist, **218**(2), 453-462.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., Borriss, R. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group B.

- amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. Frontiers in microbiology, **8**, 22-22.
- Fernandez, J., Wilson, R.A. 2014. Cells in cells: morphogenetic and metabolic strategies conditioning rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Protoplasma, **251**(1), 37-47.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, **94**(11), 1245-8.
- Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., Guan, W. 2018. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. Frontiers in Microbiology, **9**, 456. doi: 10.3389/fmicb.2018.00456.
- Gao, W., Tian, L., Zhou, J., Shi, Z., Zheng, L., Cui, Z., Li, Y. 2009. Antifungal mechanism of *Bacillus marinus* B-9987. Wei Sheng Wu Xue Bao, **49**(11), 1494-1501.
- Gao, Z., Zeng, D., Cheng, F., Tian, Z., Guo, L., Su, Y., Yan, M., Jiang, H., Dong, G., Huang, Y., Han, B., Li, J., Qian, Q. 2011. ALK, the Key Gene for Gelatinization Temperature, is a Modifier Gene for Gel Consistency in RiceF. Journal of Integrative Plant Biology, **53**(9), 756-765.
- González Pereyra, M.L., Martínez, M.P., Petroselli, G., Erra Balsells, R., Cavaglieri, L.R. 2018. Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* strains with potential application in agriculture. Food Control, **85**, 392-399.
- Hernandez, H., Martinez, L.R. 2018. Relationship of environmental disturbances and the infectious potential of fungi. Microbiology, **164**(3), 233-241.
- Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A.M., Diaz Valerio, S.M., Poehlein, A., Brzuszkiewicz, E.B., Neseemann, K., Braus-Stromeyer, S.A., Braus, G.H., Daniel, R., Liesegang, H. 2016. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. Frontiers in Microbiology, **7**, 2171. doi: 10.3389/fmicb.2016.02171.
- Irinyi, L., Kövics, G.J., Sándor, E. 2009. Taxonomical re-evaluation of Phoma-like soybean pathogenic fungi. Mycological Research, **113**(2), 249-260.

- Khalaf, E.M., Raizada, M.N. 2018. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. Frontiers in Microbiology, **9**, 42. doi: 10.3389/fmicb.2018.00042.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D., Hirsch, A.M. 2018. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. Frontiers in Microbiology, **9**(2363).
- Khan, N., Maymon, M., Hirsch, A.M. 2017. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. Microorganisms, **5**(4). doi: 10.3390/microorganisms5040075.
- Kharazian, Z.A., Salehi Jouzani, G., Aghdasi, M., Khorvash, M., Zamani, M., Mohammadzadeh, H. 2017. Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. Biological Control, **110**, 33-43.
- Ko, K.S., Kim, J.-W., Kim, J.-M., Kim, W., Chung, S.-i., Kim, I.J., Kook, Y.-H. 2004. Population Structure of the *Bacillus cereus* Group as Determined by Sequence Analysis of Six Housekeeping Genes and the *plcR* Gene. Infection and Immunity, **72**(9), 5253-5261.
- Lazzarini, C., Haranahalli, K., Rieger, R., Ananthula, H.K., Desai, P.B., Ashbaugh, A., Linke, M.J., Cushion, M.T., Ruzsicska, B., Haley, J., Ojima, I., Del Poeta, M. 2018. Acylhydrazones as antifungal agents targeting the synthesis of fungal sphingolipids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. doi: 10.1128/AAC.00156-18.
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., Kim, J.C. 2017. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. Plant Pathology Journal, **33**(5), 499-507.
- Li, J., Yang, X.-w., Li, Y.-c., Niu, J.-s., He, D.-x. 2017. Proteomic analysis of developing wheat grains infected by powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). Journal of Plant Physiology, **215**, 140-153.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X. 2016. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. PLoS one, **11**(9), e0162125-e0162125.

- Li, Y., Li, Z., Liu, H., Noblet, J., Liu, L., Li, D., Wang, F., Lai, C. 2018. Net energy content of rice bran, corn germ meal, corn gluten feed, peanut meal, and sunflower meal in growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*, **31**(9), 1481-1490.
- Londo, J.P., Chiang, Y.-C., Hung, K.-H., Chiang, T.-Y., 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*, **103**(25), 9578-9583.
- Mohamad, O.A.A., Li, L., Ma, J.B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J.W., Rasulov, B.A., Liu, Y.H., Hedlund, B.P., Li, W.J. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology*, **9**. doi: 10.3389/fmicb.2018.00924.
- Mohammed, B.L., hussein, R.A., Toama, F.N. 2019. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. *Energy Procedia*, **157**, 171-179.
- Morrison, C.K., Arseneault, T., Novinscak, A., Filion, M. 2017. Phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 alters *Phytophthora infestans* growth and late blight development. *Phytopathology*, **107**(3), 273-279.
- Nath, C.P., Hazra, K.K., Kumar, N., Praharaj, C.S., Singh, S.S., Singh, U., Singh, N.P. 2019. Including grain legume in rice-wheat cropping system improves soil organic carbon pools over time. *Ecological Engineering*, **129**, 144-153.
- Pacilly, F.C.A., Hofstede, G.J., Lammerts van Bueren, E.T., Kessel, G.J.T., Groot, J.C.J. 2018. Simulating crop-disease interactions in agricultural landscapes to analyse the effectiveness of host resistance in disease control: The case of potato late blight. *Ecological Modelling*, **378**, 1-12.
- Qi, Z., Yu, J., Shen, L., Yu, Z., Yu, M., Du, Y., Zhang, R., Song, T., Yin, X., Zhou, Y., Li, H., Wei, Q., Liu, Y. 2017. Enhanced resistance to rice blast and sheath blight in rice (*Oryza sativa* L.) by expressing the oxalate decarboxylase protein Bacisubin from *Bacillus subtilis*. *Plant Science*, **265**, 51-60.
- Rajaofera, M.J.N., Jin, P.F., Fan, Y.M., Sun, Q.Q., Huang, W.K., Wang, W.B., Shen, H.Y., Zhang, S., Lin, C.H., Liu, W.B., Zheng, F.C., Miao, W.G. 2018. Antifungal activity of

- the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **147**, 153-161.
- Rochi, L., Diéguez, M.J., Burguener, G., Darino, M.A., Pergolesi, M.F., Ingala, L.R., Cuyeu, A.R., Turjanski, A., Kreff, E.D., Sacco, F. 2018. Characterization and comparative analysis of the genome of *Puccinia sorghi* Schwein, the causal agent of maize common rust. *Fungal Genetics and Biology*, **112**, 31-39.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M.d.C., Macías-Rodríguez, L., Santoyo, G. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **13**, 46-52.
- Snetselaar, K., McCann, M. 2017. *Ustilago maydis*, the corn smut fungus, has an unusual diploid mitotic stage. *Mycologia*, **109**(1), 140-152.
- Song, S., Wei, J., Chen, Z., Lei, Y., Zhang, Y., Deng, C., Tan, H., Li, X. 2018. Determination of propineb and its metabolites propylenethiourea and propylenediamine in banana and soil using gas chromatography with flame photometric detection and LC-MS/MS analysis. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **53**(3), 153-160.
- Stuart, A.K.d.C., Stuart, R.M., Pimentel, I.C. 2018. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merril). *Agriculture and Natural Resources*, **52**(4), 388-392.
- Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, **182**, 31-39.
- Xu, J., Krietemeyer, E.F., Boddu, V.M., Liu, S.X., Liu, W.-C. 2018. Production and characterization of cellulose nanofibril (CNF) from agricultural waste corn stover. *Carbohydrate Polymers*, **192**, 202-207.
- Yildizhan, H. 2017. Thermodynamics analysis for a new approach to agricultural practices: Case of potato production. *Journal of Cleaner Production*, **166**, 660-667.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Luria-Bertani (LB)

Tryptone	10.0 กรัม
Yeast Extract	5.0 กรัม
Sodium Chloride	10.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Luria-Bertani (LB)

Potato Dextrose	24.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง V8

Tryptone	10.0 มิลลิลิตร
Agar	3.0 กรัม
Deionized Water	190 มิลลิลิตร

จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Luria-Bertani (LB)

Tryptone	10.0 กรัม
Yeast Extract	5.0 กรัม
Sodium Chloride	10.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. agarose gel 0.8%

ผง agarose gel	0.8 กรัม
1X TAE buffer	100 มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสเจลใน 1X TAE buffer ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงใน tray ที่ใส่ comb ไว้แล้ว ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว

2. 1X TAE Buffer

Trizma base	121 กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55 กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ จนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตาม

1 Kb DNA ladder	3 ไมโครลิตร
6X Loading dye	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุ	2 ไมโครลิตร
ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน	

4. 6X Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
Sucrose	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

1. ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม BioEdit เพื่อ merge ให้ได้เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ D9B56Y

Alignment: C:\Users\thanakit\Desktop\seq_B_D9B56\D9B56.gb

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
3501633_B_ ACGGGNGTTN NGACNCGGCC CAAATTTCTT TGGGAAGNNA CCNNAGGGAA
3501634_B_ NNNNNNNNNG NNGCTATACA TGCAGTCGAG CGGACAGATG GGAGCTTGCT
3501633_B_ GCAGTCGAGC GGACAGATGG GAGCTTGCTC CCTGATGTTA GCGGCGGACG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
3501633_B_ TTTTCCGCAA TGGACGAATT CGGCGGAGCC ACCCCGNNT GAATGATAAA
3501634_B_ CCCTGATGTT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGTA ACCTGCCTGT
3501633_B_ GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTGTA AGACTGGGAT AACTCCGGGA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
3501633_B_ GGTTTTCGGA TCGTAAAGCN NTGTTGTTAG GGAAGAACAA GTGCCGTTCA
3501634_B_ AAGACTGGGA TAAC TCCGGG AAACCGGGC TAATACCGGA TGGTTGTTTG
3501633_B_ AACC GGGGCT AATACCGGAT GGTGTTTGA ACCGCATGGT TCAGACATAA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
3501633_B_ AATAGGGCGG CACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC
3501634_B_ AACC GCATGG TTCAGACATA AAAGGTGGCT TCGGCTACCA CTTACAGATG
3501633_B_ AAGGTGGCTT CGGCTACCAC TTACAGATGG ACCCGCGGCG CATTAGCTAG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
3501633_B_ GTGCCAGCAG CCGCGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGAATTAT
3501634_B_ GACCCGCGGC GCATTAGCTA GTTGGTGAGG TAACGGCTCA CCAAGGCGAC
3501633_B_ TTGGTGAGGT AACGCTCAC CAAGGCGACG ATGCGTAGCC GACCTGAGAG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
3501633_B_ TGGGCGTAAA GGGCTCGCAG GCGGTTTCTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCC
3501634_B_ GATGCGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG CCACACTGGG ACTGAGACAC
3501633_B_ GGTGATCGGC CACTTGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                310        320        330        340        350
3501633_B_ CGGCTCAACC GGGGAGGGTC ATTGAAACT GGGGAACTTG AGTGCAGAAG
3501634_B_ GGCCGAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGACG
3501633_B_ CAGCAGTAGG GAATCTCCG CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                360        370        380        390        400
3501633_B_ AGGAGAGTGG AATTCACGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATGTGGAGG
3501634_B_ AAAGTCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTTT TCGGATCGTA
3501633_B_ GCGTGAGTGA TGAAGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA

```



```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      410      420      430      440      450
3501633_B_ AACACCAGTG GCGAAGGCGA CTCTCTGGTC TGTAAGTAC GCTGAGGAGC
3501634_B_ AAGCTCTGTT GTTAGGGAAG AACAAAGTGCC GTTCAAATAG GCGGCACCT
3501633_B_ ACAAGTGCCG TTCAAATAGG GCGGCACCTT GACGGTACCT AACCAGAAAG

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      460      470      480      490      500
3501633_B_ GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA
3501634_B_ TGACGGTACC TAACCAGAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG
3501633_B_ CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      510      520      530      540      550
3501633_B_ AACGATGAGT GCTAAGTGTT AGGGGGTTTC CGCCCTTAG TGCTGCAGCT
3501634_B_ GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGGGCT
3501633_B_ TTGTCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGGGCTC GCAGCCGGTT TCTTAAGTCT

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      560      570      580      590      600
3501633_B_ AACGCATTAA GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GGTCGCAAGA CTGAAACTCA
3501634_B_ CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC TGATGTGAAA GCCCCCGGCT CAACCGGGGA
3501633_B_ GATGTGAAAG CCCCAGGCTC AACCGGGGAG GGTCATTGGA AACTGGGGAA

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      610      620      630      640      650
3501633_B_ AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTTCG
3501634_B_ GGGTCATTGG AACTGGGGGA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAATTC
3501633_B_ CTTGAGTGCA GAAGAGGAGA GTGGAATTCC ACGTGTAGCG GTGAAATGCG

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      660      670      680      690      700
3501633_B_ AAGCAACGCG AAGAACCCTTA CCAGGTCTTG ACATCCTCTG ACAATCCTAG
3501634_B_ CACGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA
3501633_B_ TAGAGATGTG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTCTCT GGTCTGTAAC

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      710      720      730      740      750
3501633_B_ AGATAGGACG TCCCCTTCGG GGCAGAGTG ACAGGTGGTG CATGTTGTC
3501634_B_ GGCGACTCTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA GGAGCGAAAAG CGTGGGGAGC
3501633_B_ TGACGCTGAG GAGCGAAAAGC GTGGGGAGCG AACAGGATTA GATACCCTGG

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      760      770      780      790      800
3501633_B_ GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA GTCCGCAAC GAGCGCAACC
3501634_B_ GAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA
3501633_B_ TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAGTGCTAAG TGTTAGGGGG TTTCGCCCC

```

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      810      820      830      840      850
3501633_B_ CTTGATCTTA GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG
3501634_B_ GTGTTAGGGG GTTTCGCCCC CTTAGTGCTG CAGCTAACGC ATTAAGCACT
3501633_B_ TTAGTGCTGC AGCTAACGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGGTCCG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      860      870      880      890      900
3501633_B_ TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT
3501634_B_ CCGCCTGGGG AGTACGGTCG CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
3501633_B_ AAGACTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      910      920      930      940      950
3501633_B_ GACCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGAC AGAACAAAGG GCAGCGAAAC
3501634_B_ GCCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGAAGAA
3501633_B_ TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      960      970      980      990     1000
3501633_B_ CGCGAGGTTA AGCCAATCCC ACAAATCTGT TCTCAGTTCG GATCGCAGTC
3501634_B_ CCTTACCAGG TCTTGACATC CTCTGACAAT CCTAGAGATA GGACGTCCCC
3501633_B_ TCTGACAATC CTAGAGATAG GACGTCCCCT TCGGGGGCAG AGTGACAGGT

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1010     1020     1030     1040     1050
3501633_B_ TGCAACTCGA CTGCGTGAAG CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT
3501634_B_ TTCGGGGGCA GAGNGACAGC TGGTGCATGG TTGTCGTCAG CTCCTGTCCT
3501633_B_ GGTGCATGGT TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1060     1070     1080     1090     1100
3501633_B_ GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAC
3501634_B_ GAAATGTTGG GTAAGTCCCG CAACGAGCNC AACCCCTGAT CTTAGTTGCC
3501633_B_ CAACGAGCGC AACCCCTGAT CTTAGTTGCC AGCATTCAGT TGGGCACTCT

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1110     1120     1130     1140     1150
3501633_B_ GAGAGTTTGT AACACCCGAA GTCGGTGAGG TAACCTTTAT GGAGCCAGCC
3501634_B_ NNATTCNATT GGGCNNTCCA AGGGGACNGC CGGTGNCAAC CCGNGGAAGG
3501633_B_ AAGGTGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1160     1170     1180     1190     1200
3501633_B_ GCCGAAGGTG NNNGANNNNN N.....
3501634_B_ GGGGAAGACG TCAAANNCCA TGCCCCTTNA NCCGGG....
3501633_B_ ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACAGAACA

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1210     1220     1230     1240     1250
3501633_B_ .....
3501634_B_ .....
3501633_B_ AAGGGCAGCG AAACCGCGAG GTTAAGCCAA TCCACAAAT CTGTTCTCAG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1260     1270     1280     1290     1300
3501633_B_ .....
3501634_B_ .....
3501633_B_ TTCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGCTGGAA TCGTAGTAA

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1310     1320     1330     1340     1350
3501633_B_ .....
3501634_B_ .....
3501633_B_ TCGCGGATCA GCATGCCGCG GTGAATACGT TCCGGGCCT TGTACACACC

```

```

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1360      1370      1380      1390      1400
3501633_B_ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3501634_B_ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3501633_B_ GCCCGTCACA CCACGAGAGT TTGTAACACC CGAAGTCGGT GAGGTAACCT

      ....|.....| ..
      1410
3501633_B_ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3501634_B_ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3501633_B_ TTATGGAGCC AG

```

2. ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม BioEdit เพื่อ merge ให้ได้เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ G6B106

Alignment: C:\Users\thanakit\Desktop\seq_B_D9B56\G6B106.gb

```

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
3501636_B_ NNNCNNNNNN NNNNNCTATA CATGCAAGTC GAGCGGACAG ATGGGAGCTT
3501635_B_ CCCCCCCCCC CCCCCCCCCT CCTTTANNTT NNGGGGGGGG GGGAAAACGG
3501635_B_ GCAAGTCGAG CGGACAGATG GGAGCTTGCT CCCTGATGTT AGCGCGGGAC

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90      100
3501636_B_ GCTCCCTGAT GTTAGCGGGC GACGGGTGAG TAACACGTGG GTAACCTGCC
3501635_B_ GGGGTTTNNNA TCAAATGGGG GGAAAAANGG GGTTTTCCCT TTTTGGGGG
3501635_B_ GGGTGAGTAA CACGTGGGTA ACCTGCCTGT AAGACTGGGA TAACTCCGGG

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
3501636_B_ TGTAAGACTG GGATAACTCC GGGAAACCGG GGCTAATACC GGATGGTTGT
3501635_B_ GGGGGGGGAA AACCAGGGTA CCCCCTTAA AGTGGGAAAT TCCGAAACC
3501635_B_ AAACCAGGGC TAATACCGGA TGGTTGTTTG AACCGCATGG TTCAGACATA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
3501636_B_ TTGAACCGCA TGGTTCAGAC ATAAAAGGTG GCTTCGGCTA CCACCTACAG
3501635_B_ GGGGTTNATC CGGATGGTTT TTAACCCAG GTTCAAATA AAAGGGGGTT
3501635_B_ AAAGGTGGCT TCGGCTACCA CTTACAGATG GACCCGCGGC GCATTAGCTA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
3501636_B_ ATGACCCGC GGCGCATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC
3501635_B_ TCGGTTCCCC TTACNAGGA CCCCAGGGCC CTTAGCTATT TGGGAGGTAA
3501635_B_ GTTGGTGAGG TAACGGCTCA CCAAGGCGAC GATGCGTAGC CGACCTGAGA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
3501636_B_ GACGATGCGT AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCCACACT GGGACTGAGA
3501635_B_ CGGTTACCA AGGGGACGAT GGGTANCNGA CCTGNMNGG GATTGGCCC
3501635_B_ GGGTGATCGG CCACACTGGG ACTGAGACAC GGCCGAGACT CCTACGGGAG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      310      320      330      340      350
3501636_B_ CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAGGGAATCT TCCGCAATGG
3501635_B_ CCCTGGGACT NAGACCCGGC CCNNATTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA
3501635_B_ GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGACG AAAGTCTGAC GGAGCAACGC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      360      370      380      390      400
3501636_B_ ACGAAAGTCT GACGGAGCAA CGCCGCGTGA GTGATGAAGG TTTTCGGATC
3501635_B_ ATCTTCCGCA ATGGACGAAA TTCTGACGGA GCAACGCCGN NTGAATGATG
3501635_B_ CGCGTGAATG ATGAAGGTTT TCGGATCGTA AAGCTCTGTT GTTAGGGGAA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      410      420      430      440      450
3501636_B_ GTAAAGCTCT GTTGTTAGGG AAGAACAAGT GCCGTTCAA TAGGGCGGCA
3501635_B_ AAGGTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTT AGGGAAGAAC AAGTGCCGTT
3501635_B_ AACAAGTGCC GTTCAAATAG GCGGCACCT TGACGGTACC TAACCAGAAA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      460      470      480      490      500
3501636_B_ CCTTGACGGT ACCTAACCAG AAAGCCACGG CTAACTACGT GCCAGCAGCC
3501635_B_ CAAATAGGGC GGCACCTTGA CGGTACCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT
3501635_B_ GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      510      520      530      540      550
3501636_B_ GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC GGAATTATTG GCGGTAAAGG
3501635_B_ ACGTGCCAGC AGCCCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT
3501635_B_ GTTGTCGGA ATTATTGGGC GTAAAGGGCT CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      560      570      580      590      600
3501636_B_ GCTCGCAGGC GGTTTCTTAA GTCTGATGTG AAAGCCCCCG GCTCAACCGG
3501635_B_ ATTGGGCGTA AAGGGCTCGC AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC
3501635_B_ TGATGTGAAA GCCCCGGCT CAACCGGGA GGGTCATTGG AACTGGGGA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      610      620      630      640      650
3501636_B_ GGAGGGTCAT TGGAACTGG GGAAGTTGAG TGCAGAAGAG GAGAGTGGAA
3501635_B_ CCCGGCTCAA CCGGGGAGGG TCATTGAAA CTGGGGAAGT TGAGTGAGA
3501635_B_ ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGAATTC CACGTGTAGC GGTGAAATGC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      660      670      680      690      700
3501636_B_ TTCCACGTGT AGCGGTGAAA TGCCTAGAGA TGTGGAGGAA CACCAGTGGC
3501635_B_ AGAGGAGAGT GGAATTCAC GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATGTGGA
3501635_B_ GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGACTCTC TGGTCTGTAA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      710      720      730      740      750
3501636_B_ GAAGGCGACT CTCTGGTCTG TAACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG
3501635_B_ GGAACACCAG TGGCGAAGGC GACTCTCTGG TCTGTAAGT ACCTGAGGA
3501635_B_ CTGACGCTGA GGAGCGAAA CCGTGGGAGC GAACAGGATT AGTACCCTG

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      760      770      780      790      800
3501636_B_ AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAC CGATGAGTGC
3501635_B_ GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG
3501635_B_ GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGGGG GTTTCGCCCC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      810      820      830      840      850
3501636_B_ TAAGTGTTAG GGGGTTTCCG CCCCTTAGTG CTGCAGCTAA CGCATTAAAGC
3501635_B_ TAAACGATGA GTGCTAAGTG TTAGGGGGTT TCCGCCCTT AGTGCTGCAG
3501635_B_ CTTAGTGCTG CAGCTAACGC ATTAAGCACT CCGCCTGGGG AGTACGGTCG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      860      870      880      890      900
3501636_B_ ACTCCGCCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT GAAACTCAA GGAATTGACG
3501635_B_ CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT ACGGTGCGAA GACTGAAACT
3501635_B_ CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      910      920      930      940      950
3501636_B_ GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA
3501635_B_ CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGGTTTAATT
3501635_B_ ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAGG TCTTGACATC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      960      970      980      990      1000
3501636_B_ GAACCTTACC AGGTCTTGAC ATCCTCTGAC AATCCTAGAG ATAGGACGTC
3501635_B_ CGAAGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGTCT TGACATCCTC TGACAATCCT
3501635_B_ CTCTGACAAT CCTAGAGATA GGACGTCCCC TTCGGGGGCA GAGTGACAGG

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1010     1020     1030     1040     1050
3501636_B_ CCCTTCGGGG GCAGAATGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT
3501635_B_ AGAGATAGGA CGTCCCCTTC GGGGGCAGAG TGACAGGTGG TGCATGGTTG
3501635_B_ TGGTGCATGG TTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1060     1070     1080     1090     1100
3501636_B_ CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCACGAG CGCAACCCTT GATCTTAGTT
3501635_B_ TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA
3501635_B_ GCAACGAGCG CAACCCTTGA TCTTAGTTGC CAGCATTAGG TTGGGCACTC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1110     1120     1130     1140     1150
3501636_B_ GCCAGCATTC AGTTGGGCAN TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG
3501635_B_ CCCTTGATCT TAGTTGCCAG CATTAGTTG GGCCTCTAA GGTGACTGCC
3501635_B_ TAAGGTGACT GCCGGTGACA AACCAGGAGG AGGTGGGGAT GACGTCAAAT

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1160     1170     1180     1190     1200
3501636_B_ GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCANATGCC CCTTATGACT GGGCTANCNC
3501635_B_ GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT
3501635_B_ CATCATGCCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGACAGAAC

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1210     1220     1230     1240     1250
3501636_B_ GNNCTAAATG GACAAAACAA GGGCACCCAA ACCNNNGGT TANCCAATCC
3501635_B_ ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG ACAGAACAAA GGGCAGCGAA
3501635_B_ AAAGGGCAGC GAAACCGCGA GGTTAAGCCA ATCCCACAAA TCTGTTCTCA

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1260      1270      1280      1290      1300
3501636_B_ CCAAATNNTT TCCAGTTCGA TCNAATTNNC ACNCCNTGNG GGAAGTGGAA
3501635_B_ ACCGCGAGGT TAAGCCAATC CCACAAATCT GTTCTCAGTT CGGATCGCAG
3501635_B_ GTTCGGATCG CAGTCTGCAA CTCGACTGCG TGAAGCTGGA ATCGCTAGTA

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1310      1320      1330      1340      1350
3501636_B_ TCCTTAAATC CGGAAACANG NCCCGGGGAA AAATTTCCGG GCTTTTAACC
3501635_B_ TCTGCAACTC GACTGCGTGA AGCTGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC
3501635_B_ ATCGCGGATC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1360      1370      1380      1390      1400
3501636_B_ CCCCCCTCCC CCCGAANTTT TAACCCCAAC TNGGGGNAAC CTTTTGACCC
3501635_B_ ATGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTACACCC
3501635_B_ CGCCCGTCAC ACCACGAGAG TTTGTAAACAC CCGAAGTCGG TGAGGTAACC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1410      1420      1430      1440      1450
3501636_B_ CCCCCAAGGG GCAAATTGGG TTGGTTTAAAN ANNGGCNNA AAANNNGGG
3501635_B_ ACGAGAGTTT GTAACACCCG AAGTCGGTGA GGTAACCTTT ATGGAGCCAG
3501635_B_ TTT.....

```

```

      ....|....| ....|....| ....
                1460      1470
3501636_B_ GGGGGGGGGG GGGG.....
3501635_B_ CCGCCGAAGG TGACAGAANN NNNN
3501635_B_ .....

```

3. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลต D9B56Y เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

Bacillus amyloliquefaciens strain isolate MS622 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KY780539.1

Length: 1415

Identities: 1412/1412(100%)

Gaps: 0/1412(0%)

Strand: Plus/Plus

```

Query 1      GCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC 60
          |||
Sbjct 3      GCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC 62

Query 61     ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT 120
          |||
Sbjct 63     ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT 122

Query 121    GGTGTTTGAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG 180
          |||
Sbjct 123    GGTGTTTGAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG 182

```

Query	181	ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT	GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC	240
Sbjct	183	ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT	GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC	242
Query	241	GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG	300
Sbjct	243	GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG	302
Query	301	CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC	GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA	360
Sbjct	303	CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC	GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA	362
Query	361	TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT	GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGG	420
Sbjct	363	TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT	GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGG	422
Query	421	GCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	480
Sbjct	423	GCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	482
Query	481	TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG	GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT	540
Sbjct	483	TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG	GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT	542
Query	541	TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT	CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA	600
Sbjct	543	TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT	CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA	602
Query	601	CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA	TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	660
Sbjct	603	CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA	TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	662
Query	661	GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT	CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGC	720
Sbjct	663	GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT	CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGC	722
Query	721	GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT	TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG	780
Sbjct	723	GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT	TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG	782
Query	781	TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT	GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA	840
Sbjct	783	TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT	GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA	842
Query	841	GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG	GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA	900
Sbjct	843	GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG	GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA	902
Query	901	TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA	AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATC	960
Sbjct	903	TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA	AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATC	962
Query	961	CTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG	GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC	1020
Sbjct	963	CTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG	GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC	1022
Query	1021	TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT	CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC	1080
Sbjct	1023	TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT	CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC	1082
Query	1081	AGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGT	GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG	1140
Sbjct	1083	AGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGT	GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG	1142

```

Query 1141 ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA 1200
          |||
Sbjct 1143 ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA 1202

Query 1201 AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC 1260
          |||
Sbjct 1203 AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC 1262

Query 1261 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG 1320
          |||
Sbjct 1263 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG 1322

Query 1321 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC 1380
          |||
Sbjct 1323 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC 1382

Query 1381 CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAG 1412
          |||
Sbjct 1383 CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAG 1414

```

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของไอโซเลต G6B106 เปรียบเทียบกับ
ฐานข้อมูล

Bacillus amyloliquefaciens strain FS1092 chromosome, complete genome

Sequence ID: CP038028.1

Length: 4240930

Identities: 1402/1403(99%)

Gaps: 0/1403(0%)

Strand: Plus/Plus

```

Query 1 GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 60
          |||
Sbjct 2942132 GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 2942191

Query 61 CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 120
          |||
Sbjct 2942192 CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 2942251

Query 121 TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 180
          |||
Sbjct 2942252 TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 2942311

Query 181 GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 240
          |||
Sbjct 2942312 GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 2942371

Query 241 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG 300
          |||
Sbjct 2942372 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG 2942431

Query 301 GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAATG 360
          |||
Sbjct 2942432 GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAATG 2942491

```



```
|||||
Sbjct 2943392 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC 2943451
Query 1321 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACAC1380
|||||
Sbjct 2943452 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACAC 2943511
Query 1381 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT 1403
|||||
Sbjct 2943512 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT 2943534
```