



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดกรองแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

ชื่อนิสิต นางสาวธีรนาฏ ธนาพงศ์ภัก เลขประจำตัว 5832327723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

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

หัวข้อโครงการ

การคัดกรองแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

โดย

นางสาวธีรนาฏ ธนาพงศ์ภัค รหัสนิสิต 5832327723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ

ปีการศึกษา


2561


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์




หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ


อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)


กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล สือพร้อมชัย)


กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรอุทัย ภิญญาคง)


กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพั่งคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดกรองแบบที่เรียจากดินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

โดย

นางสาวธีรนาฏ ธนาพงศ์ภาค

เลขประจำตัว 5832327723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การคัดกรองแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

นิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวธีรนาฏ ธนาพงศ์ภักดิ์ รหัสประจำตัว 5832327723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยสามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง ได้ทั้งหมด 141 ไอโซเลต แต่พบว่าแบคทีเรียเพียง 87 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีชีวิตรอดและสามารถเจริญได้ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 87 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora* และ *Pyricularia oryzae* ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบได้ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช และจำนวนชนิดของราที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งได้ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต E10B77 เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชสูงเป็น 3 อันดับแรก ในรา 6 ชนิด คือ *A. furcatum*, *P. palmivora*, *P. oryzae*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *F. solani* โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเท่ากับ 41.67, 31.03, 31.03, 25.58, 24.32, และ 24.20% ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ได้ค่อนข้างต่ำ เพียง 9.09% เมื่อนำไอโซเลต E10B77 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลต E10B77 มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม สีครีมขุ่น ผิวหน้าเรียบ วาว มีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียง 99.93% กับแบคทีเรียหลายสปีชีส์ซึ่งจัดอยู่ใน *Bacillus subtilis* species complex เมื่อใช้ส่วนน้ำใสที่ปราศจากเซลล์ของไอโซเลต E10B77 ผสมกับอาหารแข็ง ในอัตราส่วน 1:1 แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช พบว่าส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 51.95% และมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ได้น้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 12.77% ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลต E10B77 มีศักยภาพในการนำไปปรับใช้เพื่อการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชได้ต่อไป

Project: Screening of bacteria from soil with inhibitory activity against phytopathogenic fungi

Student: Miss. Theeranath Thanaphongphak

Advisor: Assist. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

The aims of this project were to isolate and screen for bacteria which were capable of inhibiting plant fungal pathogens. From 13 soil samples, 141 isolates were obtained. However, only 87 isolates survived and were subsequently able to grow. These isolates were subjected to test for their antifungal activity against fungal plant pathogens including *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora* and *Pyricularia oryzae*. The results revealed that only 15 isolates were able to inhibit the growth of all fungal plant pathogens in this test. Comparison the ability to inhibit the growth of fungal plant pathogens by considering the percentage of inhibition and the number of fungal plant pathogens that these isolates were able to inhibit, it was found that isolate E10B77 was one of the top three bacteria that showed the highest percentage of inhibition against the growth of 6 fungi with 41.67, 31.03, 31.03, 25.58, 24.32, and 24.20% inhibition against *A. furcatum*, *P. palmivora*, *P. oryzae*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* and *F. solani*, respectively, and with the percentage of inhibition against *F. proliferatum* that was relatively low at only 9.09%. Morphological characterization of isolate E10B77 showed that its colony was rather round, creamy color, with smooth surface. Microscopic characterization revealed that isolate E10B77 was rod shaped, Gram positive, endospore forming bacteria. Analysis of 16S rDNA sequencing revealed that it was 99.93% similarity to several species of *Bacillus subtilis* species complex. By using cell free-broth from isolate E10B77 and mixed with solid medium at a ratio of 1:1, and then tested against fungal plant pathogens, it was found that the cell free-broth from isolate E10B77 showed the highest percentage of inhibition against *P. oryzae* at 51.95%, and the lowest percentage of inhibition against *F. proliferatum* at 12.77%. Taken together, isolate E10B77 showed the potential for the application in biocontrol of plant fungal pathogen.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฯ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำโครงการนี้ อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบและแก้ไขปรับปรุงโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อโครงการ และประสบการณ์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำโครงการนี้ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ ซึ่งได้แก่นางสาวรพีพรรณ โสวรรณปรีชา นางสาวจุฑาทากาญจน์ นามสง่า นางสาวสิริตา เสียมไหม และนายสิรภพ ภูมิภูติกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำโครงการนี้ ตลอดจนสนับสนุนการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ ๆ ปริญาเอกและปริญาโท และเพื่อน ๆ นิสิตปริญญาตรีในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่น่ารักทุกคน ที่คอยสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	11
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์	
2.1 เครื่องมือ	12
2.2 เคมีภัณฑ์	13
2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์	14
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน	15
3.2 การคัดกรองและการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช	15
3.2.1 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ	15
3.2.2 การเตรียมราที่ใช้ในการทดสอบ	15
3.2.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการขีด	16
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช	17
3.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	17
3.3.2 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย	17
3.3.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	18
3.3.4 การตรวจสอบผลิตรหัสพันธุกรรมจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	19
3.3.5 การทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์	19
3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย	19

3.4 การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแข็ง	20
3.4.1 การเตรียมราที่ใช้ในการทดสอบ	20
3.4.2 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลต E10B77	20
3.4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหารแข็ง	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน	22
4.2 การคัดกรองและการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช	22
4.2.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช	22
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช	67
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	67
4.3.2 ผลการทำปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอเรส	68
4.4 การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแข็ง	69
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	73
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	82

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i>	23
ตารางที่ 4.2: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i>	24
ตารางที่ 4.3: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i>	25
ตารางที่ 4.4: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>A. furcatum</i>	26
ตารางที่ 4.5: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. palmivora</i>	27
ตารางที่ 4.6: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. solani</i>	28
ตารางที่ 4.7: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. oryzae</i>	29
ตารางที่ 4.8: การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราทั้งหมดโดยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต	65
ตารางที่ 4.9: เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยใช้ ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้ว มาผสมกับอาหารแข็ง	70

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1: โรคแอนแทรกโนสที่เกิดบนผลพริก	2
รูปที่ 2: โรคถอดฝักดาบที่เกิดในต้นข้าว	3
รูปที่ 3: ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคใบจุดจากราสกุล <i>Acremonium</i>	4
รูปที่ 4: ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคโคนรากเน่าจากราสกุล <i>Phytophthora</i>	4
รูปที่ 5: ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคเหี่ยวจากราสกุล <i>Fusarium</i>	5
รูปที่ 6: ลักษณะอาการของข้าวที่ติดโรคใบไหม้	6
รูปที่ 7: การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการซีด	16
รูปที่ 8: การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ที่ผ่านการ กรองแล้วผสมกับอาหาร PDA	21
รูปที่ 9: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	30
รูปที่ 10: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	30
รูปที่ 11: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	30
รูปที่ 12: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	31
รูปที่ 13: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	31
รูปที่ 14: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	31
รูปที่ 15: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	32
รูปที่ 16: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	32
รูปที่ 17: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	32
รูปที่ 18: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	33
รูปที่ 19: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	33
รูปที่ 20: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	33
รูปที่ 21: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	34
รูปที่ 22: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	34
รูปที่ 23: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	34
รูปที่ 24: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	35
รูปที่ 25: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	35
รูปที่ 26: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	35
รูปที่ 27: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	36
รูปที่ 28: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	36
รูปที่ 29: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	36

รูปที่ 30: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	37
รูปที่ 31: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	37
รูปที่ 32: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	37
รูปที่ 33: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	38
รูปที่ 34: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	38
รูปที่ 35: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	38
รูปที่ 36: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	39
รูปที่ 37: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	39
รูปที่ 38: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	39
รูปที่ 39: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	40
รูปที่ 40: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	40
รูปที่ 41: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	40
รูปที่ 42: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	41
รูปที่ 43: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	41
รูปที่ 44: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	41
รูปที่ 45: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	42
รูปที่ 46: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	42
รูปที่ 47: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	42
รูปที่ 48: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	43
รูปที่ 49: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	43
รูปที่ 50: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	43
รูปที่ 51: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	44
รูปที่ 52: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	44
รูปที่ 53: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	44
รูปที่ 54: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	45
รูปที่ 55: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	45
รูปที่ 56: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	45
รูปที่ 57: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	46
รูปที่ 58: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	46
รูปที่ 59: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	46
รูปที่ 60: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	47
รูปที่ 61: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	47
รูปที่ 62: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	47

รูปที่ 63: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	48
รูปที่ 64: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	48
รูปที่ 65: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	48
รูปที่ 66: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	49
รูปที่ 67: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	49
รูปที่ 68: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	49
รูปที่ 69: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	50
รูปที่ 70: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	50
รูปที่ 71: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	50
รูปที่ 72: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	51
รูปที่ 73: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	51
รูปที่ 74: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	51
รูปที่ 75: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	52
รูปที่ 76: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	52
รูปที่ 77: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	52
รูปที่ 78: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	53
รูปที่ 79: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	53
รูปที่ 80: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	53
รูปที่ 81: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	54
รูปที่ 82: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	54
รูปที่ 83: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	54
รูปที่ 84: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	55
รูปที่ 85: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	55
รูปที่ 86: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	55
รูปที่ 87: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	56
รูปที่ 88: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	56
รูปที่ 89: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	56
รูปที่ 90: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	57
รูปที่ 91: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	57
รูปที่ 92: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	57
รูปที่ 93: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	58
รูปที่ 94: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	58
รูปที่ 95: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	58

รูปที่ 96: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	59
รูปที่ 97: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	59
รูปที่ 98: การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	59
รูปที่ 99: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต D9B56	60
รูปที่ 100: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต E7B71	60
รูปที่ 101: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต E10B77	60
รูปที่ 102: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต G2B101	61
รูปที่ 103: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A5B5	61
รูปที่ 104: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต B5B15	61
รูปที่ 105: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A4B25	62
รูปที่ 106: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต G1B100	62
รูปที่ 107: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A2B2	62
รูปที่ 108: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A4NB4	63
รูปที่ 109: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A4B4	63
รูปที่ 110: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต C5B27	63
รูปที่ 111: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A7B7	64
รูปที่ 112: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต G6B106	64
รูปที่ 113: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> ด้วยไอโซเลต A10B10	64
รูปที่ 114: ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต E10B77 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 10 ชั่วโมง	67
รูปที่ 115: ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไอโซเลต E10B77 จากการย้อมสีแกรม (1,000X)	68
รูปที่ 116: การย้อมแอนโดสปอร์ของไอโซเลต E10B77 (1,000X)	68
รูปที่ 117: ผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต E10B77 จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	69
รูปที่ 118: การยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	71
รูปที่ 119: การยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	71
รูปที่ 120: การยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	71
รูปที่ 121: การยับยั้ง <i>A. furcatum</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	71
รูปที่ 122: การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	72
รูปที่ 123: การยับยั้ง <i>F. solani</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	72
รูปที่ 124: การยับยั้ง <i>P. oryzae</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77	72

บทที่ 1

1.1 บทนำ

ราก่อโรคในพืชถือว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตพืช และผลผลิตทางการเกษตร ก่อให้เกิดความเสียหายตั้งแต่ระยะเริ่มการเพาะปลูกไปจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำให้ผลผลิตที่ได้น้อยลง ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค การผลิตอาหาร การส่งออก และการค้าระหว่างประเทศ นำไปสู่ปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ ทำให้เกิดการสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก (Wu และคณะ, 2015) ประเทศไทยถือว่าเป็นหนึ่งในประเทศเกษตรกรรมที่มีการผลิต และส่งออกสินค้าเกษตรเป็นจำนวนมาก รายได้ส่วนใหญ่จึงมาจากภาคการเกษตร และเนื่องจากในปัจจุบันมีการส่งออกสินค้าทางการเกษตรไปยังประเทศต่าง ๆ มากขึ้น อีกทั้งยังมีมาตรการการค้าระหว่างประเทศเพื่อตรวจสอบคุณภาพของสินค้าให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด รวมไปถึงผู้บริโภคส่วนใหญ่ในปัจจุบันหันมาให้ความสนใจกับคุณภาพ และความสะอาดของสินค้ามากขึ้น จึงปฏิเสธไม่ได้เลยว่าปัญหาราก่อโรคในพืช ที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของสินค้าเกษตรไม่ใช่ปัญหาที่สำคัญ (ณัฐพร อุทัยมงคล, 2559)

นอกจากจะสามารถก่อโรคในพืชได้แล้ว ก็ยังมีรายงานอีกว่าราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ได้ เช่น *Aspergillus flavus* สร้าง aflatoxin ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและเป็นสาเหตุของมะเร็งตับ (Razzaghi-Abyaneh และคณะ, 2009), *Fusarium graminearum* สร้าง trichothecene ซึ่งเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร, *Fusarium culmorum* สร้าง zearalenone ซึ่งเป็นพิษต่อตับ, ระบบเลือด, ระบบภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (Liew และคณะ, 2018)

ราที่ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ราในสกุล *Erysiphe* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้ง (powdery mildew) ในยาสูบ (Xie และคณะ, 2016) ราในสกุล *Botrytis* เป็นสาเหตุของโรคราสีเทา (gray mold) ในมะเขือเทศ (Williamson และคณะ, 2007), ราในสกุล *Colletotrichum* เป็นสาเหตุของโรค anthracnose ในฝ้าย (Nawaz และคณะ, 2018), ราในสกุล *Phytophthora* เป็นสาเหตุของโรคโคนรากเน่า (damping off) ในยางพารา (Promwee และคณะ, 2017), และราในสกุล *Fusarium* เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (wilt) ในแตงกวา เป็นต้น (Singh และคณะ, 1999)

โรคในพืชที่เกิดจากรา

1) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากราในสกุล *Colletotrichum* อาการของโรค จะเริ่มจากจุดแผลเล็ก ๆ สีน้ำตาลแล้วค่อย ๆ แผ่ขยายใหญ่ขึ้น ซึ่งระยะที่เห็นอาการของโรคชัดเจนที่สุดคือ ระยะที่ผลเริ่มสุก โดยโรคนี้นักพบระบาดมากในฤดูฝนหรือในบริเวณที่มีความชื้นสูง ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) คือ สร้างเส้นใยฟูสีขาวเทา และเมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างเส้นใยสีเทา หากเชื้อเจริญเต็มที่จะสร้างโคนิเดีย (conidia) ที่มีลักษณะคล้ายหยดน้ำขุ่น ๆ สีชมพูอมส้ม แล้วจะค่อย ๆ เจริญซ้อนกันเป็นชั้น ๆ โดยราชนิดนี้สามารถก่อโรคได้ในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น กิ่ง ใบ ดอก ผล และเมล็ด อีกทั้งยังก่อให้เกิดความเสียหายในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดอีกด้วย (Michasia Harris, 2557) เช่น ในผลพริกที่เริ่มสุก จะแสดงอาการเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลขนาดเล็ก ต่อมาจะค่อย ๆ ขยายใหญ่ขึ้นเป็นลักษณะวงรี หลังจากนั้นแผลจะเกิดการยุบตัวแล้วเห็นเป็นสีดำไหม้บริเวณรอยแผล (Oo และคณะ, 2016) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนผลพริก

(<https://www.svggroup.co.th/แอนแทรคโนสในพริก/>)

2) โรคถอดฝักดาบ (Bakanae disease) เป็นโรคในข้าวที่มีสาเหตุมาจากราในสกุล *Fusarium* โดยโรคนี้นี้จะมีลักษณะอาการ คือ ในระยะกล้า หากพบว่าเป็นโรคนี้นี้และมีอาการรุนแรง จะทำให้กล้าแห้งตาย ส่วนในต้นข้าวที่เป็นโรคจะมีลักษณะผอม สีเขียวอ่อนซีด ลำต้นสูงกว่าปกติ ที่โคนต้นและรากพบมีแผลเน่าสีน้ำตาลดำ บางครั้งพบกลุ่มเส้นใยสีชมพูที่บริเวณข้อปล้อง (Amatulli และคณะ, 2010) ดังรูปที่ 2 ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Fusarium proliferatum* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA คือ สร้างเส้นใยสีขาวฟู หนาแน่น เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างเส้นใยสีส้ม สีส้มชมพู หรือสีชมพูม่วง และมีการรายงานว่ารานชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชตระกูลกล้วยไม้ได้ด้วย (ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และคณะ,

2557) และ *Fusarium moniliforme* มีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA คือ สร้างเส้นใยสีขาวฟู เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างเส้นใยสีชมพูอมม่วง หรือสีม่วงคราม และยังพบว่าราชนิดนี้สามารถก่อโรคลำต้นเน่าในข้าวโพดได้อีกด้วย (Sunder และคณะ, 2014)



รูปที่ 2 โรคยอดฝักดาบที่เกิดในต้นข้าว

(<http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease%20and%20insect/index.php-file=content.php&id=119.htm>)

3) โรคใบจุด (leaf spot) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากราหลายสกุล ซึ่งสกุล *Acremonium* ถือว่าเป็นหนึ่งในราหลายสกุลที่สามารถก่อโรคนี้ได้ โดยโรคนี้จะมีลักษณะอาการ คือ จะเป็นจุดแผลสีน้ำตาลขนาดเล็กที่บริเวณก้าน ใบ และดอก เนื้อเยื่อรอบแผลเป็นสีเหลืองเข้ม อาจพบมีจำนวนจุดมากขึ้น เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นจะค่อย ๆ ลุกลามขยายออกเป็นแผลขนาดใหญ่ และทำให้เห็นแผลมีลักษณะอาการใหม่ได้ (Marie-Alix, 2016) ดังรูปที่ 3 ราชนิดนี้สามารถก่อโรคได้ในพืชหลายชนิด เช่น ปทุมมา กระเจียว ทับทิม ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Acremonium furcatum* มีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA คือ สร้างเส้นใยสีขาว เมื่ออายุมากจะสร้างเส้นใยสีเหลืองซีด โคลนินี้เริ่มแรกจะมีลักษณะคล้ายยีสต์ คือ ราจะเจริญแบบราบติดกับอาหาร แล้วจึงค่อย ๆ เจริญฟูขึ้น และโคลนินี้เจริญช้า (ธารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ, 2555)



รูปที่ 3 ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคใบจุดจากราสกุล *Acremonium*
(<http://enacademic.com/dic.nsf/enwiki/6291253>)

4) โรคโคนรากเน่า (damping-off) เป็นโรคที่มีสาเหตุเกิดจากราได้หลายชนิด ซึ่งหนึ่งในราที่ก่อโรคนี้เป็นราที่อาศัยอยู่ในสกุล *Phytophthora* โดยส่วนใหญ่ราในสกุลนี้สามารถก่อโรคกับพืชได้หลากหลาย เช่น ผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชล้มลุก รวมไปถึงไม้ยืนต้น ลักษณะอาการของโรคที่ส่วนบนของลำต้น จะพบว่า ใบจะเหลืองซีด ใบร่วง กิ่งเริ่มแห้งตาย ที่บริเวณโคนต้นจะแสดงอาการเป็นจุดสีดำ เปลือกเน่าเป็นสีน้ำตาล มีน้ำเยิ้มออกมา ส่วนที่ราก เปลือกจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล ผิวรากหลุดออกง่าย รากเน่า พืชจะแสดงอาการทรุดโทรมและตายในที่สุด (อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และคณะ, 2555) ดังรูปที่ 4 ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นรากกลุ่มโอโอไมซีทีส (oomycetes) สามารถพบได้ทั้งในน้ำและในดินที่ชื้นแฉะ มีลักษณะเส้นใยเป็นสีขาว สร้างซุโอสปอร์ (zoospore) ในสปอร์แรงเจียม (sporangium) เมื่อสปีพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะผลิตสปอร์ 2 ชนิด คือ zoospore และ chlamydospore (ทวี เก่าศิริ, 2545)



รูปที่ 4 ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคโคนรากเน่าจากราสกุล *Phytophthora*
(<http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/peppers/diseases-and-disorders/damping-off.html>)

5) โรคเหี่ยวจากรา *Fusarium* (*Fusarium wilt*) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากราในสกุล *Fusarium* ลักษณะอาการของโรคในระยะกล้าจะมีลักษณะต้นกล้าหัก พับล้มและแห้งตายคล้ายกับโรค damping off ส่วนระยะที่พืชโต อาจพบอาการใบเริ่มเหลืองจากด้านล่างขึ้นไปด้านบน ใบ กิ่ง และก้านเริ่มเหี่ยวเฉา และเชื้อจะเข้าไปเจริญอยู่ภายในท่อลำเลียงน้ำ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อ ใบจะค่อย ๆ เหี่ยว และอาจเกิดอาการไหม้ที่บริเวณขอบเนื้อเยื่อใบ หลังจากนั้นเนื้อใบส่วนที่เหลืองจะค่อย ๆ เปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง แล้วเกิดการเหี่ยวอย่างถาวรและทำให้พืชตายในที่สุด (ไทยเกษตรศาสตร์, 2556a) ดังรูปที่ 5 ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Fusarium solani* มีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA คือ สร้างเส้นใยฟู สีขาว นวล เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้างเส้นใยสีครีม หรือสีครีมแซมน้ำเงิน และพบว่าสามารถก่อโรคในถั่วเหลืองได้ (อภิรักษ์ สมฤทธิ์ และคณะ, 2556)



รูปที่ 5 ลักษณะอาการของพืชที่ติดโรคเหี่ยวจากราสกุล *Fusarium*

(<http://www.thaikasetsart.com/โรครากเน่า/>)

6) โรคไหม้ในข้าว (rice blast disease) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากราในสกุล *Pyricularia* ซึ่งรานี้สามารถสร้างความเสียหายให้ข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ในระยะกล้าจะมีลักษณะอาการเป็นจุดสีน้ำตาล ที่บริเวณกลางแผลเป็นสีเทา จึงมองเห็นเป็นลักษณะคล้ายรูปตา และเมื่อแผลขยายลุกลามไปทั่วบริเวณใบ จะเห็นใบมีลักษณะแห้งไหม้ ในระยะข้าวแตกกอ จะพบเกิดแผลสีน้ำตาลที่บริเวณใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น และในระยะข้าวออกรวง หากราเข้าทำลายในระยะนี้ จะพบว่าเมล็ดข้าวจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคในระยะรวงข้าวแก่ จะพบรอยขีดสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้รวงข้าวเปราะและหักง่าย (กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2559) ดังรูปที่ 6 ตัวอย่างของราในสกุลนี้ เช่น *Pyricularia oryzae* มีลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA คือ สร้างเส้นใยฟู สีขาวเทา เมื่ออายุมากจะสร้างเส้นใยสี

เทาเข้ม ซึ่งราชานิดนี้ถือว่าก่อให้เกิดความเสียหาย และยังพบมีการระบาดอย่างมากในประเทศไทยอีกด้วย (ลือชัย อารายะสังสฤษฏ์ และคณะ, 2538)



รูปที่ 6 ลักษณะอาการของข้าวที่ติดโรคใบไหม้

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

ในปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดหรือควบคุมราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชอย่างแพร่หลาย ตัวอย่าง ได้แก่ Captan ใช้ควบคุมโรคใบจุด ใบแห้ง ผลเน่าของผัก, Difolatan ใช้ควบคุมโรคใบไหม้ของ มันฝรั่ง และ Benomyl เป็นสารเคมีที่นิยมใช้แพร่หลาย เพราะสามารถยับยั้งราได้อย่างกว้างขวาง ใช้ได้ผลดีแม้ในอัตราความเข้มข้นต่ำ ใช้ควบคุมได้ทั้งโรคใบจุด โรคเน่า โรคราแป้ง และโรคใบไหม้ของข้าว เป็นต้น (ไทยเกษตรศาสตร์, 2556b) ซึ่งการใช้สารเคมีจะทำให้ราเกิดการดื้อต่อยาได้ง่าย จึงต้องมีการใช้สารเคมีในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้อาจมีการปนเปื้อนของสารเคมีในผลผลิต ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และยังทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อีกด้วย (Zhang และคณะ, 2017a) นอกจากนี้การใช้สารเคมียังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยง และยังอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ (Jeong และคณะ, 2017) ดังนั้นเพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีที่เพิ่มขึ้น จึงมีการศึกษาหาวิธีทางเลือกอื่น เพื่อมาใช้กำจัดราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชแทนการใช้สารเคมี ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า การควบคุมโดยวิธีชีวภาพ (biocontrol)

การควบคุมโดยวิธีชีวภาพ

การควบคุมโดยวิธีชีวภาพ เป็นวิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้สูง ไม่เป็นมลพิษ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มาควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชโดยการทำลาย ยับยั้งการเจริญ ลด หรือหยุดการแพร่ระบาดของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ซึ่งในธรรมชาติเชื้อปฏิปักษ์จะมีกลไกในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค โดยอาศัยหลักการการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน ซึ่งกลไกในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชมี 4 แบบ (Liu และคณะ, 2007) ได้แก่

1) การแข่งขัน (competition) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโต แข่งขัน แย่งแย่งสารอาหาร หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตและหยุดการแพร่ระบาดของโรค หรือมีการเจริญเติบโตได้น้อยลง เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันครอบครองพื้นที่ในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคพืช มีความสามารถในการแย่งแย่งสารอาหาร น้ำ หรืออากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชเจริญได้น้อย หรือไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญอยู่ จึงทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถก่อโรค บุกรุกหรือเข้าทำลายพืชได้ ซึ่งส่งผลให้พืชแข็งแรง เจริญเติบโตได้ดีไม่เป็นโรค ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณที่สูง (Liu และคณะ, 2013) ตัวอย่างการควบคุมโรคพืชของจุลินทรีย์ด้วยกลไกนี้ เช่น แบคทีเรียสกุล *Pseudomonad* มีความสามารถในการแย่งแย่งธาตุเหล็ก และแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารอาหารที่ราในสกุล *Fusarium* ใช้ในการเจริญเติบโต จึงส่งผลให้รา ไม่สามารถเจริญเติบโตและก่อโรคในพืชได้ (Elad และคณะ, 2002)

2) การทำลาย (antibiosis) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งหรือสารที่สามารถทำลายเชื้อก่อโรคและจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เอนไซม์ (enzyme) และสารพิษ (toxin) โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะผลิตและหลั่งสารออกมานอกเซลล์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งกลไกนี้นับเป็นกลไกแรกที้นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืช อีกทั้งยังนำกลไกนี้มาผลิตเป็นยารักษาโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืชอีกด้วย (Ulloa-Ogaz และคณะ, 2015) ตัวอย่างการควบคุมโรคพืชของจุลินทรีย์ด้วยกลไกนี้ เช่น ราในสกุล *Trichoderma* sp. มีความสามารถในการผลิตสารที่เป็นพิษต่อ *Rhizoctonia solani* และ *Pythium* spp. ได้ และมีรายงานว่า *Trichoderma pseudokoningii* และ *Trichoderma viride* สามารถผลิตสารมายับยั้ง *Botrytis cinerea* ที่ก่อโรคในผลสตรอเบอร์รี่ และ *Trichoderma hamatum* สามารถผลิตสารระเหยที่สามารถลดราสีเทาที่ก่อโรคบริเวณฝักและดอกของถั่วได้ (Elad และคณะ, 2002)

3) การเป็นปรสิต (parasitism) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีสมบัติเป็นปรสิต มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัย หรือมีกลไกทำลายส่วนต่าง ๆ ภายในสิ่งมีชีวิตอื่นได้ เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืช แล้วมีการดูดกินอาหาร ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกดูดกินอาหารค่อย ๆ อ่อนแอลง และตายในที่สุด หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้าไปทำลายภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ทำให้ลดการก่อโรคในพืชได้ (Tebit, 2017) ตัวอย่างการควบคุมโรคพืชของจุลินทรีย์ด้วยกลไกนี้ เช่น มีรายงานว่า *Bacillus penetrans* สามารถควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้ และยังพบว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในดินก็ยังสามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพได้อีกด้วย (Sayre, 1980)

4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถชักนำ หรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืชให้ต้านทานต่อการทำลายของเชื้อก่อโรคได้ โดยกลไกนี้จะเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคของพืช ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคมมากขึ้น ตัวอย่างการควบคุมโรคพืชของจุลินทรีย์ด้วยกลไกนี้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* มีความสามารถในการผลิตกรดซาลิไซลิก และเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อ *B. cinerea* ในถั่วได้ (Elad และคณะ, 2002) และยังมีรายงานการชักนำให้พืช *Phyllanthus niruri* Linn ต้านทานต่อโรคโคนรากเน่า ที่มีสาเหตุมาจาก *R. solani* ได้อีกด้วย (Kamalakkannan และคณะ, 2004)

จากการศึกษากลไกต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าส่วนใหญ่นิยมศึกษาจุลินทรีย์ในดิน เนื่องจากในดินมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มากและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ตัวอย่างเช่น การแยกดินจากต้นอะโวคาโด พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Paenibacillus apiaries*, *Paenibacillus peoriae* และ *Bacillus velezensis* ที่สามารถยับยั้ง *Raffaelea lauricola* ซึ่งก่อให้เกิดโรค laurel wilt ในอะโวคาโด และยังสามารถยับยั้ง *Fusarium euwallaceae* ที่ก่อให้เกิดโรค *Fusarium dieback* ในอะโวคาโดได้อีกด้วย (Dunlap และคณะ, 2017)

Bacillus spp.

สกุล *Bacillus* ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก มีการสร้างเอนโดสปอร์ ทำให้ทนต่อภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี สามารถพบได้ในทุกสภาพแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำ อากาศ ดินบริเวณรากพืช ทางเดินอาหารของสัตว์ หรือในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Connor และคณะ, 2010) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจำกัด มีความสามารถในการผลิตสารทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด (Fira และคณะ, 2018; Wang และคณะ, 2013) ตัวอย่างของสารต้านราที่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ผลิตขึ้น ได้แก่ สารกลุ่มแบคทีริโอซิน (bacteriocin), สารกลุ่มพอลิคีไทด์ (polyketide) และสารกลุ่มลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) เช่น เฟนไกซิน (fengycin), เซอร์แฟกติน (surfactin), อีทูริน (iturin) และบาซิลโลมัยซิน (bacillomycin) เป็นต้น (Fira และคณะ, 2018)

มีรายงานว่า *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้ง *Aspergillus parasiticus* ที่สร้าง aflatoxin ชนิดบีและชนิดจี ซึ่งเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง ที่มักพบในพืชที่ใช้เป็นอาหารได้ โดยพบว่า *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* นอกจากสามารถยับยั้งการเจริญของราและยับยั้งการสร้างสาร aflatoxin แล้ว ยังสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้าง ATP และยังสามารถยับยั้งการสร้าง ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยของรา ซึ่งส่งผลต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของเส้นใยราได้ (Siahmoshteh และคณะ, 2018)

Bacillus licheniformis MH48 ที่แยกได้จากดิน พบว่าสามารถสร้างกรดเบนโซอิกซึ่งมีฤทธิ์ทำให้โครงสร้างสปอร์ของราหลายชนิดเปลี่ยนไป ส่งผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ และสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของ *C. gloeosporioides* และ *R. solani* ได้ อีกทั้งยังสามารถสร้างสารอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ เช่น ไลเคนโนซิน (lichenysin), เซอร์แฟกติน และอีทูริน (Jeong และคณะ, 2017)

Bacillus atrophaeus สายพันธุ์ B5 ที่แยกได้จากผลทุเรียนเทศและผลอะโวคาโด พบว่าสามารถสร้าง เซอร์แฟกติน, บาซิลโลมัยซิน และอีทูริน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในผลทุเรียนเทศและผลอะโวคาโด (Guardado-Valdivia และคณะ, 2018) นอกจากนี้ยังพบว่า *B. atrophaeus* สายพันธุ์อื่น ๆ สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น สายพันธุ์ LB14, HM03 และ HM17

สามารถสร้าง ไคตินเนส (chitinase), โปรตีเอส (protease) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของกลุ่มเส้นใยของ *Colletotrichum acutatum* และ *C. gloeosporioides* (Han และคณะ, 2015) และสายพันธุ์ CAB-1 สามารถสร้าง O-anisaldehyde ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *B. cinerea* ที่เป็นสาเหตุของโรคราสีเทาในมะเขือเทศ และยังสามารถยับยั้งราที่ก่อโรคราแป้งในแตงกวาได้อีกด้วย (Zhang และคณะ, 2013)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา

จากการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้นั้น มักพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้จะมียีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ ตัวอย่างเช่น

มีรายงานว่า *B. velezensis* LDO2 มียีน *fen* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารเพนไซซินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยราและการงอกของสปอร์รา, ยีน *srf* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเซอร์แฟกตินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา โดยจะยับยั้งการสังเคราะห์กลูแคน ทำให้มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ และยังมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้พืชต้านทานต่อเชื้อก่อโรค และยังมียีน *bac* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารบาซิลิซิน (bacilysin) ที่มีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของรา (Chen และคณะ, 2019) *B. amyloliquefaciens* W10 มียีน *fenB*, *ituD* และ *sfp* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารเพนไซซิน, อิทริน และเซอร์แฟกติน ตามลำดับ ทำให้ *B. amyloliquefaciens* W10 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *B. cinerea* ได้ โดยการทำลายผนังเซลล์ของราดังกล่าว (Zhang และคณะ, 2017b)

นอกจากนี้ มีรายงานว่า *B. subtilis* 9407 มียีน *ppsB* ซึ่งเป็นหนึ่งในห้ายีนที่ควบคุมการสร้างสารเพนไซซิน โดยกลไกของสารเพนไซซินอาจเข้าไปทำปฏิกิริสัมพันธ์กับโมเลกุลของสเตียรอยด์และพอสโพลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ของรา ส่งผลให้ *B. subtilis* 9407 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Botryosphaeria dothidea* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในแอปเปิ้ลได้ (Fan และคณะ, 2017b)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นที่การหาแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่สนใจ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ดี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการที่จะสามารถนำแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียไปใช้ควบคุมโรคราที่ก่อโรคในพืช

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- พบแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช
- สามารถนำไปใช้ในการควบคุมราที่ก่อโรคพืชได้

บทที่ 2

เครื่องมือ, เคมีภัณฑ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 เครื่องมือ

1. กระจกชนิดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH 30 ของบริษัท Olympus, Japan
3. เครื่องแก้ว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex, USA
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTM thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
6. เครื่องซั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Science, USA
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hittich zentrifugen, Germany
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของบริษัท Beckman, USA
10. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries., USA
11. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
13. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
14. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 15X60 มิลลิเมตร ของบริษัท Bioscan, Thailand
15. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
16. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 ของบริษัท ISSCO, USA

17. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
18. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
19. ไมโครปิเปตและทึปรู่น P200 และ P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
20. หลอดไมโครพิวจ์ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท F.L. medical s.r.l., Italy
21. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
22. ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ภาชนะเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
23. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
24. Cock Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

2.2 เคมีภัณฑ์

1. คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ของบริษัท Meerck, Germany
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneJet Gel extraction kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
3. ชุดทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ GeneJet Genomic DNA purification kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
5. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
6. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
7. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
8. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-rad, USA
9. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, india

10. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท J.T. Baker, USA
11. ไอโอดีน (Iodine) ของบริษัท Merck, Germany
12. 1 kb DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
13. GoTaq[®] Green Master Mix ของบริษัท Promega, USA

2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(Chen และคณะ, 2015)
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	(Chen และคณะ, 2015)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ก) มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยในแต่ละตัวอย่างจะเจือจางตั้งแต่ระดับ 10^{-2} ถึง 10^{-8} เลือกตัวอย่างดินระดับความเจือจางที่ 10^{-5} ถึง 10^{-8} มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ข1) เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาแยกให้บริสุทธิ์ เก็บในอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 การคัดกรองและการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

3.2.1 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ

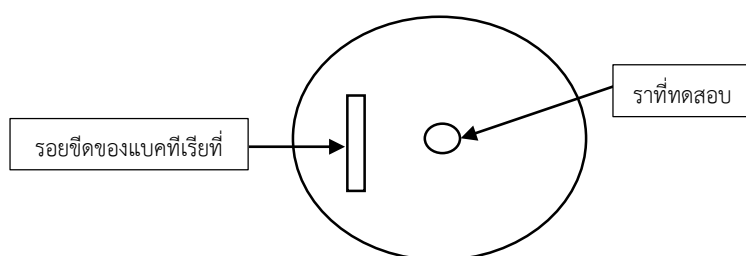
นำแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ข2) บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.2.2 การเตรียมราที่ใช้ในการทดสอบ

เลี้ยงราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*. และ *P. oryzae* บนอาหาร Potato Dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ข3) บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน และเลี้ยงราน้ำ *P. palmivora* บนอาหาร V8 agar (ภาคผนวก ข4) บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน

3.2.3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอโซเลตต่าง ๆ ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการขีด

เจาะชั้นวุ้นของราที่ใช้ในการทดสอบด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้ววางไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อ โดยวางชั้นวุ้นของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*. และ *P. oryzae* บนอาหาร PDA และวางชั้นวุ้นของ *P. palmivora* บนอาหารแข็ง V8 จากนั้นขีดแบคทีเรียโอโซเลตต่าง ๆ จากข้อ 3.2.1 ลงบนอาหารที่มีชั้นวุ้นของรา โดยให้มีระยะห่างจากชั้นวุ้นของราประมาณ 15 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 7 และชุดควบคุมวางชั้นวุ้นของราที่ใช้ในการทดสอบไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการขีดแบคทีเรีย



รูปที่ 7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการขีด

บ่มจานเพาะเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน หลังจากนั้นสังเกตบริเวณยับยั้งของราที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรามีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยวัดตั้งแต่บริเวณปลายสุดของเส้นใยราที่มีการเจริญ จากด้านที่ขีดแบคทีเรีย ผ่านจุดกึ่งกลางชั้นวุ้นของราที่ใช้ในการทดสอบ จนถึงปลายสุดของเส้นใยราอีกด้านหนึ่ง แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรด้านล่าง (ธารทิพย์ รัตนะ, 2559) เพื่อเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดและยับยั้งชนิดของราก่อโรคพืชได้มากที่สุด นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ และทดสอบในขั้นต่อไป

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

โดย A คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม (มิลลิเมตร)

B คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดทดสอบ (มิลลิเมตร)

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

เลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดและยับยั้งชนิดของราก่อโรคพืชได้มากที่สุดจากข้อ 3.2 มา 1 ไอโซเลต แล้วนำมาระบุเอกลักษณ์ ดังนี้

3.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ข1) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมสี (Gram stain) และตรวจสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียโดยการย้อมสปอร์ แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.2 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJet Genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific) ดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ทำจนครบปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติม Gram positive bacteria lysis buffer 180 ไมโครลิตรกับเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป 9 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม lysis solution 200 ไมโครลิตร กับเอนไซม์ Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ RNase A 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม ethanol absolute 200 ไมโครลิตร กับน้ำปลอดประจุที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลง column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เติม wash buffer I 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม wash buffer II 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาทีอีกครั้ง แล้วเปลี่ยน collection tube เป็นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม elution buffer 200

ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมสำเร็จรูป GoTaq® Green Master Mix (Promega) แล้วเตรียมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ดังนี้

GoTaq® Green Master Mix	50 ไมโครลิตร
27F (forward primer)	2 ไมโครลิตร
1492R (reverse primer)	2 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	6 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	40 ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้าด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 วินาที โดยแช่หลอดอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง PCR (Biorad) และปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนด ดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที	

3.3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.3.3 มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจล โดยเตรียมอะกาโรสเจล (ภาคผนวก ค1) จากนั้นโหลดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็น 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีเคลื่อนที่มาเกือบถึงปลายสุดของอะกาโรสเจล นำเจลออกจากแชมเบอร์ แล้วนำไปส่องใต้ UV ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.5 การทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

สกัดดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJet Gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific) โดยเริ่มจาก ตัดเจลใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Binding buffer ปริมาตรเท่าน้ำหนักเจล บ่มหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายจากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสด้านล่างออก เติม wash buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง 1 นาที หลังจากนั้นย้าย column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

ส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในข้อ 3.3.5 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN

3.4 การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแข็ง

3.4.1 การเตรียมราที่ใช้ในการทดสอบ

เลี้ยงราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*. และ *P. oryzae* บนอาหาร Potato Dextrose agar (PDA) บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน และเลี้ยงราน้ำ *P. palmivora* บนอาหาร V8 agar บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน

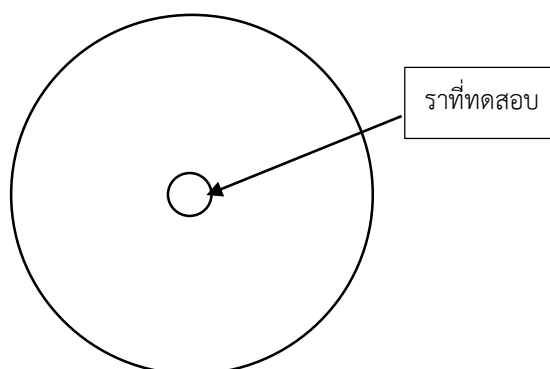
3.4.2 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลต E10B77

เลี้ยงไอโซเลต E10B77 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว LB ใหม่ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสไปกรองโดยใช้ชุดกรอง Millipore ด้วยแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหารแข็ง

นำส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้ว มาผสมกับอาหารแข็ง PDA ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ส่วนน้ำใส 5 มิลลิลิตรผสมกับอาหารแข็ง PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง แล้วเจาะชิ้นส่วนของราที่ใช้ในการทดสอบด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อ โดยวางชิ้นส่วนของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*. และ *P. oryzae* บนอาหาร PDA ที่ผสมกับส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นส่วนของราที่ใช้ในการทดสอบไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มี

อาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตรผสมกับอาหารแข็ง PDA 5 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 8 ส่วนการทดสอบกับ *P. palmivora* ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ใช้อาหารแข็ง V8 แทนอาหารแข็ง PDA



รูปที่ 8 การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหาร PDA

บ่มจานเพาะเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน หลังจากนั้นสังเกตบริเวณยับยั้งของราที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรามีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยวัดตั้งแต่บริเวณปลายสุดของเส้นใยราที่มีการเจริญด้านหนึ่ง ผ่านจุดกึ่งกลางขึ้นวันของราที่ใช้ในการทดสอบ จนถึงปลายสุดของเส้นใยราอีกด้านหนึ่ง แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรด้านล่าง (ธารทิพย์ รัตนะ, 2559) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

โดย A คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม (มิลลิเมตร)

B คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดทดสอบ (มิลลิเมตร)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

จากการนำตัวอย่างดินทั้ง 13 ตัวอย่างมาเจือจาง แล้วเลือกระดับความเจือจางที่ 10^{-5} ถึง 10^{-8} มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยกให้บริสุทธิ์ พบว่า ได้แบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันทั้งหมด 141 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่เจริญปกติ 75 ไอโซเลต ซึ่งมีขนาดโคโลนีประมาณ 0.1 ถึง 0.5 เซนติเมตร เมื่อบ่มเพลท เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเป็นแบคทีเรียที่เจริญเร็ว 66 ไอโซเลต ซึ่งโคโลนีมีขนาดใหญ่เต็มเพลท เมื่อบ่มเพลท เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงนำแบคทีเรียที่เจริญเร็วไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB 0.5X ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งเพื่อทำให้แบคทีเรียเจริญได้ช้าลง (ภาคผนวก ข2) และสามารถแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งเมื่อบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่เจริญเร็วมีขนาดโคโลนีประมาณ 0.5 ถึง 0.7 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชต่อไป

4.2 การคัดกรองและการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

นำแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้จากข้อ 4.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเตรียมแบคทีเรียก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 87 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ จึงนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชต่อไป

4.2.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

จากการฉีดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ลงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีชิ้นส่วนของราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*. และ *P. oryzae* และฉีดแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ลงบนอาหารแข็ง V8 ที่มีชิ้นส่วนของ *P. palmivora* โดยให้มีระยะห่างระหว่างตำแหน่งที่ฉีดแบคทีเรียกับชิ้นส่วนของราประมาณ 15

มิลลิเมตร พบว่า จากแบคทีเรียจำนวน 87 ไอโซเลต มีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด เพียง 15 ไอโซเลต เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่วางขึ้นวุ้นของราที่ใช้ในการทดสอบไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการขีดแบคทีเรียลงไป ดังแสดงในตารางที่ 4.1 - 4.7 และการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตดังรูปที่ 9 - 113

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. gloeosporioides*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>C. gloeosporioides</i>	
D9B56	37	27	27.03%
E7B71	37	33	10.81%
E10B77	37	28	24.32%
G2B101	37	28	24.32%
A5B5	37	31	16.22%
B5B15	37	24	35.14%
C4B25	37	30	18.92%
G1B100	37	32	13.51%
A2B2	37	29	21.62%
A4NB4	37	30	18.92%
A4B4	37	29	21.62%
C5B27	37	30	18.92%
A7B7	37	30	18.92%
G6B106	37	24	35.14%
A10B10	37	27	27.03%

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. proliferatum*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>F. proliferatum</i>	
D9B56	36.3	28	22.87%
E7B71	36.3	29	20.11%
E10B77	36.3	33	9.09%
G2B101	36.3	28	22.87%
A5B5	36.3	29	20.11%
B5B15	36.3	29	20.11%
C4B25	36.3	22	39.39%
G1B100	36.3	28	22.87%
A2B2	36.3	31	14.60%
A4NB4	36.3	26	28.37%
A4B4	36.3	31	14.60%
C5B27	36.3	28	22.87%
A7B7	36.3	28	22.87%
G6B106	36.3	30	17.36%
A10B10	36.3	32	11.85%

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. moniliforme*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>F. moniliforme</i>	
D9B56	43	31	27.91%
E7B71	43	34	20.93%
E10B77	43	32	25.58%
G2B101	43	32	25.58%
A5B5	43	34	20.93%
B5B15	43	31	27.91%
C4B25	43	33	23.26%
G1B100	43	33	23.26%
A2B2	43	34	20.93%
A4NB4	43	33	23.26%
A4B4	43	32	25.58%
C5B27	43	32	25.58%
A7B7	43	32	25.58%
G6B106	43	30	30.23%
A10B10	43	35	18.60%

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *A. furcatum*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>A. furcatum</i>	
D9B56	24	13	45.83%
E7B71	24	21	12.50%
E10B77	24	14	41.67%
G2B101	24	17	29.17%
A5B5	24	20	16.67%
B5B15	24	15	37.50%
C4B25	24	21	12.50%
G1B100	24	15	37.50%
A2B2	24	22	8.33%
A4NB4	24	16	33.33%
A4B4	24	18	25.00%
C5B27	24	23	4.17%
A7B7	24	19	20.83%
G6B106	24	13	45.83%
A10B10	24	16	33.33%

ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. palmivora*

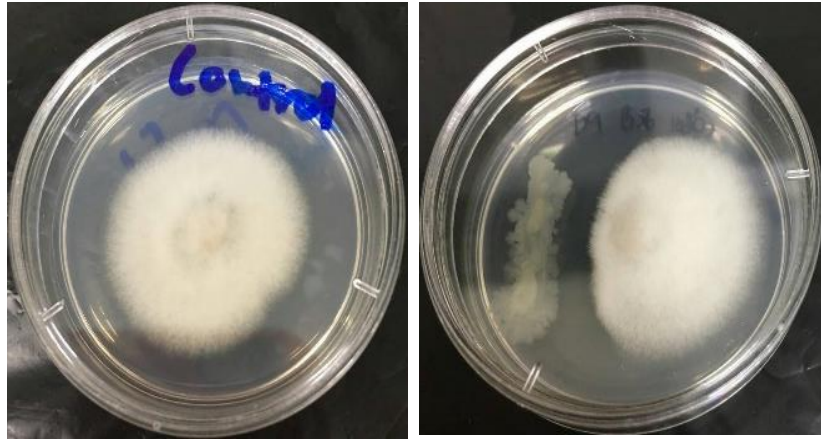
ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>P. palmivora</i>	
D9B56	29	19	34.48%
E7B71	29	19	34.48%
E10B77	29	20	31.03%
G2B101	29	20	31.03%
A5B5	29	21	27.59%
B5B15	29	22	24.14%
C4B25	29	22	24.14%
G1B100	29	22	24.14%
A2B2	29	23	20.69%
A4NB4	29	23	20.69%
A4B4	29	25	13.79%
C5B27	29	25	13.79%
A7B7	29	26	10.34%
G6B106	29	27	6.90%
A10B10	29	27	6.90%

ตารางที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. solani*

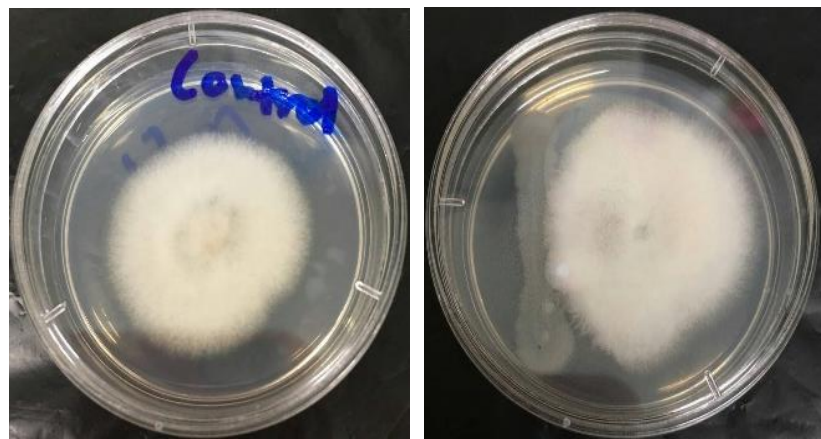
ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>F. solani</i>	
D9B56	34.3	30	12.54%
E7B71	34.3	25	27.11%
E10B77	34.3	26	24.20%
G2B101	34.3	27	21.28%
A5B5	34.3	29	15.45%
B5B15	34.3	30	12.54%
C4B25	34.3	27	21.28%
G1B100	34.3	28	18.37%
A2B2	34.3	31	9.62%
A4NB4	34.3	30	12.54%
A4B4	34.3	28	18.37%
C5B27	34.3	25	27.11%
A7B7	34.3	27	21.28%
G6B106	34.3	29	15.45%
A10B10	34.3	29	15.45%

ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. oryzae*

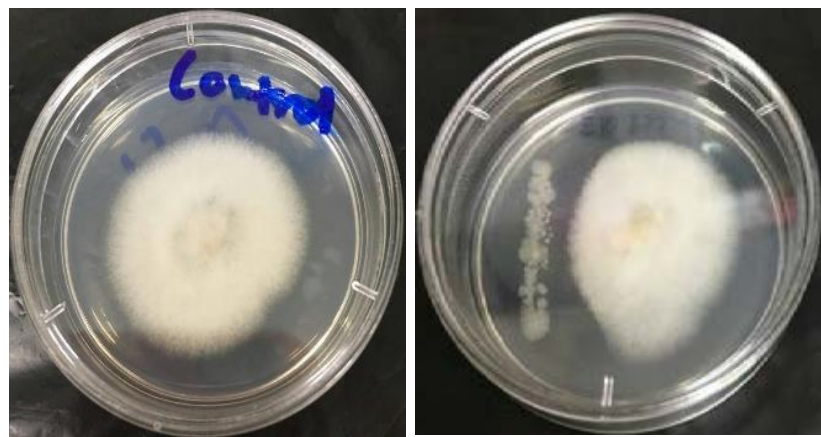
ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	<i>P. oryzae</i>	
D9B56	29	18	37.93%
E7B71	29	15	48.28%
E10B77	29	20	31.03%
G2B101	29	15	48.28%
A5B5	29	23	20.69%
B5B15	29	20	31.03%
C4B25	29	20	31.03%
G1B100	29	15	48.28%
A2B2	29	13	55.17%
A4NB4	29	17	41.38%
A4B4	29	19	34.48%
C5B27	29	17	41.38%
A7B7	29	15	48.28%
G6B106	29	18	37.93%
A10B10	29	12	58.62%



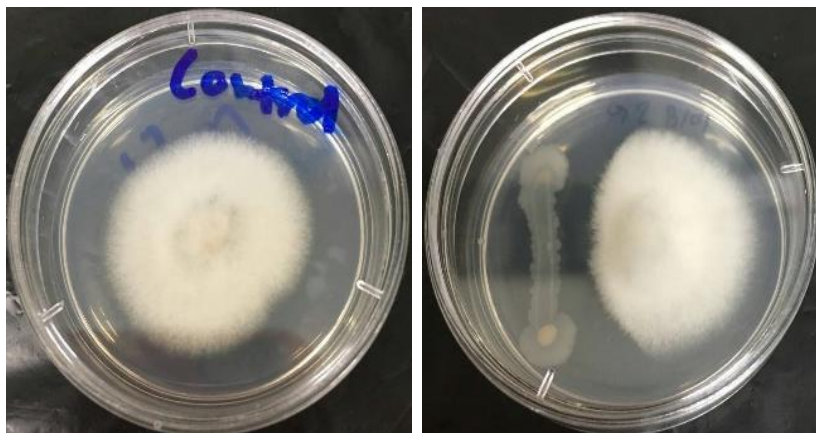
รูปที่ 9 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต D9B56



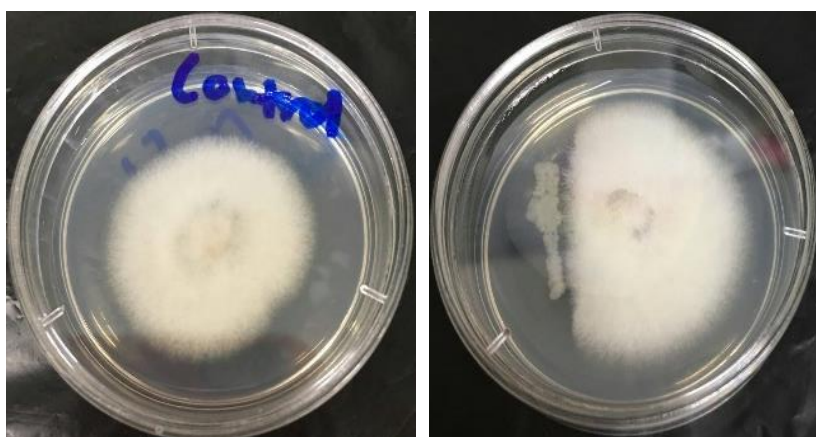
รูปที่ 10 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต E7B71



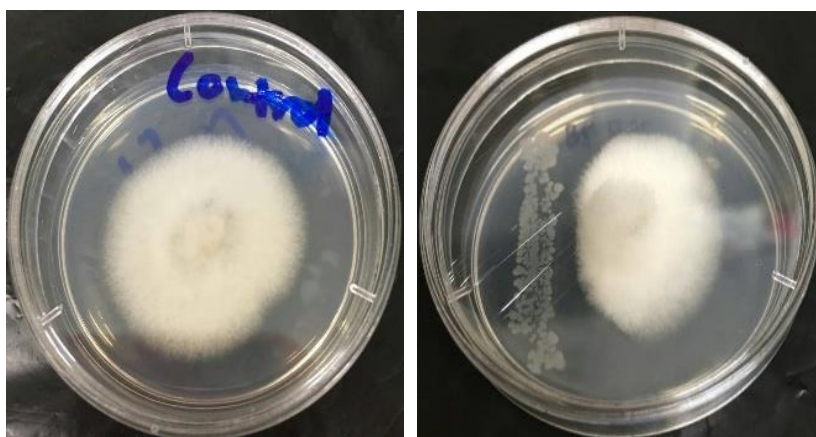
รูปที่ 11 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต E10B77



รูปที่ 12 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต G2B101



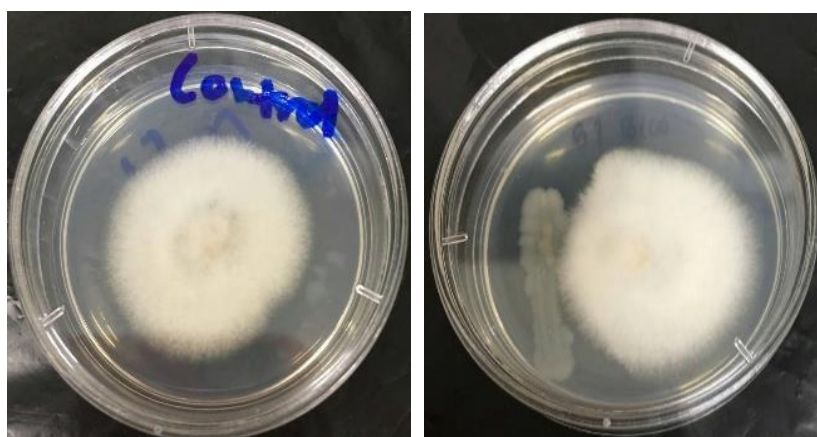
รูปที่ 13 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A5B5



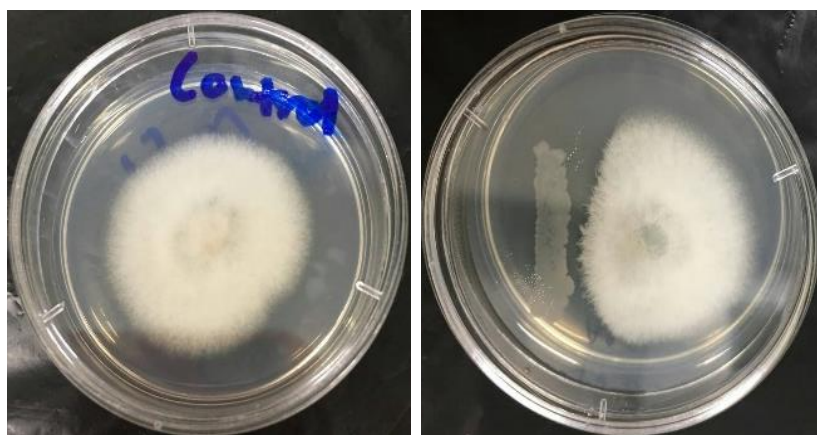
รูปที่ 14 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต B5B15



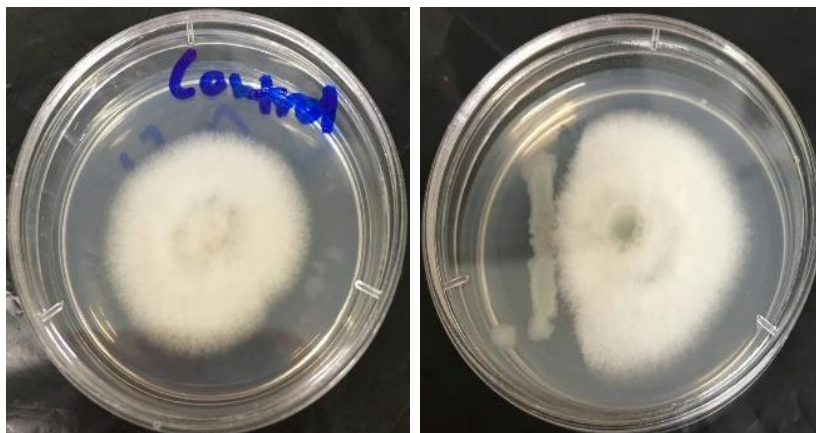
รูปที่ 15 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A4B25



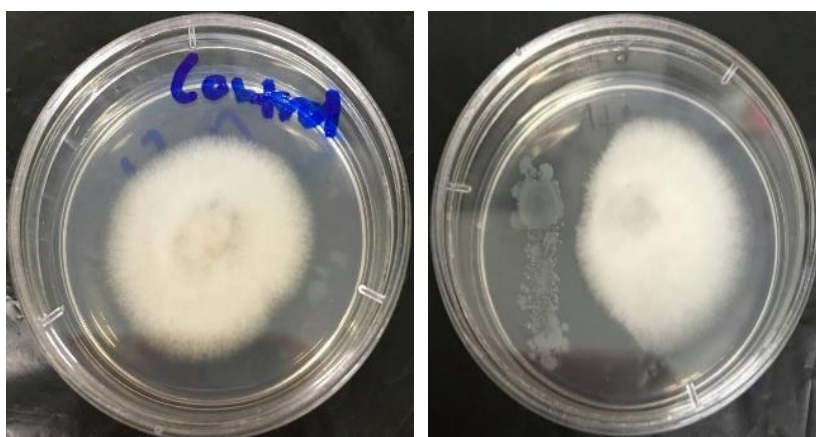
รูปที่ 16 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต G1B100



รูปที่ 17 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A2B2



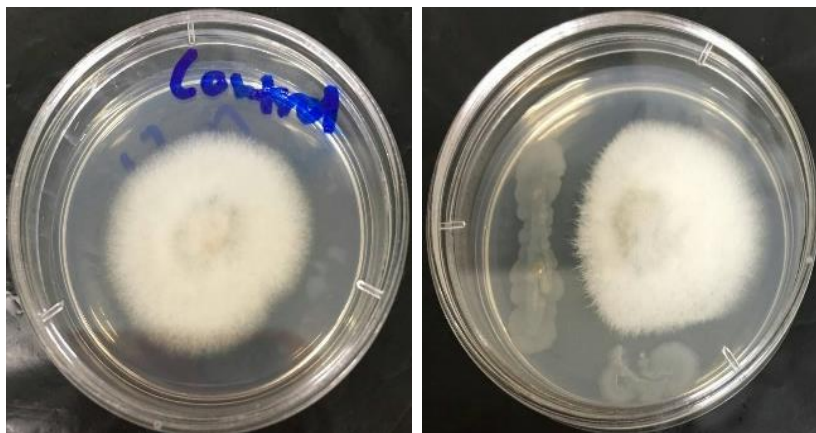
รูปที่ 18 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A4NB4



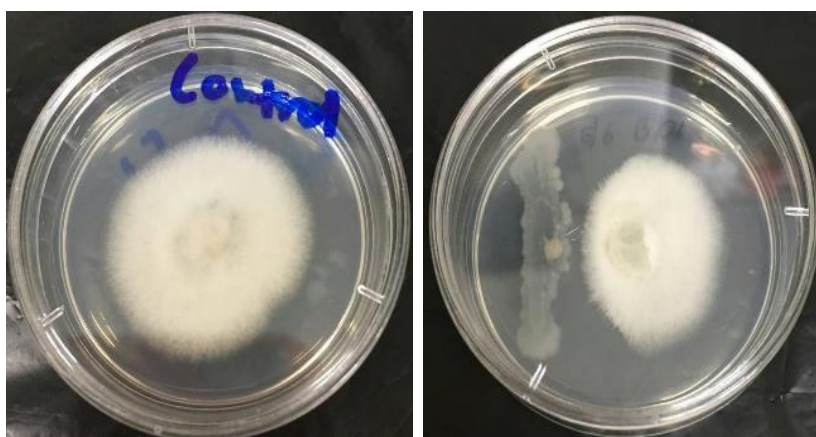
รูปที่ 19 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A4B4



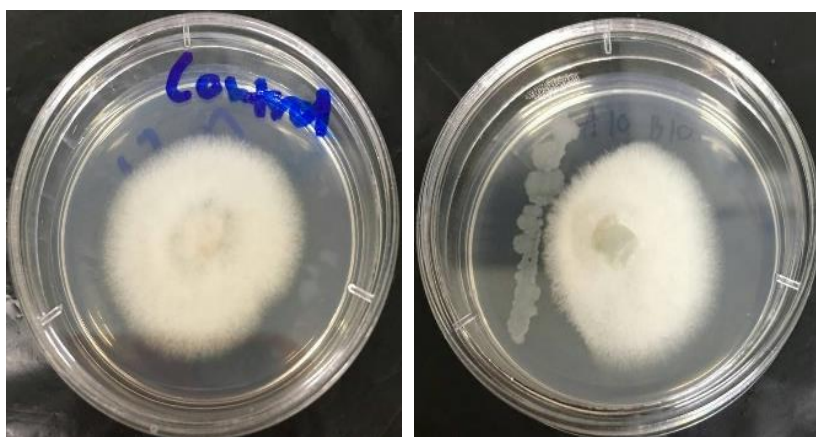
รูปที่ 20 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต C5B27



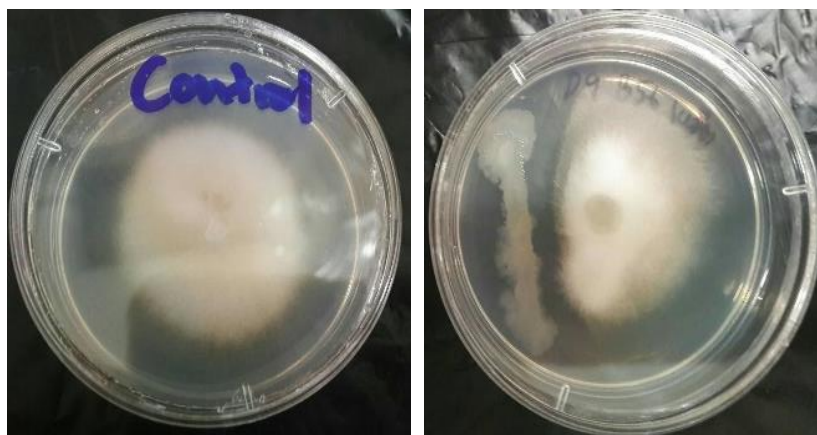
รูปที่ 21 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A7B7



รูปที่ 22 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต G6B106



รูปที่ 23 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* ด้วยไอโซเลต A10B10



รูปที่ 24 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต D9B56



รูปที่ 25 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต E7B71



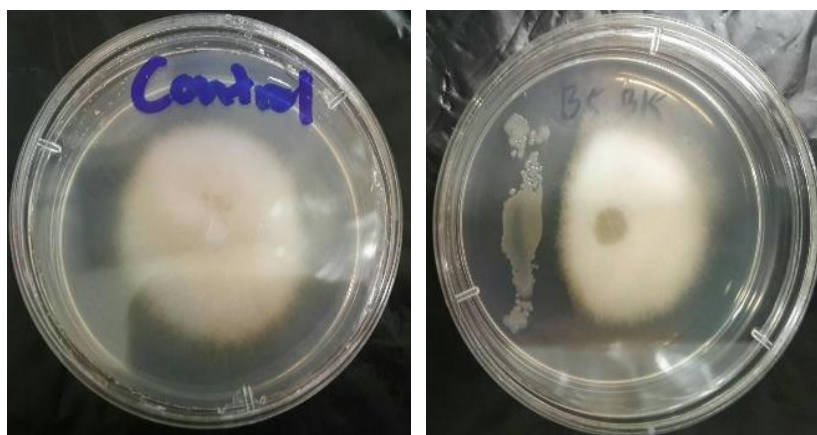
รูปที่ 26 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต E10B77



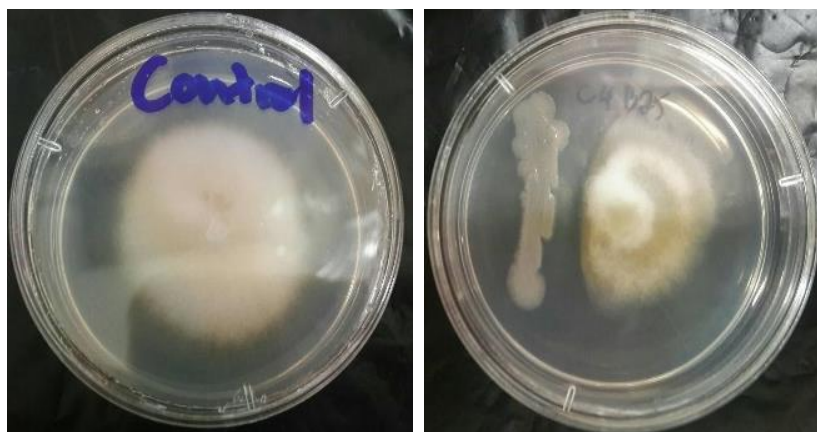
รูปที่ 27 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต G2B101



รูปที่ 28 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A5B5



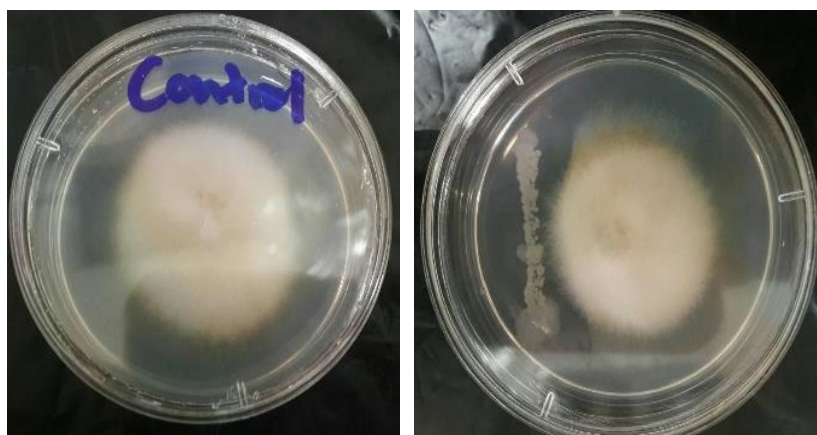
รูปที่ 29 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต B5B15



รูปที่ 30 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต C4B25



รูปที่ 31 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต G1B100



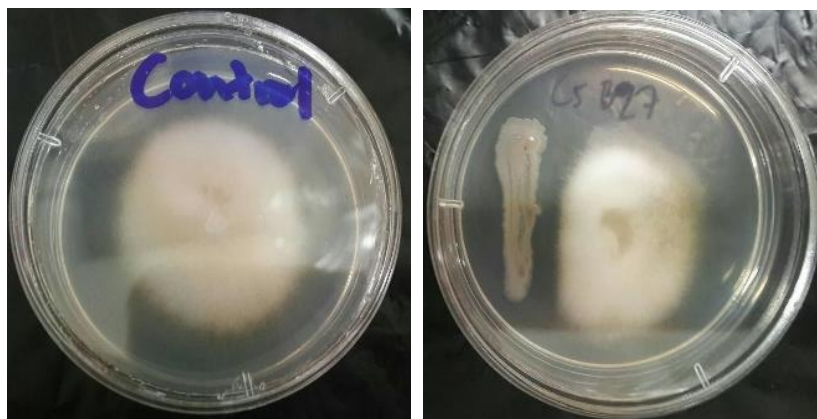
รูปที่ 32 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A2B2



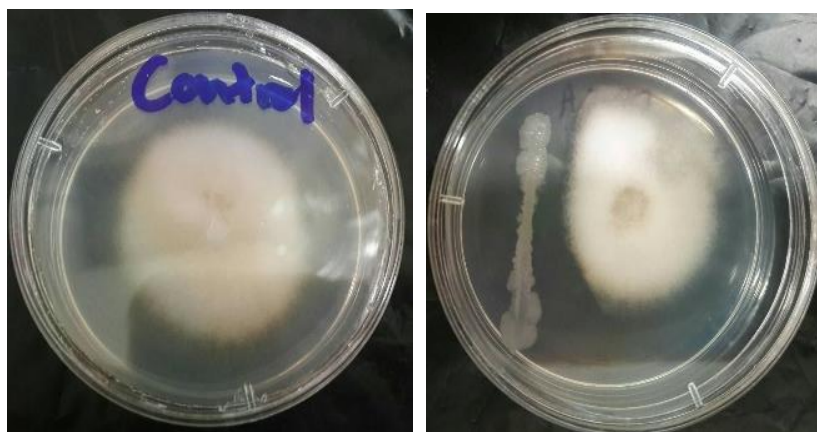
รูปที่ 33 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A4NB4



รูปที่ 34 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A4B4



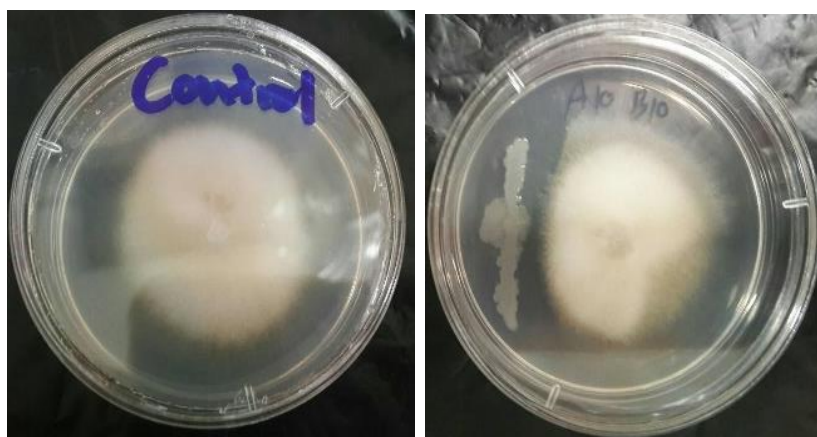
รูปที่ 35 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต C5B27



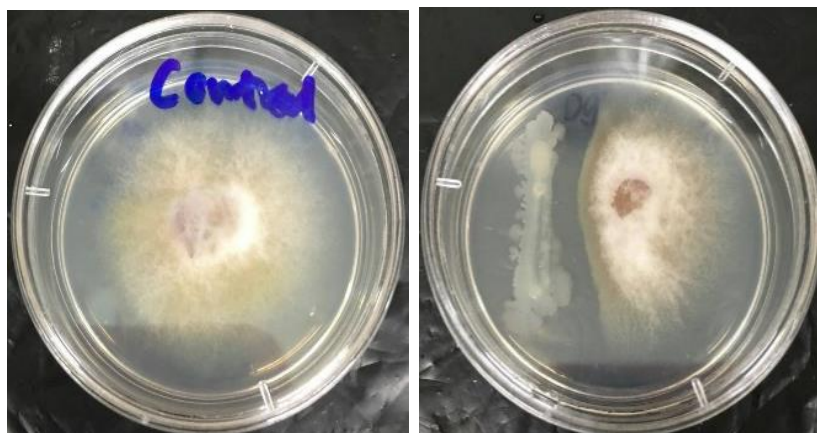
รูปที่ 36 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A7B7



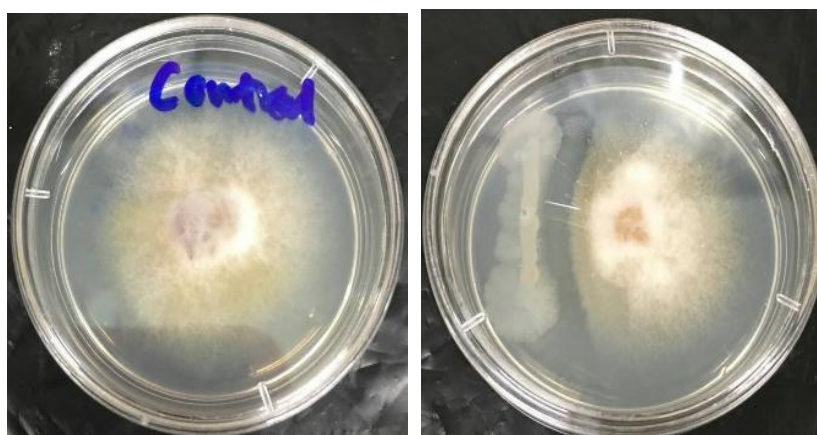
รูปที่ 37 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต G6B106



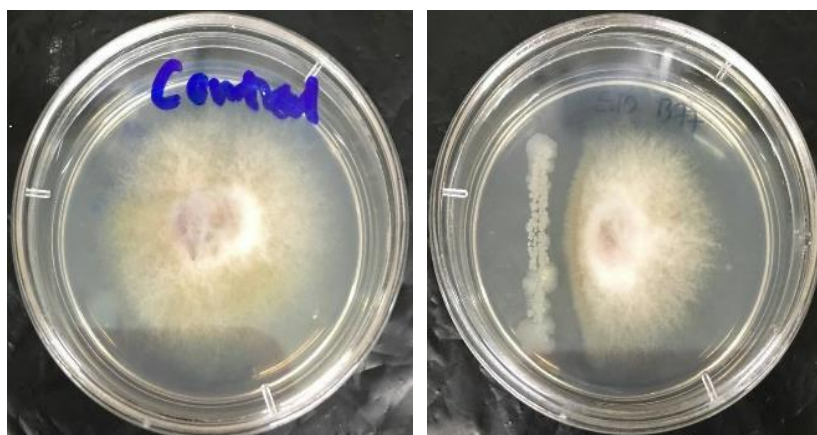
รูปที่ 38 การยับยั้ง *F. proliferatum* ด้วยไอโซเลต A10B10



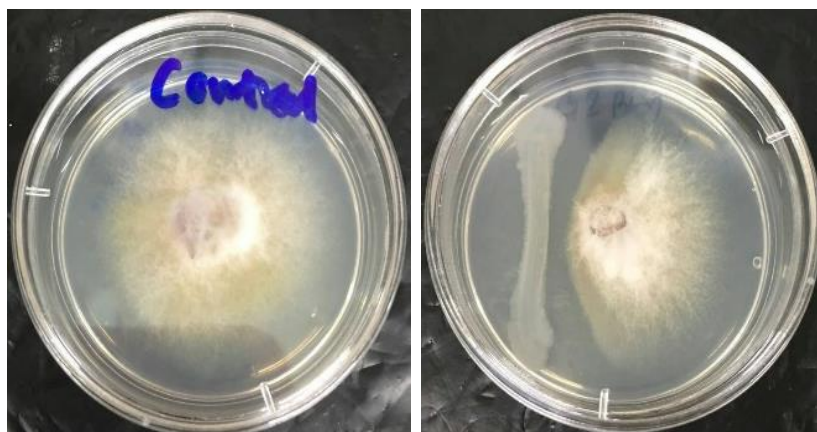
รูปที่ 39 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต D9B56



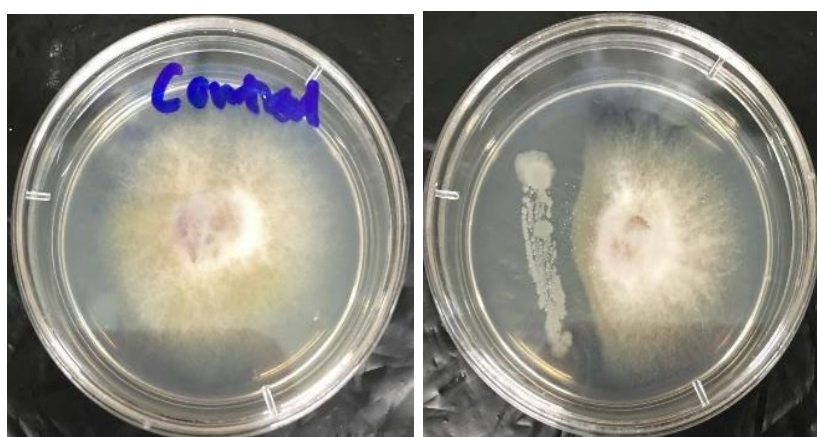
รูปที่ 40 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต E7B71



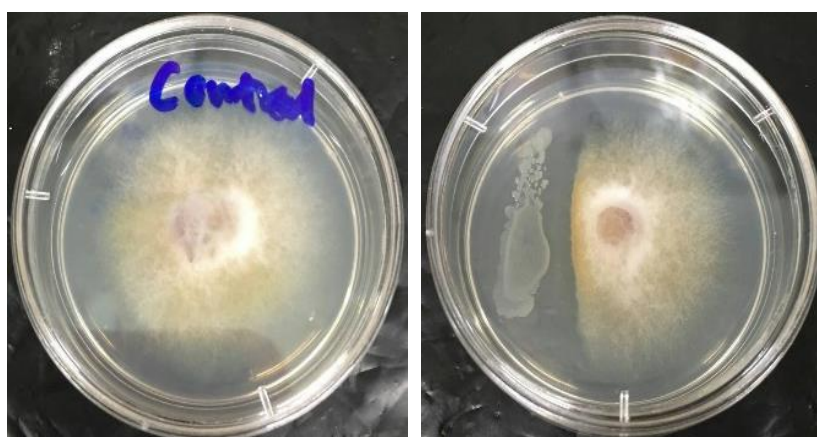
รูปที่ 41 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต E10B77



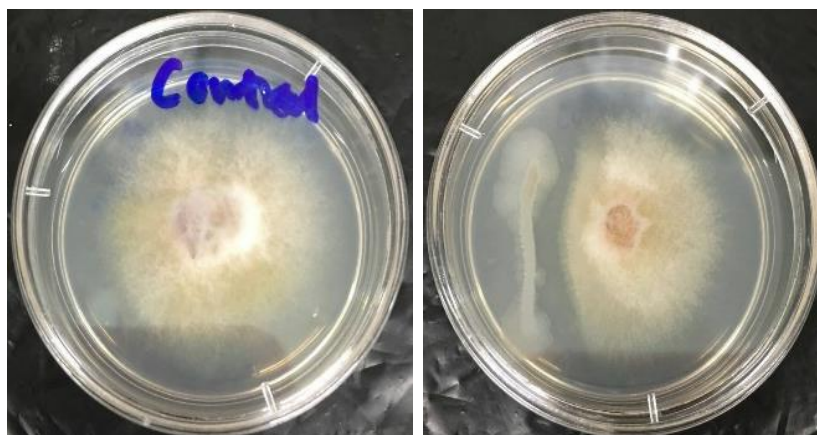
รูปที่ 42 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต G2B101



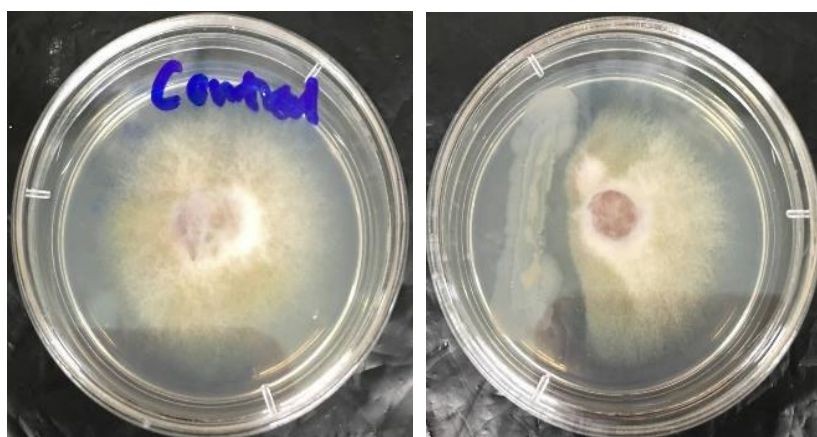
รูปที่ 43 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A5B5



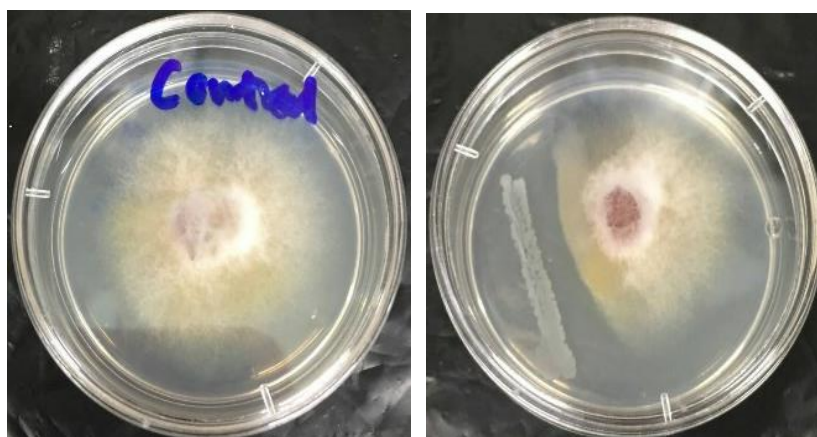
รูปที่ 44 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต B5B15



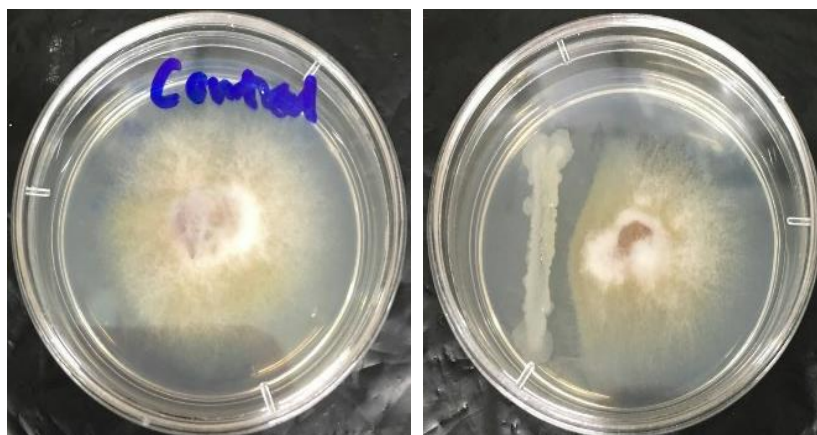
รูปที่ 45 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต C4B25



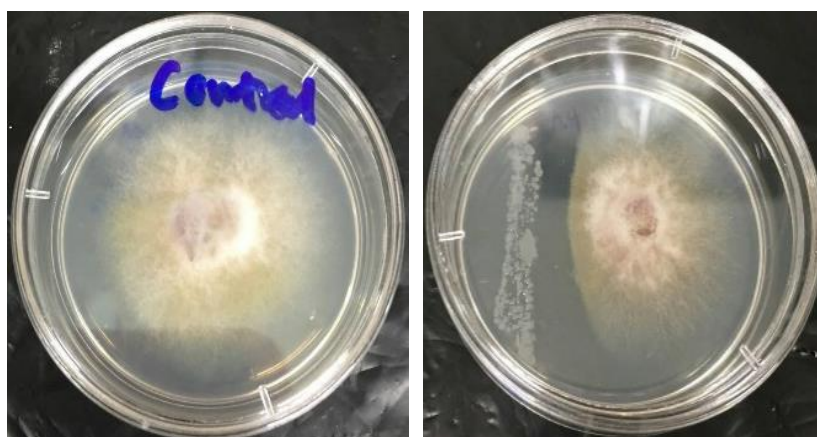
รูปที่ 46 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต G1B100



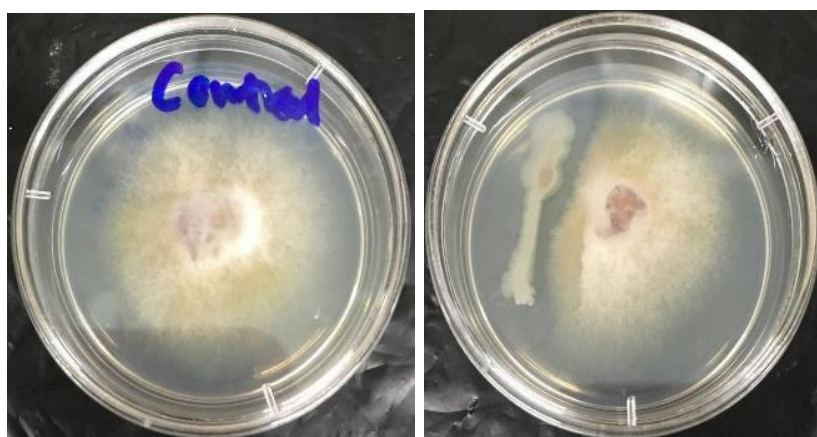
รูปที่ 47 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A2B2



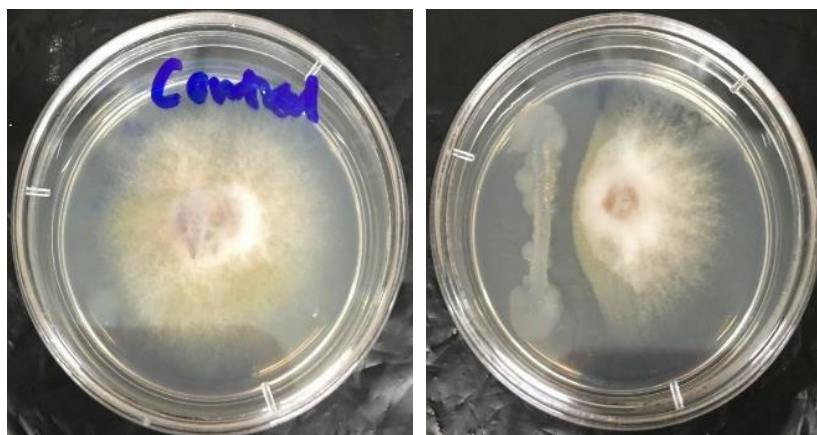
รูปที่ 48 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A4NB4



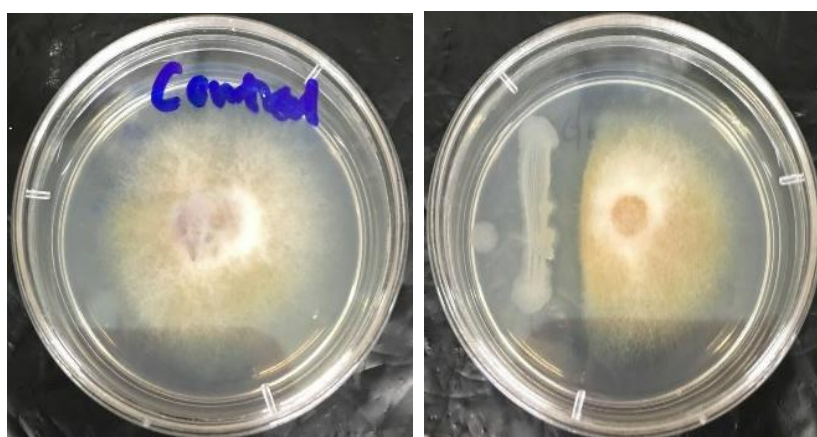
รูปที่ 49 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A4B4



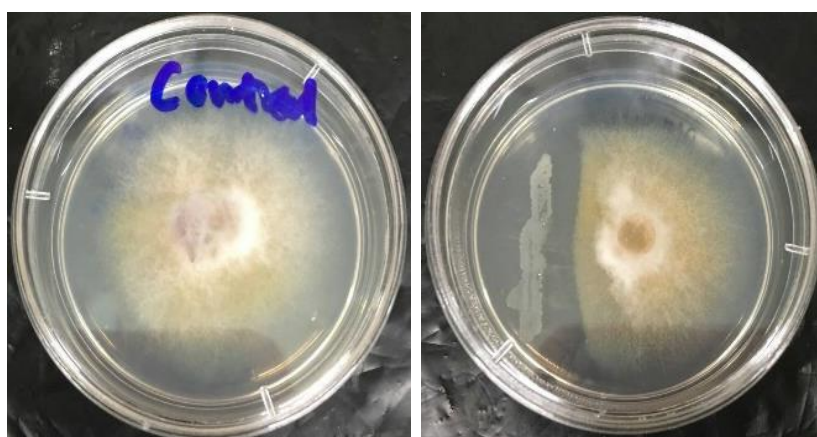
รูปที่ 50 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต C5B27



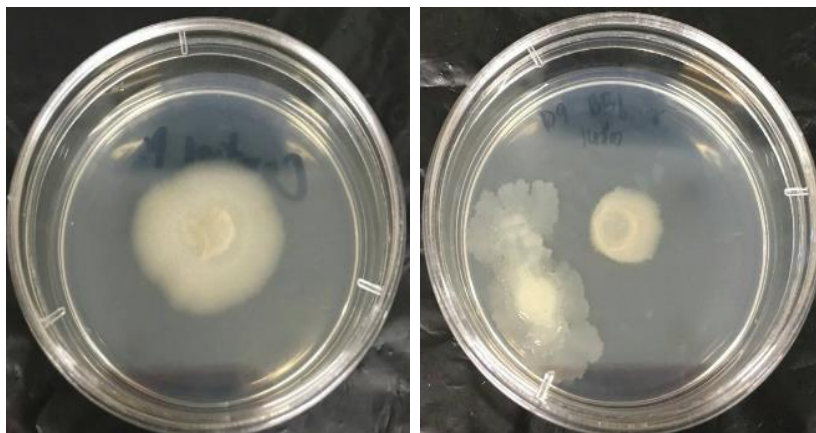
รูปที่ 51 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A7B7



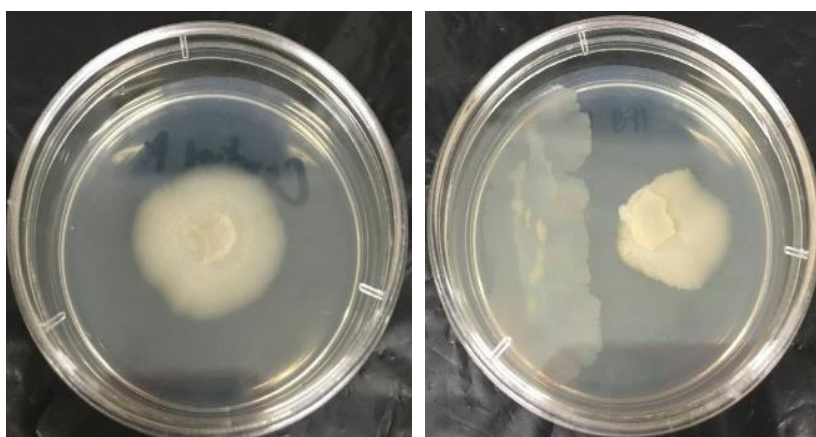
รูปที่ 52 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต G6B106



รูปที่ 53 การยับยั้ง *F. moniliforme* ด้วยไอโซเลต A10B10



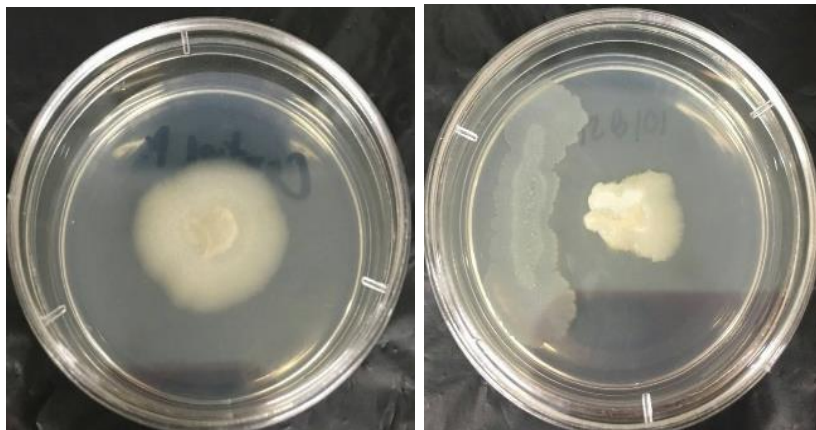
รูปที่ 54 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต D9B56



รูปที่ 55 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต E7B71



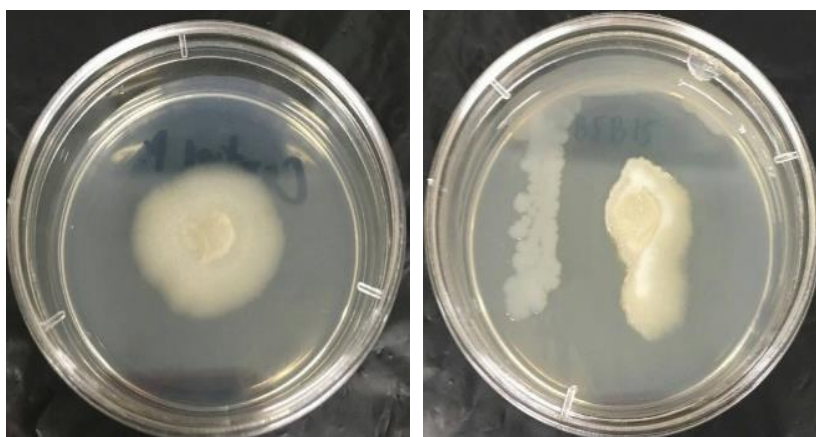
รูปที่ 56 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต E10B77



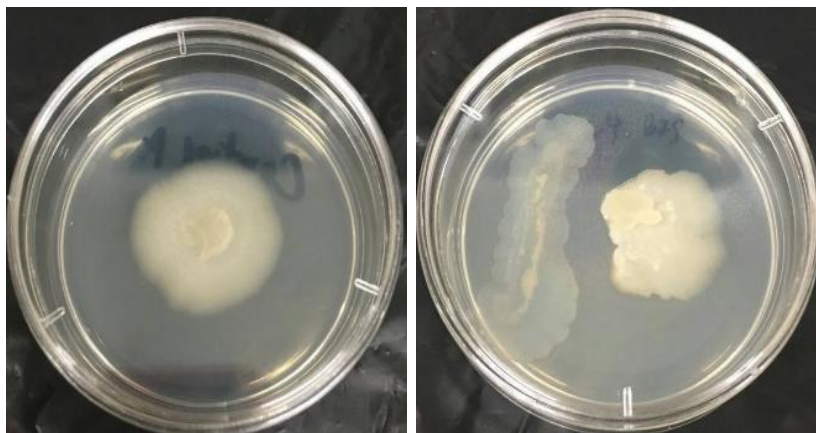
รูปที่ 57 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต G2B101



รูปที่ 58 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต A5B5



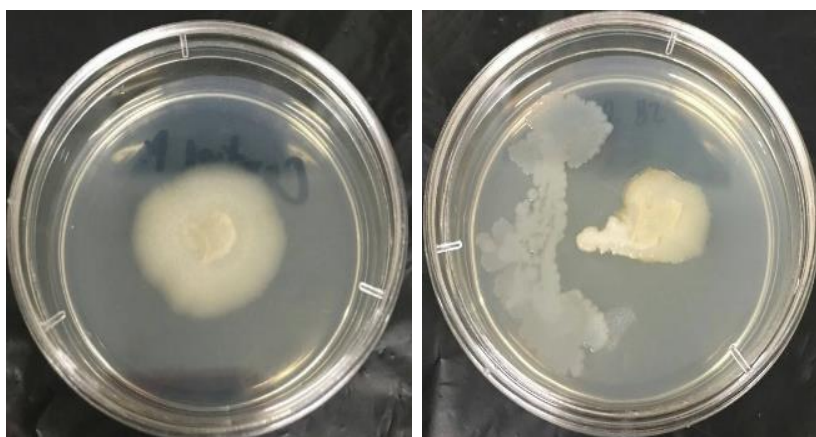
รูปที่ 59 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต B5B15



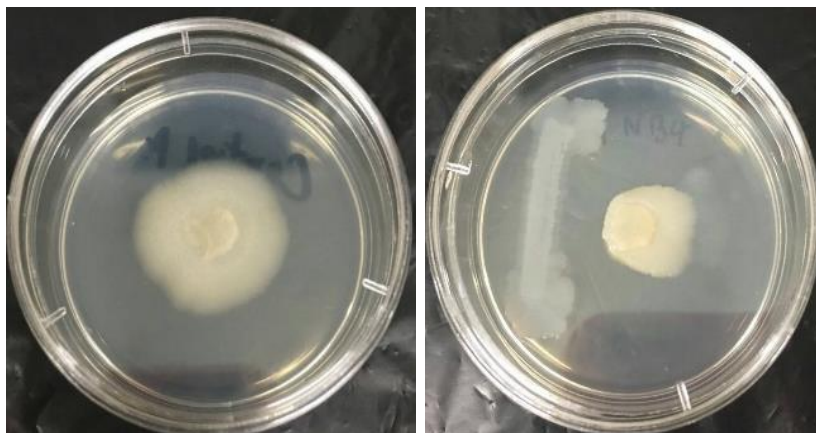
รูปที่ 60 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไฮโซเลต C4B25



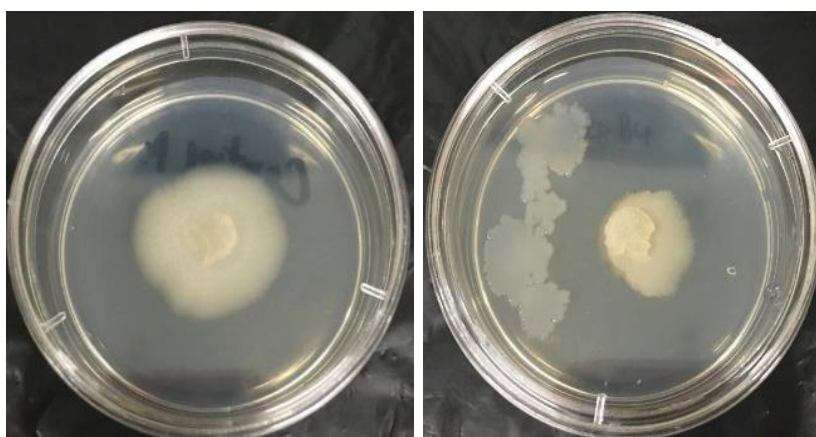
รูปที่ 61 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไฮโซเลต G1B100



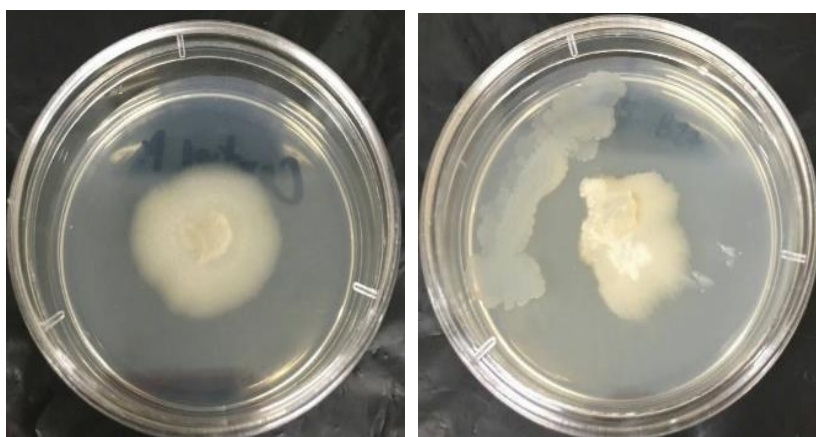
รูปที่ 62 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไฮโซเลต A2B2



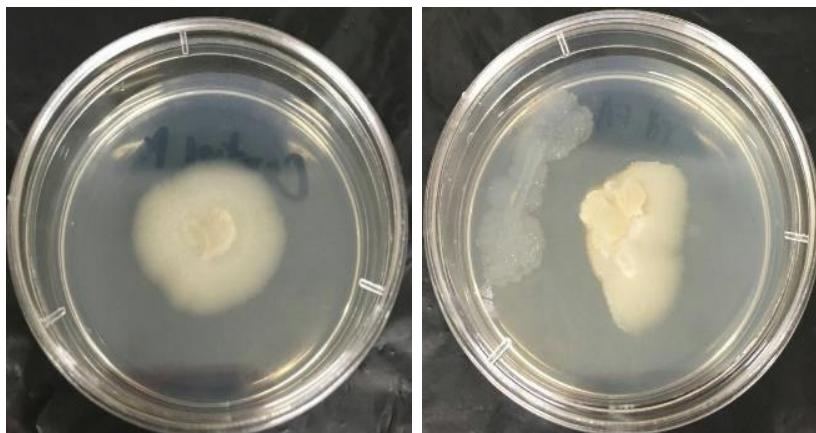
รูปที่ 63 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต A4NB4



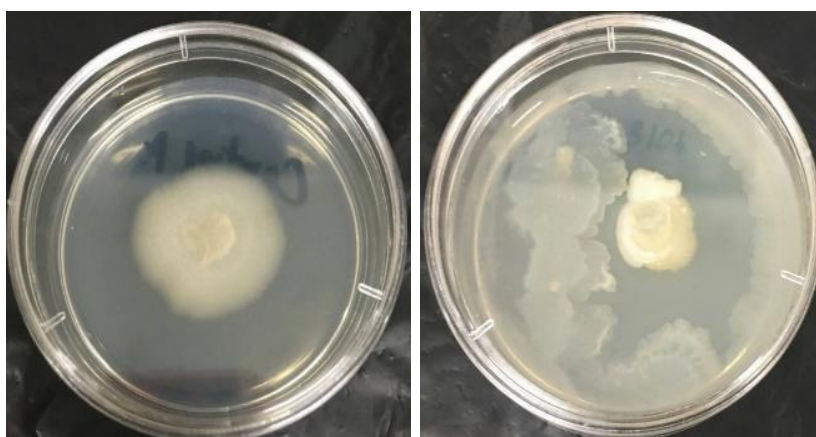
รูปที่ 64 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต A4B4



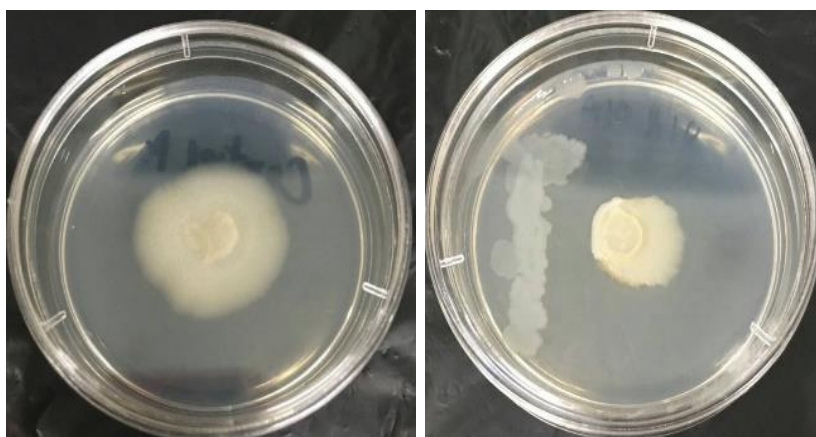
รูปที่ 65 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต C5B27



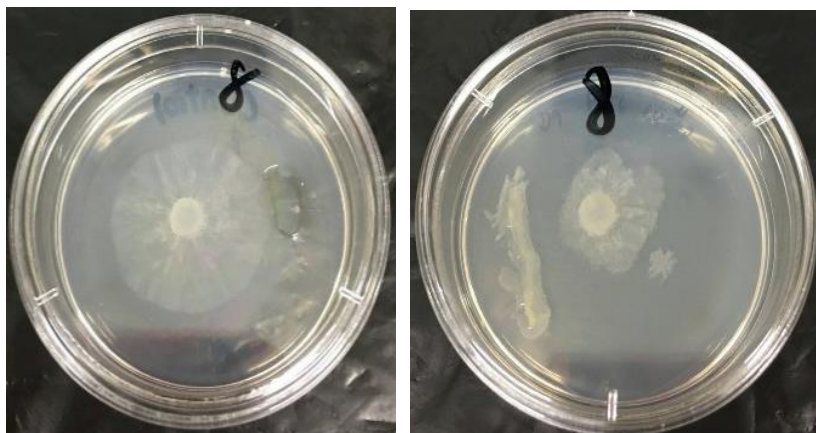
รูปที่ 66 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต A7B7



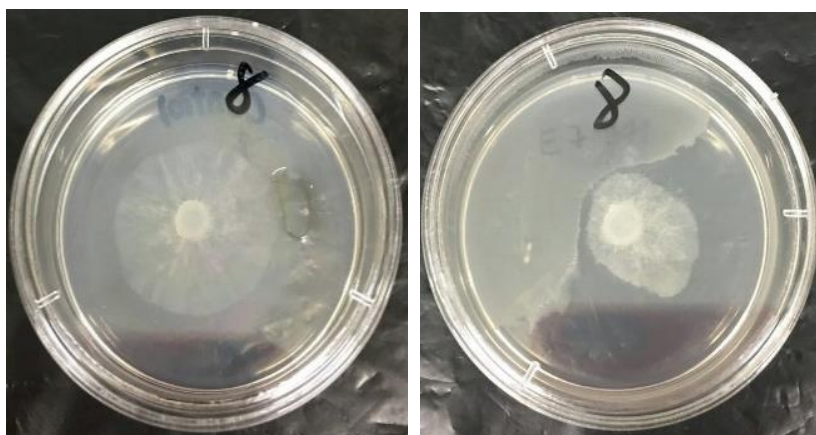
รูปที่ 67 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต G6B106



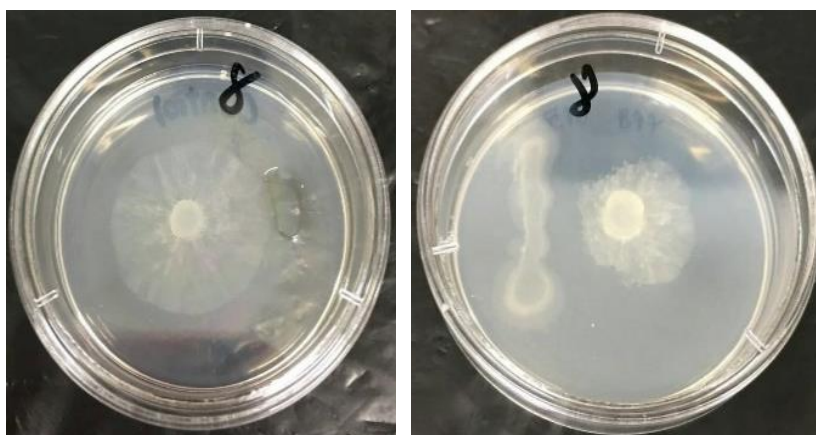
รูปที่ 68 การยับยั้ง *A. furcatum* ด้วยไอโซเลต A10B10



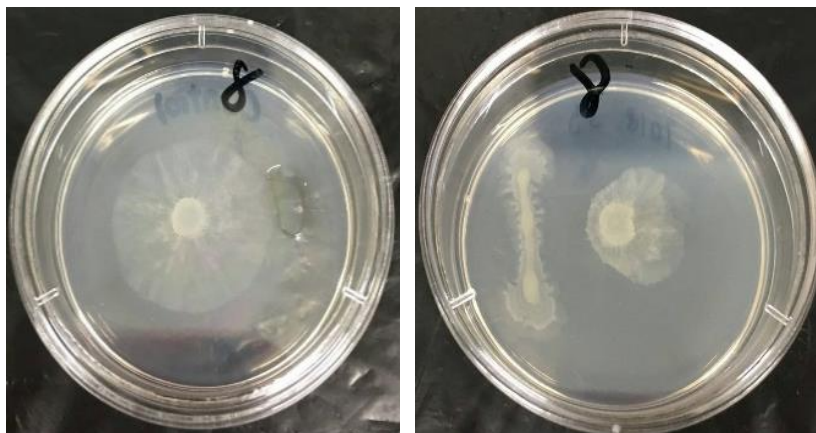
รูปที่ 69 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต D9B56



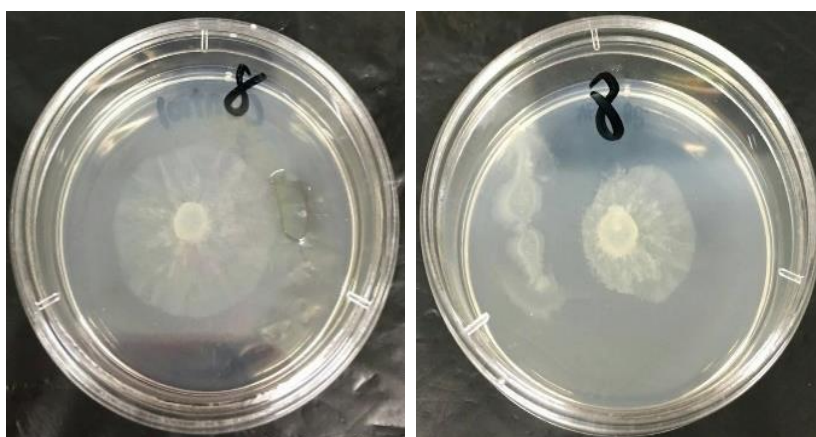
รูปที่ 70 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต E7B71



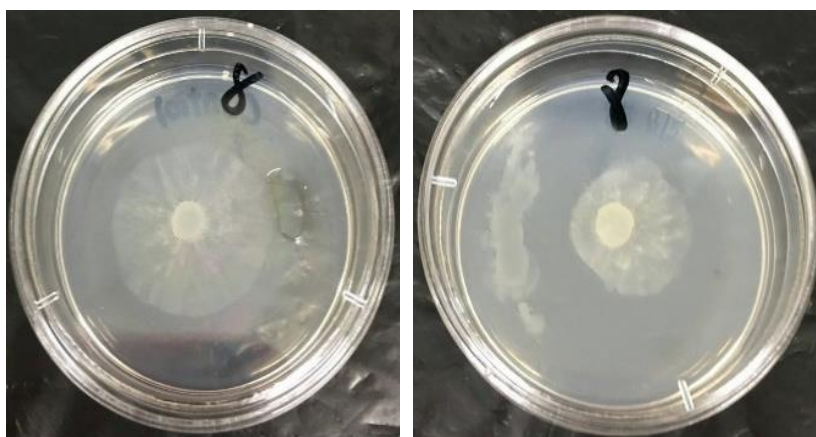
รูปที่ 71 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต E10B77



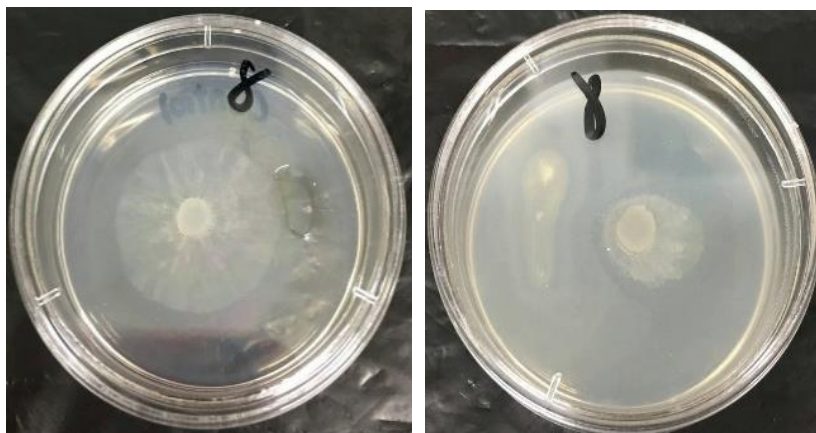
รูปที่ 72 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต G2B101



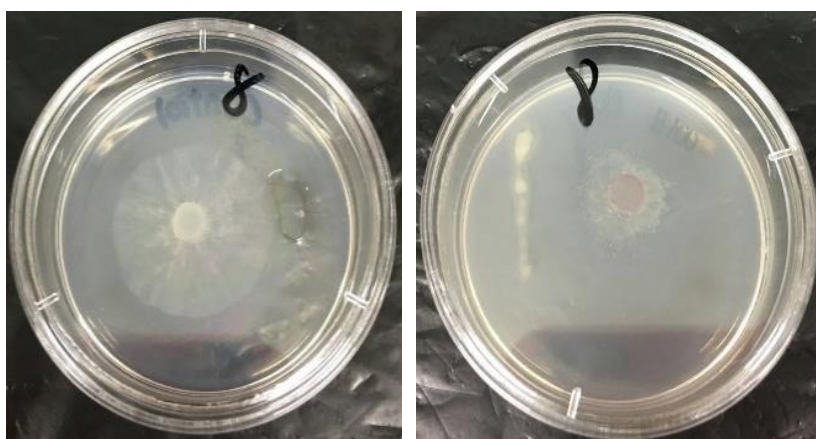
รูปที่ 73 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A5B5



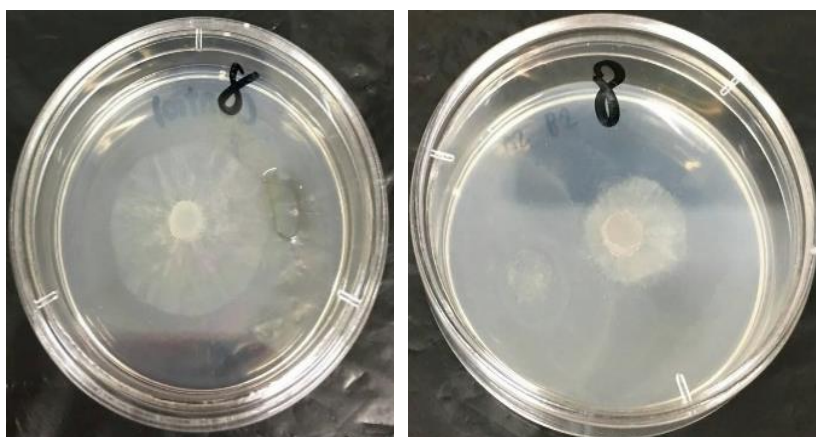
รูปที่ 74 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต B5B15



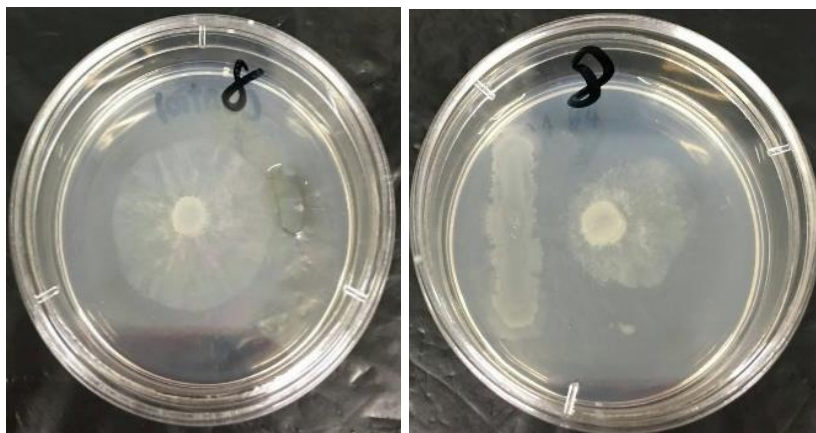
รูปที่ 75 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต C4B25



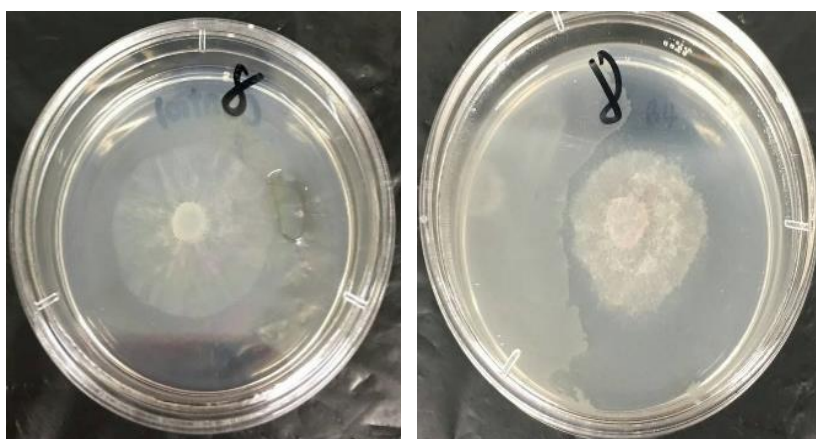
รูปที่ 76 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต G1B100



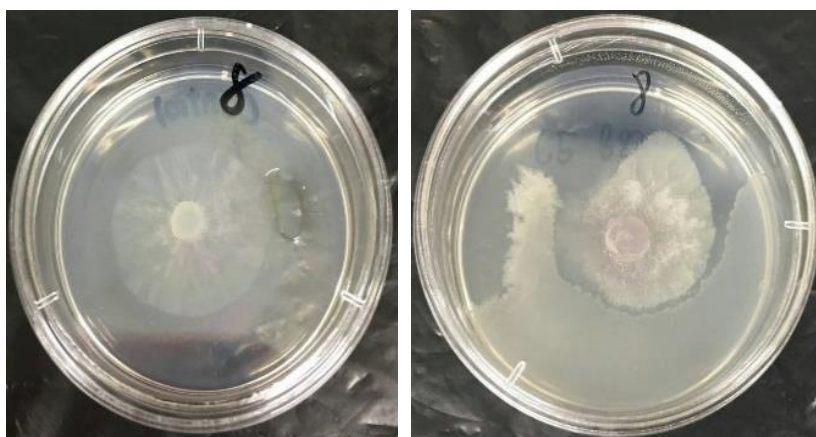
รูปที่ 77 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A2B2



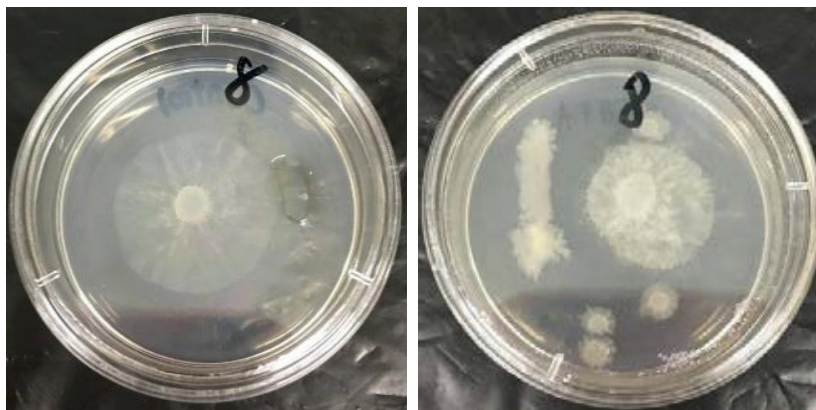
รูปที่ 78 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A4NB4



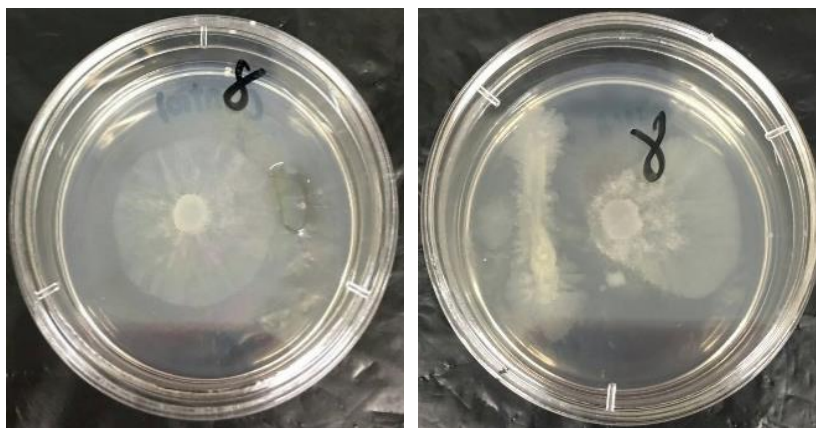
รูปที่ 79 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A4B4



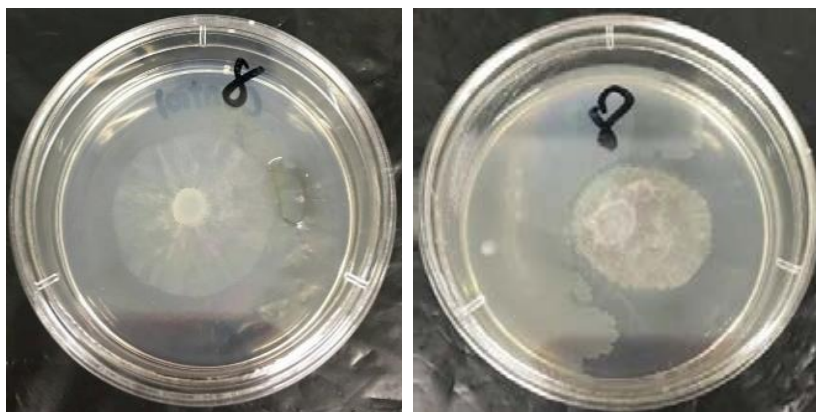
รูปที่ 80 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต C5B27



รูปที่ 81 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A7B7



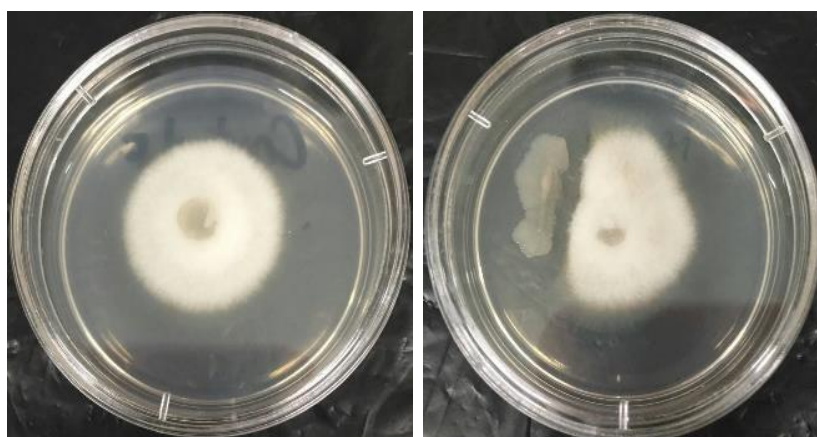
รูปที่ 82 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต G6B106



รูปที่ 83 การยับยั้ง *P. palmivora* ด้วยไอโซเลต A10B10



รูปที่ 84 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต D9B56



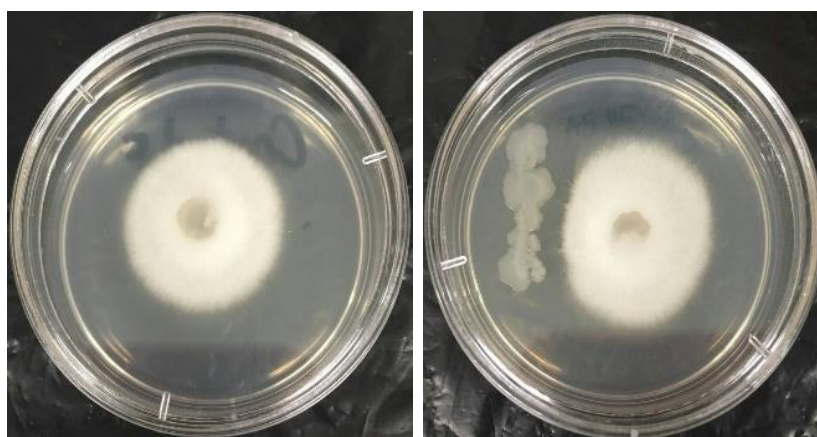
รูปที่ 85 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต E7B71



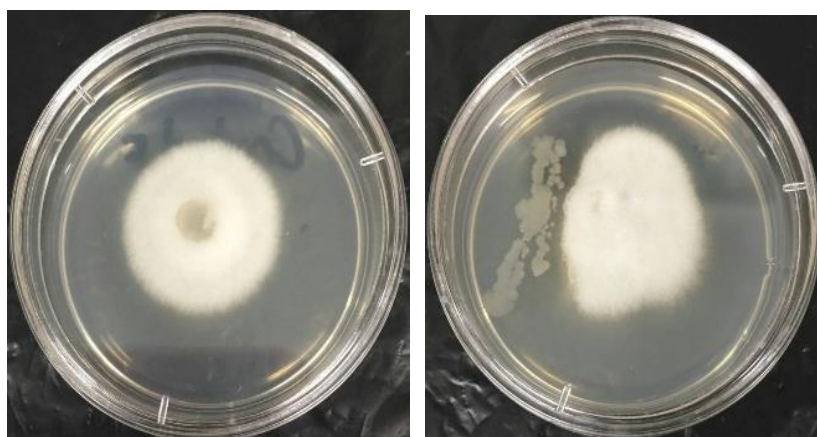
รูปที่ 86 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต E10B77



รูปที่ 87 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต G2B101



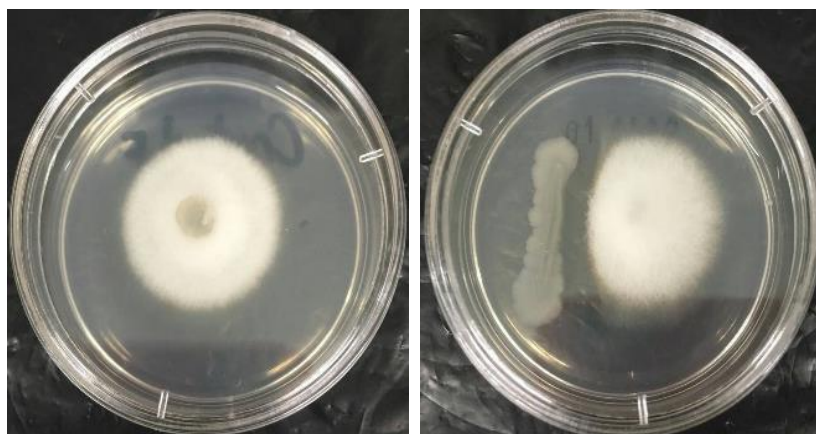
รูปที่ 88 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A5B5



รูปที่ 89 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต B5B15



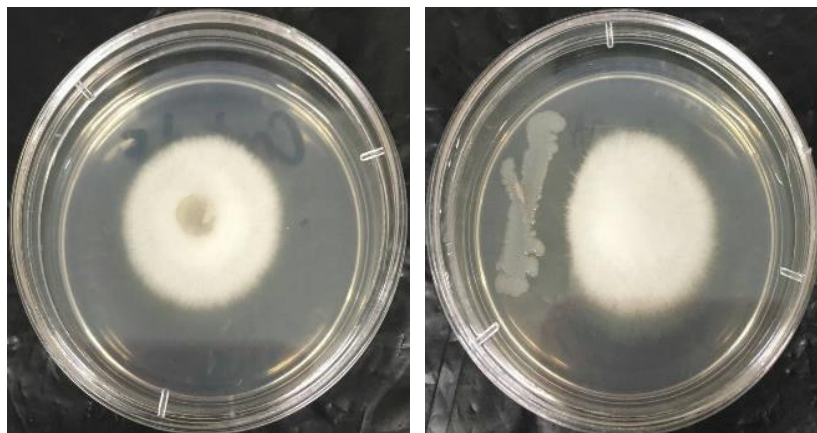
รูปที่ 90 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต C4B25



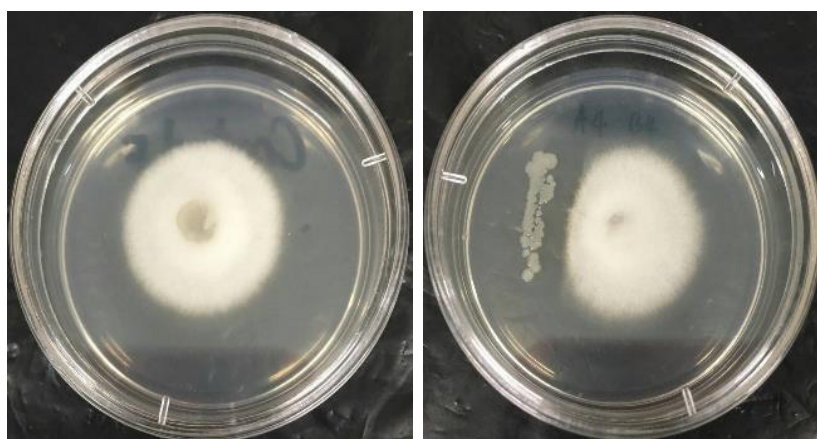
รูปที่ 91 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต G1B100



รูปที่ 92 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A2B2



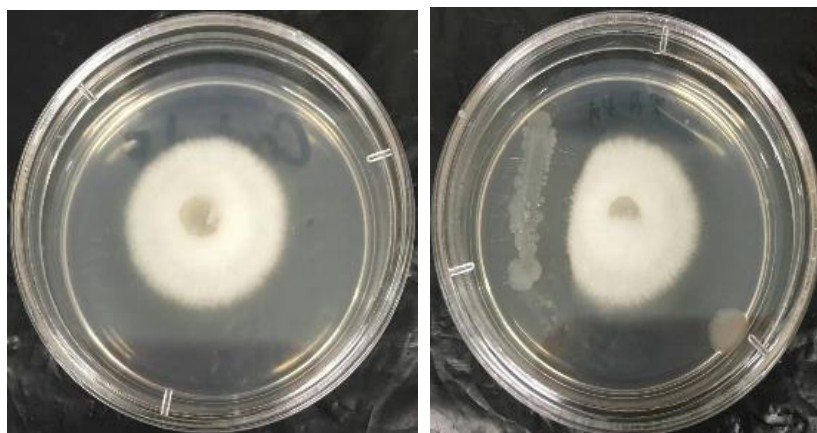
รูปที่ 93 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A4NB4



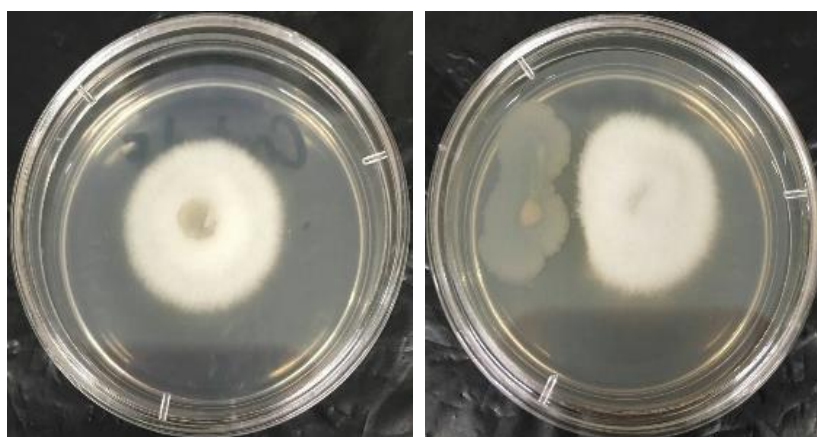
รูปที่ 94 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A4B4



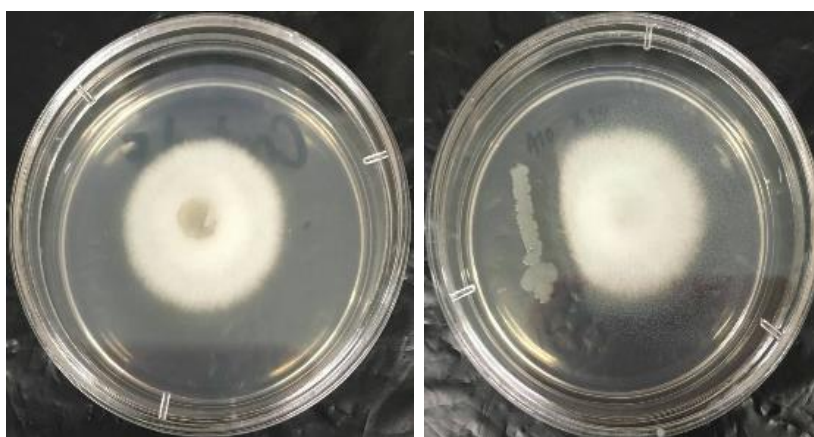
รูปที่ 95 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต C5B27



รูปที่ 96 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A7B7



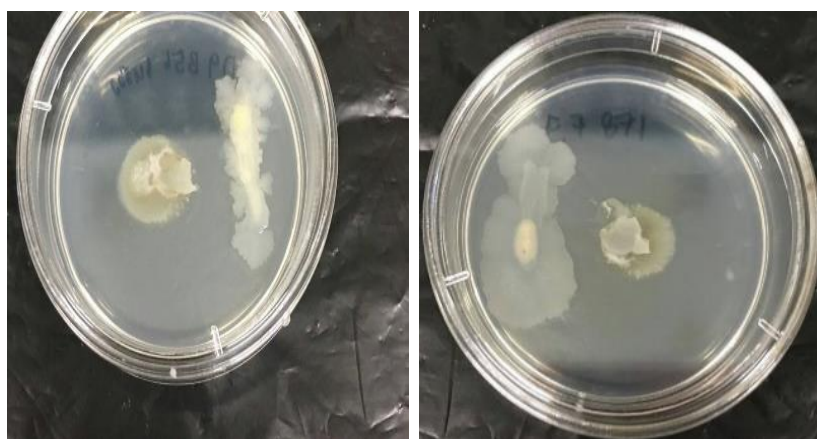
รูปที่ 97 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต G6B106



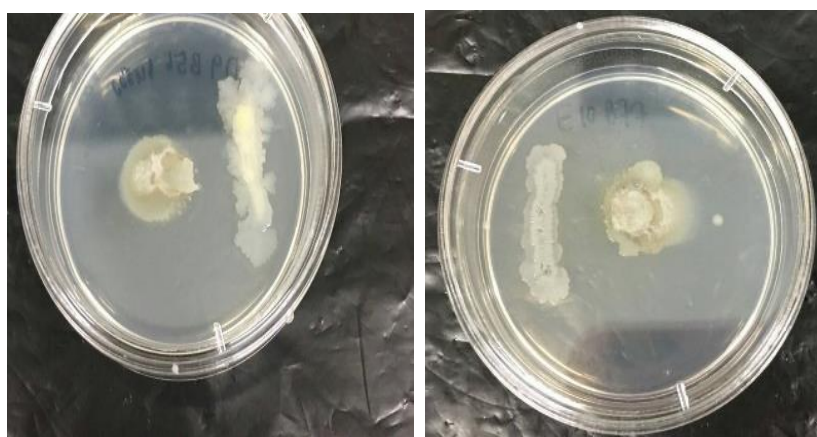
รูปที่ 98 การยับยั้ง *F. solani* ด้วยไอโซเลต A10B10



รูปที่ 99 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต D9B56



รูปที่ 100 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต E7B71



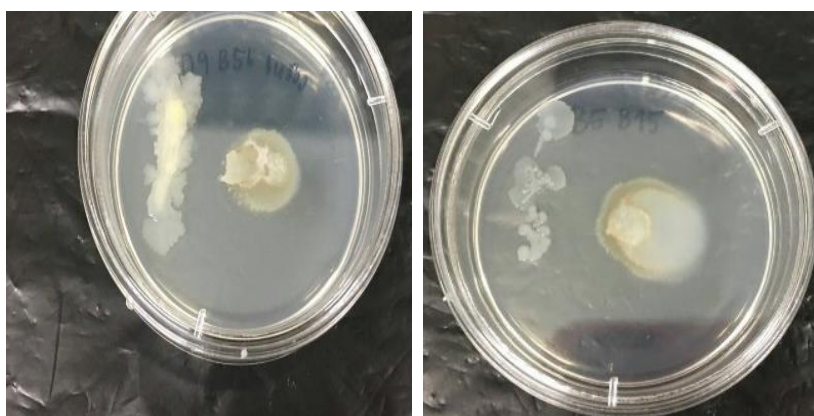
รูปที่ 101 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต E10B77



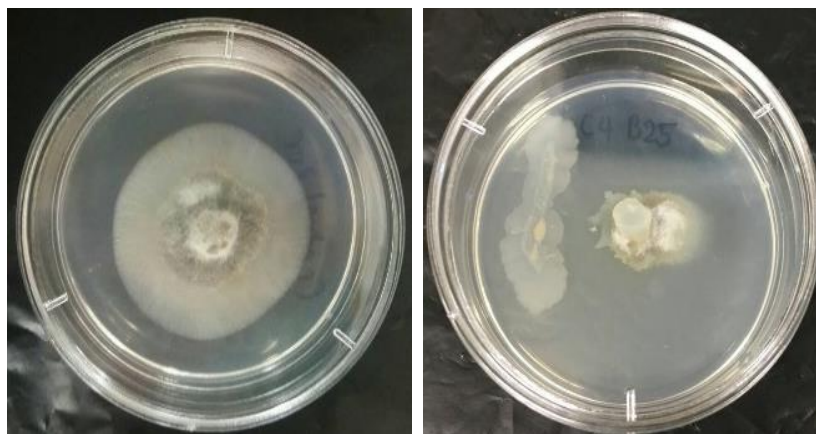
รูปที่ 102 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต G2B101



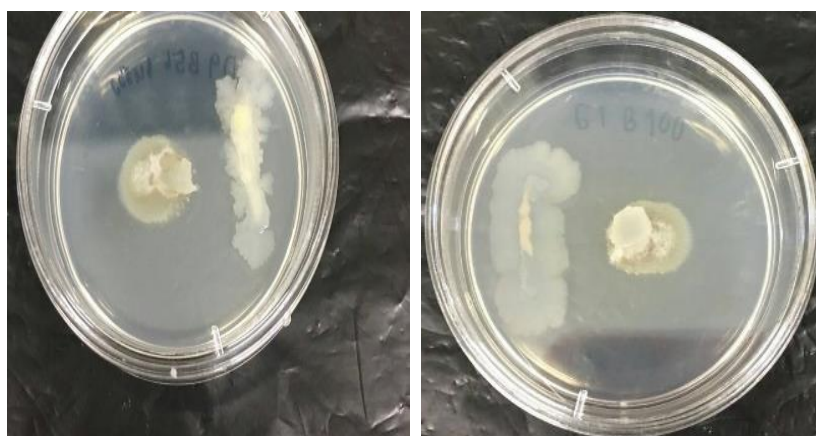
รูปที่ 103 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A5B5



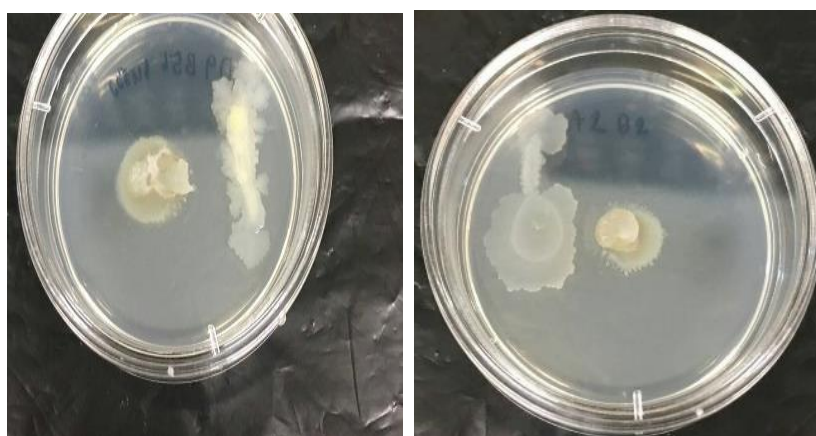
รูปที่ 104 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต B5B15



รูปที่ 105 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต C4B25



รูปที่ 106 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต G1B100



รูปที่ 107 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A2B2



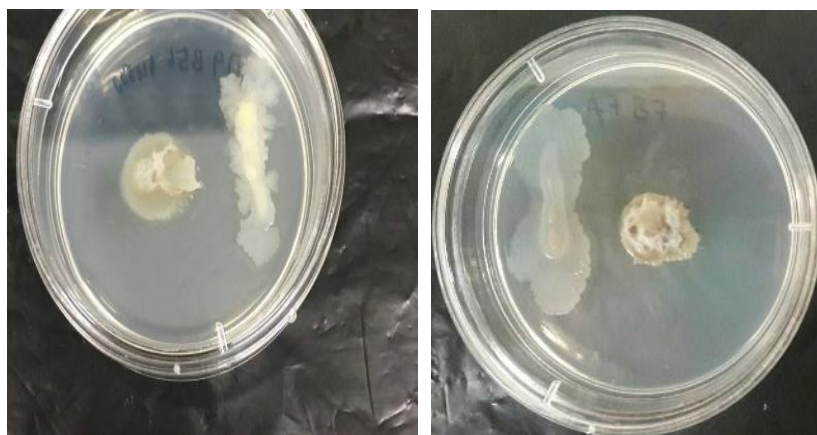
รูปที่ 108 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A4NB4



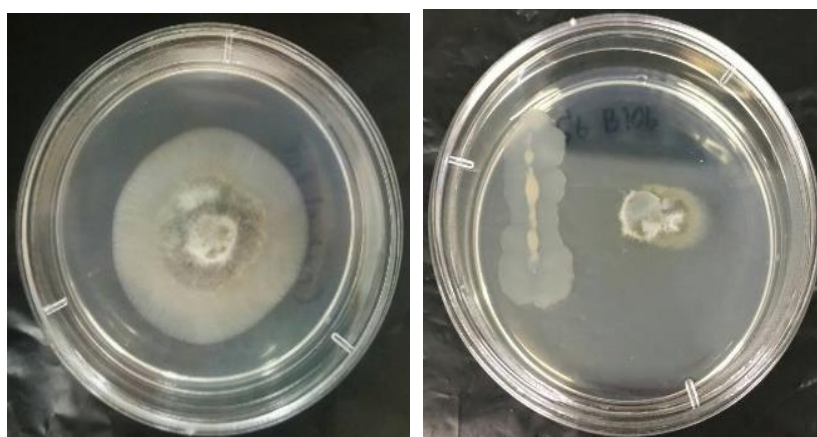
รูปที่ 109 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A4B4



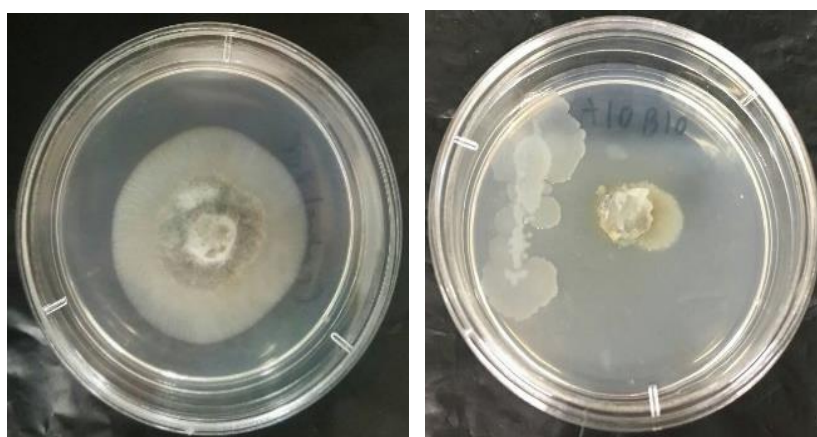
รูปที่ 110 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต C5B27



รูปที่ 111 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A7B7



รูปที่ 112 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต G6B106



รูปที่ 113 การยับยั้ง *P. oryzae* ด้วยไอโซเลต A10B10

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราทั้งหมดโดยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต

รา ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา						
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>A. furcatum</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. oryzae</i>
D9B56	27.03%	22.87%	27.91%	45.83%	34.48%	12.54%	37.93%
E7B71	10.81%	20.11%	20.93%	12.50%	34.48%	27.11%	48.28%
E10B77	24.32%	9.09%	25.58%	41.67%	31.03%	24.20%	31.03%
G2B101	24.32%	22.87%	25.58%	29.17%	31.03%	21.28%	48.28%
A5B5	16.22%	20.11%	20.93%	16.67%	27.59%	15.45%	20.69%
B5B15	35.14%	20.11%	27.91%	37.50%	24.14%	12.54%	31.03%
C4B25	18.92%	39.39%	23.26%	12.50%	24.14%	21.28%	31.03%
G1B100	13.51%	22.87%	23.26%	37.50%	24.14%	18.37%	48.28%
A2B2	21.62%	14.60%	20.93%	8.33%	20.69%	9.62%	55.17%
A4NB4	18.92%	28.37%	23.26%	33.33%	20.69%	12.54%	41.38%
A4B4	21.62%	14.60%	25.58%	25.00%	13.79%	18.37%	34.48%
C5B27	18.92%	22.87%	25.58%	4.17%	13.79%	27.11%	41.38%
A7B7	18.92%	22.87%	25.58%	20.83%	10.34%	21.28%	48.28%
G6B106	35.14%	17.36%	30.23%	45.83%	6.90%	15.45%	37.93%
A10B10	27.03%	11.85%	18.60%	33.33%	6.90%	15.45%	58.62%

จากตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตในราแต่ละชนิด พบว่า *C. gloeosporioides* ถูกยับยั้งโดยไอโซเลต B5B15 และไอโซเลต G6B106 ได้มากที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 35.14% ไอโซเลตที่ยับยั้งได้รองลงมา คือ D9B56 และ A10B10 โดยสามารถยับยั้งได้ 27.03% ส่วนไอโซเลต E10B77 และไอโซเลต G2B101 สามารถยับยั้งได้เป็นอันดับที่ 3 ซึ่งยับยั้งได้ 24.32% ในการยับยั้ง *F. proliferatum* พบว่าไอโซเลตที่ยับยั้งได้มากที่สุด คือ C4B25 โดยสามารถ

ยับยั้งได้ถึง 39.39% รองลงมาเป็นไอโซเลต A4NB4 ซึ่งยับยั้งได้ 28.37% และไอโซเลตที่ยับยั้งได้ 22.87% ได้แก่ D9B56, G2B101, G1B100, C5B27 และ A7B7 การยับยั้ง *F. moniliforme* พบว่า ไอโซเลต G6B106 สามารถยับยั้งได้ 30.23% ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ยับยั้งได้มากที่สุด ไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต B5B15 สามารถยับยั้งได้ 27.91% ส่วนไอโซเลต E10B77, G2B101, A4B4, C5B27 และ A7B7 สามารถยับยั้งได้ 25.58% เพอร์เซ็นต์การยับยั้ง *A. furcatum* โดยไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต G6B106 สามารถยับยั้งได้ถึง 45.83%, ไอโซเลต E10B77 ยับยั้งได้ 41.67% และไอโซเลต B5B15 และไอโซเลต G1B100 ยับยั้งได้ 37.50% ในการยับยั้ง *P. palmivora* พบว่า ไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต E7B71 สามารถยับยั้งได้มากที่สุด รองลงมาเป็นไอโซเลต E10B77 และไอโซเลต G2B101 และลำดับถัดมาเป็นไอโซเลต A5B5 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง คือ 34.48, 31.03 และ 27.59% ตามลำดับ ใน *F. solani* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยไอโซเลต E7B71 และไอโซเลต C5B27 เป็น 27.11% เพอร์เซ็นต์ การยับยั้งโดยไอโซเลต E10B77 เป็น 24.20% และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยไอโซเลต G2B101, C4B25 และ A7B7 เป็น 27.28% ส่วนใน *P. oryzae* พบว่า ไอโซเลต A10B10 เป็นไอโซเลตที่ยับยั้งได้มากที่สุดโดยสามารถยับยั้งได้มากถึง 58.62% ไอโซเลต A2B2 สามารถยับยั้งได้รองลงมา 55.17% และไอโซเลตที่ยับยั้งได้ 48.28% มีไอโซเลต E7B71, G2B101, G1B100 และ A7B7

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต ซึ่งพิจารณาจากจำนวนชนิดของราที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งได้ โดยในราแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงเป็น 3 อันดับแรก พบว่า ไอโซเลต G2B101 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 6 ชนิด รองลงเป็นไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต E10B77 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง 5 ชนิด ไอโซเลต A7B7 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง 4 ชนิด ไอโซเลต E7B71, B5B15, G1B100, C5B27 และ G6B106 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง 3 ชนิด ส่วนไอโซเลต C4B25 และไอโซเลต A10B10 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง 2 ชนิด และไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่สูงเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ไอโซเลต A5B5, A2B2, A4NB4 และ A4B4

จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราแต่ละชนิดที่ก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต และจำนวนชนิดของราที่แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตสามารถยับยั้งได้ พบว่า ไอโซเลต E10B77 เป็นหนึ่งในไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ค่อนข้างสูง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคพืชสูง

เป็น 3 อันดับแรก ในรา 5 ชนิด ถึงแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ได้ค่อนข้างต่ำ
 ดังนั้นจึงได้นำไอโซเลต E10B77 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียในขั้นต่อไป

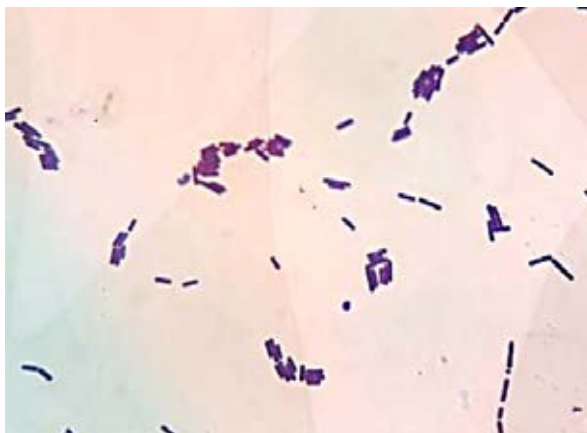
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลต E10B77 มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม สีครีมขุ่น ผิวหน้าเรียบวาว ดังแสดงในรูปที่ 114 จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมสีแกรม แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 115 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ไอโซเลต E10B77 ย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน และจากการตรวจสอบการสร้างสปอร์พบว่า ไอโซเลต E10B77 สามารถสร้างสปอร์ได้ ดังรูปที่ 116



รูปที่ 114 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต E10B77 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 10 ชั่วโมง



รูปที่ 115 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไอโซเลต E10B77 จากการย้อมสีแกรม (1,000X)

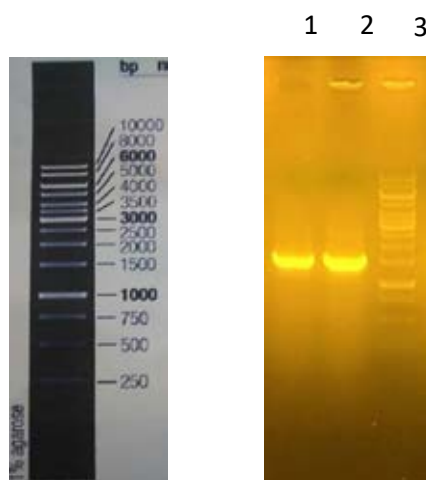


รูปที่ 116 การย้อมเอนโดสปอร์ของไอโซเลต E10B77 (1,000X)

4.3.2 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต E10B77 ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ 27F และ 1492R แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 117 ซึ่งจากรูปจะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส เมื่อเทียบกับ DNA มาตรฐาน หลังจากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แสดงดังในภาคผนวก ค1 โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,538 เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อระบุเอกลักษณ์ของไอโซเลต E10B77 พบว่า ไอโซเลต E10B77 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* K1 (EU056572.2), *Bacillus siamensis* RS8 (LR535796.1) และ *Bacillus*

amyloliquefaciens Z17-2 (MK271286.1) ถึง 99.93% (ภาคผนวก ค2) จึงสามารถระบุได้เบื้องต้นว่า ไอโซเลต E10B77 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus subtilis* species complex



รูปที่ 117 ผลิตรหัส PCR ของไอโซเลต E10B77 จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

โดยช่องที่ 1 และ 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของไอโซเลต E10B77, ช่องที่ 3 คือ 1kb DNA Ladder

รูปด้านซ้ายคือ ขนาดของชิ้นส่วน DNA ใน 1kb DNA Ladder

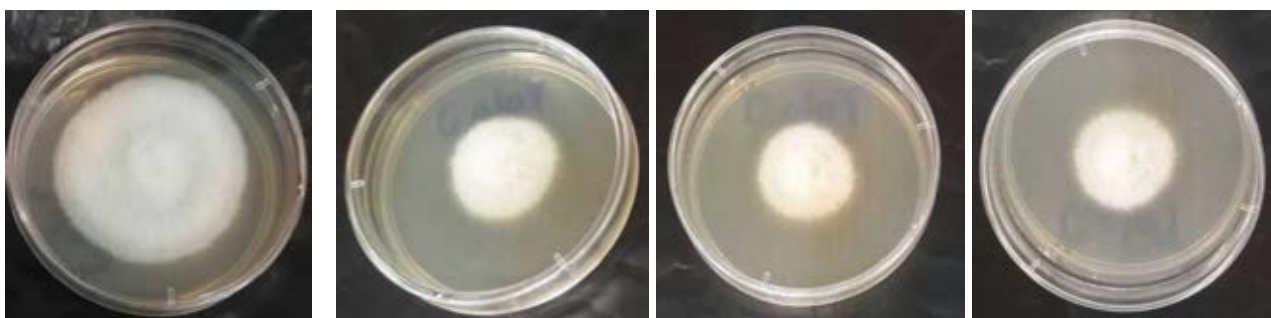
4.4 การทดสอบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแข็ง

จากการนำส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้วมาผสมกับอาหารแข็ง PDA ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 5 มิลลิลิตรผสมกับอาหารแข็ง 5 มิลลิลิตร และทดสอบกับ *P. palmivora* ใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 5 มิลลิลิตรผสมกับอาหารแข็ง V8 5 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ในอาหารแข็ง จากนั้นเจาะชิ้นส่วนของราที่ใช้ในการทดสอบมาวางไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นสังเกตบริเวณยับยั้งของราที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรา หน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช พบว่า เมื่อผสมส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 กับอาหารแข็ง สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 51.95% รองลงมาเป็น *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 34.62%, *A. furcatum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 29.82%, *F. solani* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 27.66%, *P. palmivora* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 21.14%, *C. gloeosporioides* มี

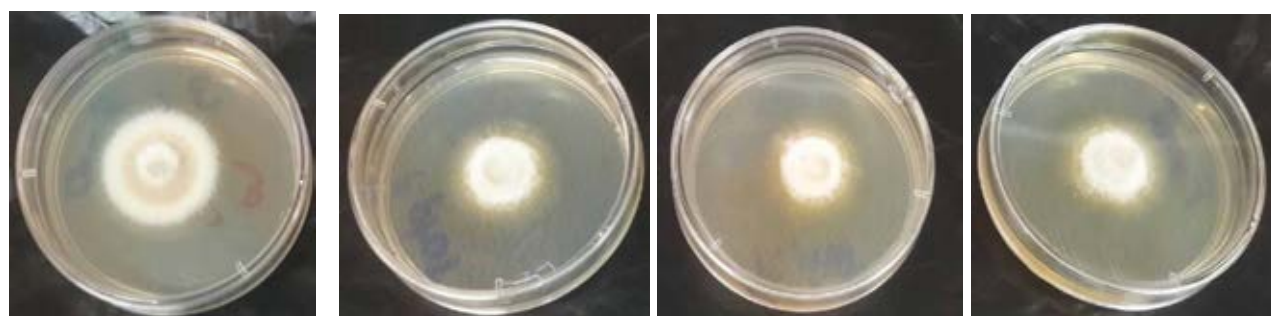
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 20.77% และมียับยั้ง *F. proliferatum* ได้น้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 12.77% ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และภาพการทดสอบการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้ว ผสมกับอาหารแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 118 – 124

ตารางที่ 4.9 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้ว มาผสมกับอาหารแข็ง

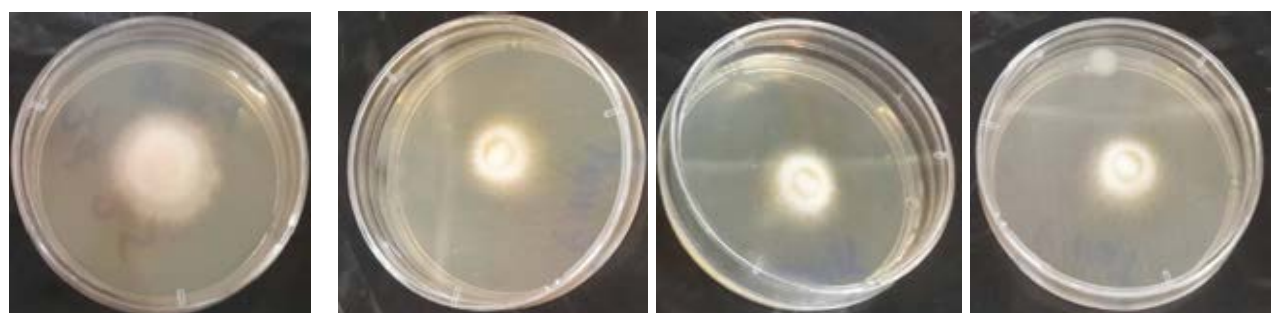
ราที่ใช้ในการทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรา (มิลลิเมตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
<i>C. gloeosporioides</i>	43.33±0.58	34.33±3.06	20.77%
<i>F. proliferatum</i>	31.33±0.58	27.33±0.58	12.77%
<i>F. moniliforme</i>	34.67±0.58	22.67±0.58	34.62%
<i>A. furcatum</i>	19.00±1.00	13.33±0.58	29.82%
<i>P. palmivora</i>	41.00±1.00	32.33±0.58	21.14%
<i>F. solani</i>	31.33±1.15	22.67±3.51	27.66%
<i>P. oryzae</i>	25.67±1.15	12.33±0.58	51.95%



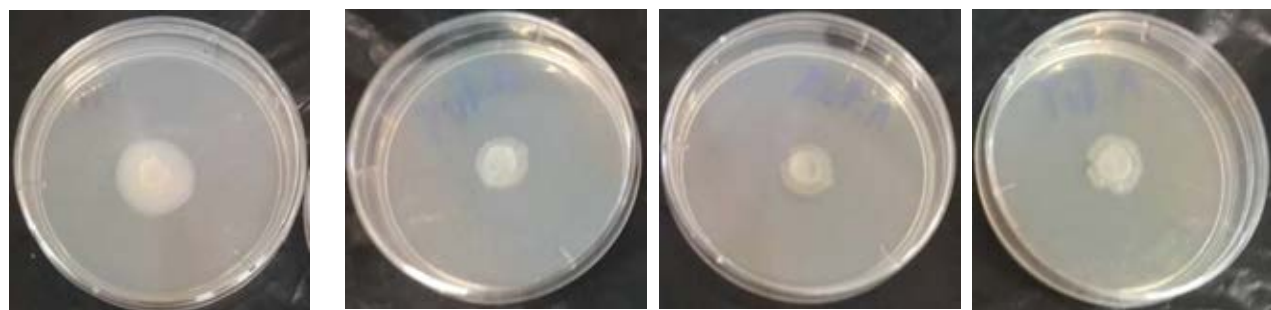
รูปที่ 118 การยับยั้ง *C. gloeosporioides* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



รูปที่ 119 การยับยั้ง *F. proliferatum* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



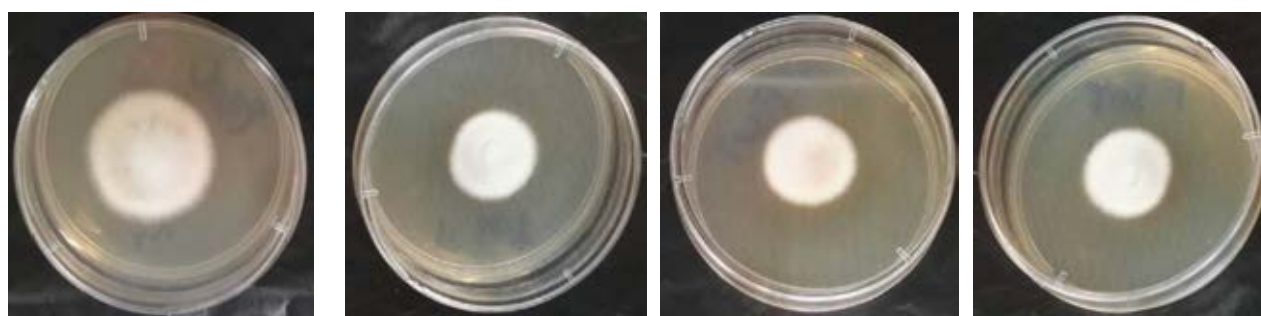
รูปที่ 120 การยับยั้ง *F. moniliforme* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



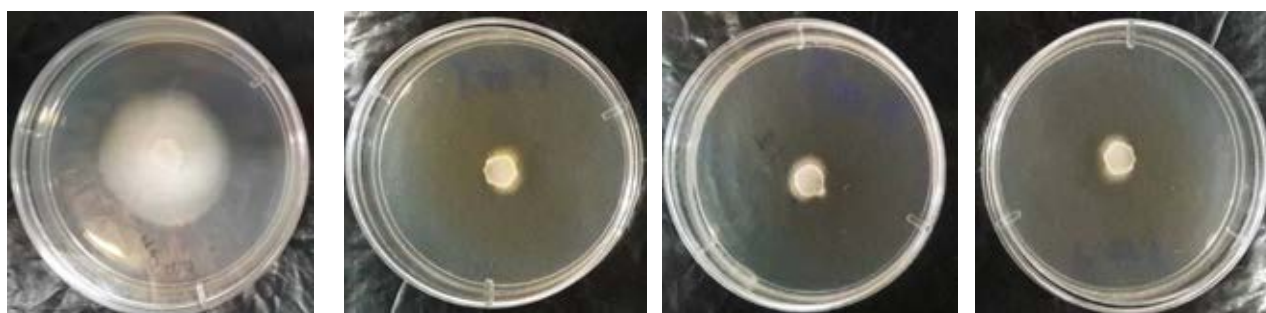
รูปที่ 121 การยับยั้ง *A. furcatum* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



รูปที่ 122 การยับยั้ง *P. palmivora* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



รูปที่ 123 การยับยั้ง *F. solani* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77



รูปที่ 124 การยับยั้ง *P. oryzae* โดยใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชจากตัวอย่างดินทั้ง 13 ตัวอย่าง พบว่า ได้แบคทีเรียทั้งหมด 141 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่เจริญปกติ ที่เมื่อบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีขนาดโคโลนีประมาณ 0.1 ถึง 0.5 เซนติเมตร และได้แบคทีเรียที่เจริญเร็ว 66 ไอโซเลต ที่เมื่อบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้ว มีขนาดโคโลนีใหญ่เต็มเพลท จากนั้นเมื่อนำแบคทีเรียไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ผลปรากฏว่ามีแบคทีเรียเพียง 87 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ จึงนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชต่อไป

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียทั้ง 87 ไอโซเลตในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ซึ่งได้แก่ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *P. oryzae* และ *P. palmivora* พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 15 ไอโซเลตเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้ จึงได้มีการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช และจำนวนชนิดของราที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งได้ ซึ่งได้เลือกแบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลตจาก 15 ไอโซเลต เพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียต่อไป

งานวิจัยมากมายได้ประสบความสำเร็จในการแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณรากพืช ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Guevara-Avendano และคณะ สามารถแยกแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ได้จากดินบริเวณรากต้นอะโวคาโด ซึ่งเมื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แล้ว พบว่าใกล้เคียงกับ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium euwallaceae*, *Graphium euwallaceae* และ *Graphium* sp ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครอยดตาย (*Fusarium dieback*) ของต้นอะโวคาโดได้ และยังพบว่ามีไอโซเลตที่ถูกระบุเอกลักษณ์ว่าใกล้เคียงกับ *Bacillus mycoides* ที่

สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora cinnamomi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่า (*Phytophthora root rot*) ของต้นอะโวคาโดได้อีกด้วย (Guevara-Avendano และคณะ, 2018)

ไอโซเลต E10B77 เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชค่อนข้างสูง อีกทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชสูงเป็น 3 อันดับแรก ในรา 6 ชนิด คือ *A. furcatum*, *P. palmivora*, *P. oryzae*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *F. solani* โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเท่ากับ 41.67, 31.03, 31.03, 25.58, 24.32, และ 24.20% ตามลำดับ แต่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ที่ค่อนข้างต่ำ โดยยับยั้งได้เพียง 9.09% ดังนั้นจึงได้เลือกนำไอโซเลตนี้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้แก่ การศึกษาลักษณะโคโลนี การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมสีแกรม และการตรวจสอบการสร้างสปอร์ พบว่าไอโซเลต E10B77 มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม สีครีมขุ่น ผิวหน้าเรียบ วาว มีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

จากการเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต E10B77 โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส คือ 27F และ 1492R แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส เมื่อเทียบกับเอ็นเอมาตรฐาน จากการระบุเอกลักษณ์ของไอโซเลต E10B77 โดยส่งดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่า ไอโซเลต E10B77 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* K1 (EU056572.2), *B. siamensis* RS8 (LR535796.1) และ *B. amyloliquefaciens* Z17-2 (MK271286.1) ถึง 99.93% ซึ่งถึงแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงสูงมาก แต่เป็นที่ทราบกันว่าแบคทีเรียเหล่านี้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ *B. subtilis* species complex นั้น ไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ด้วยการหาลำดับบริเวณ 16S rDNA เพียงอย่างเดียว และจำเป็นต้องใช้ลำดับของ house keeping ยีนหลายโลคัส (multilocus sequence analysis) มาช่วยในการจัดจำแนก (Fan และคณะ, 2017a; Fritze, 2004) ดังนั้นในเบื้องต้นจึงบอกได้เพียงว่า ไอโซเลต E10B77 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. subtilis* species complex เท่านั้น

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วใช้ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 ที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหารแข็ง ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า ส่วนน้ำใสของไอโซเลต E10B77 สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 51.95% สามารถยับยั้ง *F. moniliforme*, *A. furcatum*, *F. solani*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* ได้รองลงมา ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 34.62, 29.82, 27.66, 21.14 และ 20.77% ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *F. proliferatum* ได้น้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 12.77% จากการทดสอบจึงบอกได้ว่า ไอโซเลต E10B77 มีความสามารถในการสร้างสารต้านราและสามารถหลั่งสารต้านราที่สร้างขึ้นออกมานอกเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถระบุได้ว่า สารต้านราที่ไอโซเลต E10B77 สร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ เป็นสารประเภทใด มีกลไกในการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชอย่างไร จึงต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการเปรียบเทียบความสามารถของไอโซเลต E10B77 ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช โดยวิธีการชีดและวิธีการใช้ส่วนน้ำใสที่กรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแข็ง กับงานวิจัยของ ชนวรรณ เต็มทรัพย์อนันต์ (2562) ซึ่งได้เลือกไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต G6B106 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ผลปรากฏว่า ไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต G6B106 มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชโดยวิธีการชีดได้ดีกว่าไอโซเลต E10B77 เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช และจำนวนชนิดของราที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งได้ และจากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชโดยการใช้ส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหารแข็งของไอโซเลตทั้งสามไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต D9B56 มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้มากที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลต G6B106 และไอโซเลต E10B77 อย่างไรก็ตามถึงแม้ไอโซเลต E10B77 จะมีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้น้อยกว่าไอโซเลต D9B56 และไอโซเลต G6B106 แต่ไอโซเลต E10B77 มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ได้มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงที่สุด ในการทดสอบโดยวิธีการชีด และมีความสามารถในการยับยั้ง *F. moniliforme* ได้มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงที่สุด ในการทดสอบโดยการใช้ส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับอาหารแข็ง ดังนั้น ไอโซเลต E10B77 จึงถือว่าเป็นอีกหนึ่งไอโซเลตที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้ และมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ค่อนข้างสูง จึงควรมีการศึกษาต่อไป

งานวิจัยก่อนหน้านี้ มีการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้โดยใช้เทคนิคแตกต่างกันไป เช่น วิธีการฉีด ตัวอย่างเช่น *B. amyloliquifaciens* Y1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium graminearum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคยอดไหม้ในข้าว (head blight) ได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้มากกว่า 50% และวิธีนี้ยังสามารถใช้ทดสอบกับกรณีที่แบคทีเรียผลิตสารยับยั้งในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้อีกด้วย (Jamal และคณะ, 2017) อีกเทคนิคที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งได้ในเชิงปริมาณมากขึ้น เป็นการใช้น้ำใสของแบคทีเรียที่ผ่านการกรองแล้วมาผสมกับอาหารแห้งที่อุ่นไว้ ตัวอย่างเช่น การนำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วของ *B. amyloliquifaciens* CNU114001 ไปผสมกับอาหารแห้ง PDA แล้วทดสอบกับราโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Alternaria panax*, *B. cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Collectotrichum orbiculare*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia grisea* และ *Sclerotinia sclerotiorum* โดยการนำชิ้นส่วนของมาวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย พบว่าสามารถแสดงเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ละเอียดค่อนข้างสูง (Ji และคณะ, 2013)

งานวิจัยในครั้งนี้นี้พบว่า ไอโซเลต E10B77 มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้ทั้งวิธีการฉีด และวิธีการกรองผ่าน Millipore filter แล้วผสมกับอาหารแห้ง และให้ผลพบว่า ไอโซเลต E10B77 ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราออกมานอกเซลล์ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน และเนื่องจาก ไอโซเลต E10B77 อยู่ในกลุ่มของ *B. subtilis* species complex ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อการควบคุมทางชีวภาพสำหรับราที่ก่อโรคในพืชได้อย่างปลอดภัยต่อไป เพราะแบคทีเรียพวก *B. subtilis* จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ทราบว่าเป็นความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) (Sewalt และคณะ, 2016) แต่อย่างไรยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปว่า แบคทีเรียและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียนี้ผลิตขึ้นเป็นสารประเภทใด มีกลไกในการควบคุมอย่างไร เป็นพิษหรือส่งผลกระทบต่อพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรือไม่ หากไม่ส่งผลกระทบต่อพืชและสิ่งมีชีวิต และมีประสิทธิภาพในการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชได้ดีแล้ว จึงนำแบคทีเรียหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Amatulli, M.T., Spadaro, D., Gullino, M.L., Garibaldi, A. 2010. Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. Plant Pathology, 59(5), 839-844.
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., Bian, K. 2019. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. Microbiological Research, 218, 41-48.
- Chen, Y.L., Lee, C.C., Lin, Y.L., Yin, K.M., Ho, C.L., Liu, T. 2015. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. BMC Bioinformatics, 16 Suppl 18(Suppl 18), S13-S13.
- Connor, N., Sikorski, J., Rooney, A.P., Kopac, S., Koepfel, A.F., Burger, A., Cole, S.G., Perry, E.B., Krizanc, D., Field, N.C., Slaton, M., Cohan, F.M. 2010. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. Applied and Environmental Microbiology, 76(5), 1349-1358.
- Dunlap, C.A., Lueschow, S., Carrillo, D., Rooney, A.P. 2017. Screening of bacteria for antagonistic activity against phytopathogens of avocados. Plant Gene, 11, 17-22.
- Elad, Y., Freeman, S. 2002. Biological Control of Fungal Plant Pathogens. in: Agricultural Applications, (Ed.) F. Kempken, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 93-109.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., Borriss, R. 2017a. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. Frontiers in Microbiology, 8, 22.
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, Y. 2017b. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. Microbiological Research, 199, 89-97.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. Journal of Biotechnology, 285, 44-55.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, 94(11), 1245-1248.
- Guardado-Valdivia, L., Tovar-Perez, E., Chacon-Lopez, A., Lopez-Garcia, U., Gutierrez-Martinez, P., Stoll, A., Aguilera, S. 2018. Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose

- disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). Microbiological Research, 210, 26-32.
- Guevara-Avendano, E., Carrillo, J.D., Ndinga-Muniana, C., Moreno, K., Mendez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J.A., Eskalen, A., Reverchon, F. 2018. Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. Antonie Van Leeuwenhoek, 111(4), 563-572.
- Han, J.H., Shim, H., Shin, J.H., Kim, K.S. 2015. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in south korea. Plant Pathology Journal, 31(2), 165-175.
- Jamal, Q., Cho, J.Y., Moon, J.H., Kim, K.Y. 2017. Purification and antifungal characterization of Cyclo (D-Pro-L- Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 10, 141-147.
- Jeong, M.H., Lee, Y.S., Cho, J.Y., Ahn, Y.S., Moon, J.H., Hyun, H.N., Cha, G.S., Kim, K.Y. 2017. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. Microbial Pathogenesis, 110, 645-653.
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.-S., Yu, S.H. 2013. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. Mycobiology, 41(4), 234-242.
- Kamalakkannan, A., Mohan, Harish, S., Radjacommar, R., Amutha, Chitra, Karuppiyah. 2004. Biocontrol agents induce disease resistance in *Phyllanthus niruri* Linn against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathologia Mediterranea, 43(2), 187-194.
- Liew, W.P., Mohd-Redzwan, S. 2018. Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 60.
- Liu, P., Luo, L., Long, C.A. 2013. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. Biological Control, 67(2), 157-162.

- Liu, X.G., Gao, K.X., Kang, Z.S., He, B.L. 2007. Systemic resistance induced by biocontrol agents in plants and its biochemical and cytological mechanisms. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 18(8), 1861-1868.
- Marie-Alix. 2016. *Acremonium* spp. (online). ค้นหามาจาก <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/acremonium-spp>. 28 July 2018.
- Michasia Harris. 2557. *Colletotrichum gloeosporioides*. (online). ค้นหามาจาก https://wiki.bugwood.org/Colletotrichum_gloeosporioides. เมื่อวันที่ 16 ธันวาคม 2561.
- Nawaz, H.H., Nelly Rajofera, M.J., He, Q., Anam, U., Lin, C., Miao, W. 2018. Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 146, 33-42.
- Oo, M.M., Oh, S.K. 2016. Chilli anthracnose (*Colletotrichum spp.*) disease and its management approach. doi 10.7744/kjoas.20160018.
- Promwee, A., Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., Chamswarnng, C. 2017. Efficacy of indigenous *Trichoderma harzianum* in controlling *Phytophthora* leaf fall (*Phytophthora palmivora*) in Thai rubber trees. Journal of Plant Diseases and Protection, 124(1), 41-50.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M.B., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., Yoshinari, T. 2009. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. Food Control, 20(11), 1018-1024.
- Sayre, R.M. 1980. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. Journal of Nematology, 12(4), 260-270.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., Carrillo, R. 2016. The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. Industrial Biotechnology, 12(5), 295-302.
- Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M. 2018. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxicogenic *Aspergillus parasiticus*. Food Control, 89, 300-307.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology, 89(1), 92-99.
- Sunder, S., Singh, R., Dodan, D.S. 2014. Management of bakanae disease of rice caused by *Fusarium moniliforme*. Indian Journal of Agricultural Sciences, 84(2), 224-228.

- Tebit, K.E. 2017. Biological Control of Parasites. (online).
<https://www.intechopen.com/books/natural-remedies-in-the-fight-against-parasites/biological-control-of-parasites-2017-07>. 16 December 2018.
- Ulloa-Ogaz, A., Muñoz-Castellanos, L., Nevarez-Moorillon, G. 2015. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. in: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, (Ed.) Méndez Vilas A, pp. 305-309.
- Wang, X., Xu, F., Wang, J., Jin, P., Zheng, Y. 2013. *Bacillus cereus* AR156 induces resistance against *Rhizopus* rot through priming of defense responses in peach fruit. *Food Chemistry*, 136(2), 400-406.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580.
- Wu, L., Wu, H.J., Qiao, J., Gao, X., Borriss, R. 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1395.
- Xie, B., Li, T., Lin, X., Wang, C.J., Chen, Y.J., Liu, W.J., Zhao, Z.W. 2016. *Lysobacter erysipheiresistens* sp. nov., an antagonist of powdery mildew, isolated from tobacco-cultivated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 4016-4021.
- Zhang, H., Wang, N.A., Wang, Y., Wang, J., Zheng, H., Liu, Z. 2017a. Subtilisin-like serine protease gene TghSS42 from *Trichoderma ghanense* ACCC 30153 was successfully expressed in *Escherichia coli* and recombinant protease rTghSS42 exhibited antifungal ability to five phytopathogens. *Biocontrol Science*, 22(3), 145-152.
- Zhang, Q.X., Zhang, Y., Shan, H.H., Tong, Y.H., Chen, X.J., Liu, F.Q. 2017b. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(32), 25000-25009.
- Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., Ma, P. 2013. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9525-9534.
- ไทยเกษตรศาสตร์. 2556a. โรคเหี่ยวของพืช. (online). ค้นหามาจาก <https://www.thaikasetsart.com/โรคเหี่ยวของพืช/>. เมื่อวันที่ 13 กันยายน 2561.
- ไทยเกษตรศาสตร์. 2556b. สารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคพืช. (online). ค้นหามาจาก <http://www.thaikasetsart.com/สารเคมีที่ใช้ควบคุมโรค/>. เมื่อวันที่ 18 กันยายน 2561.

- กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2559. โรคไหม้ (Rice Blast Disease). (online). ค้นหาคจาก <http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=112-1.htm>. เมื่อวันที่ 18 กันยายน 2561.
- ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล, อติศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2557. โรคต้นเน่า เกิดจากเชื้อฟิวซาเรียม (*Fusarium Stalk Rot*). (online). ค้นหาคจาก <https://www.pioneer.com/web/site/thailand/menuitem.91d44bec9ac27084d83708370b28e63aa/>. เมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2561.
- ณัฐพร อุทัยมงคล. 2559. มาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกสินค้าเกษตร. (online). ค้นหาคจาก <http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=2080>. เมื่อวันที่ 29 พฤศจิกายน 2561.
- ทวี เก่าศิริ. 2545. *Phytophthora* ราศัตรูพืชที่สำคัญ. 25 ปี สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย, 28-37.
- ธนวรรณ เต็มทรัพย์อนันต์. 2562. การแยกแบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนรู้การสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปริญญาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธารทิพย์ ภาสบุตร, ทศนาพร ทศคร, พีระวรรณ พัฒนวิภาส, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, สุธามาศ ณ น่าน. 2555. การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ใบจุดของปทุมมาและกระเจียว. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 412-418.
- ธารทิพย์ รัตน์นะ. 2559. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสับปะรดและมะละกอ ในการต่อต้านราก่อโรคแอนแทรกคโนสในพริก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 24(3), 456-468.
- ลือชัย อารายะสังสฤษฏ์, สุภาพร จันทร์บัวทอง. 2538. ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปัจจัยสภาพแวดล้อม และเชื้อโรคไหม้ (*Pyricularia oryzae*) ในศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 4(1), 59-70.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์, บุษราคัม อุดมศักดิ์, ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2556. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยว พืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2840-2844.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, พีระวรรณ พัฒนวิภาส, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี. 2555. ผลของสารป้องกันกำจัดโรคพืช metalaxyl ต่อการเจริญของ รา *Phytophthora palmivo*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 1163-1174.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	บริเวณรากพืชที่เก็บดิน	ลักษณะของดิน
1	ต้นมะนาว	ดินร่วนเม็ดละเอียด สีน้ำตาลแดง ไม่รากพืชผสม
2	ต้นหม่อน	ดินร่วนเป็นเม็ดเกาะกันเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลแดง มีรากพืชปนเล็กน้อย
3	ต้นองุ่น	ดินร่วนเป็นผงละเอียด สีน้ำตาลดำเข้ม มีรากพืชเล็กน้อย
4	ต้นมะขามเทศ	ดินร่วนเป็นเม็ดแข็ง จับกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ สีน้ำตาลแดง มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
5	ต้นมะม่วง	ดินร่วนเป็นเม็ด จับกันเป็นก้อนแข็ง ค่อนข้างชื้น สีน้ำตาลแดง ไม่มีรากพืช
6	ต้นกล้วย	ดินร่วนเป็นเม็ด สีน้ำตาลเข้ม มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
7	ต้นลิ้นจี่	ดินร่วนเม็ดละเอียด มีความชื้นมาก สีน้ำตาลแดง มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
8	ต้นตีนเป็ด	ดินร่วนกึ่งเหนียว เนื้อดินแน่นละเอียด เกาะเป็นก้อน มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
9	ต้นมะขามหวาน	ดินเหนียว เนื้อดินละเอียด สีน้ำตาลแดง มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
10	ต้นขนุน	ดินเป็นเม็ดเกาะกันเป็นก้อน สีน้ำตาลเข้ม มีเศษใบไม้ปนเล็กน้อย
11	ต้นสัก	ดินร่วนกึ่งเหนียว เนื้อดินละเอียด สีน้ำตาลแดง ไม่มีรากพืช
12	ต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่	ดินร่วน เนื้อดินละเอียด สีน้ำตาล มีรากพืชเล็กน้อย
13	ดินปลูกผักสลัด	ดินร่วน เนื้อดินละเอียด ค่อนข้างแห้ง สีน้ำตาลดำ มีเศษใยมะพร้าว

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Luria-Bertani Agar (LB)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง Luria-Bertani Agar 0.5X (LB 0.5X)

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose broth 24 กรัม

Agar 15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง V8 Agar

น้ำผัก V8 163 มิลลิลิตร

น้ำปลอดประจุ 190 มิลลิลิตร

แคลเซียมคาร์บอเนต 0.146 กรัม

Agar 3 กรัม

นำน้ำผัก V8 ปริมาตร 163 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ดูดส่วนน้ำ V8 มา 146 มิลลิลิตร ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต 0.146 กรัม นำ V8 ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ 190 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลว Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone 10 กรัม

Yeast extract 5 กรัม

NaCl 10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

สารที่ใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. อะกาโรสเจล

ผงอะกาโรสเจล 0.18 กรัม

บัฟเฟอร์ 1X TAE 20 มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสเจลใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปอุ่นให้เจลละลาย แต่อย่าให้เจลเดือด จากนั้นนำไปเทลงในถาดแม่พิมพ์สำหรับขึ้นเจล ระวังอย่าให้มีฟอง และตั้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว

2. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

Trizma base 121 กรัม

กรดอะซิติกเข้มข้น 28.55 กรัม

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ 50 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งๆ ปล่อยให้เย็นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต E10B77

GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA
CCGCATGGTTTACAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG
CTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA AAC
TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGT
TTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCA
GAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCCGTACACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTA

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต E10B77 เทียบกับ
ฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN

Bacillus subtilis isolate K1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: EU056572.2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2588 bits (1401)	0.0	1403/1404 (99.93%)	0/1404 (0%)	Plus/Plus

```

Query 1      GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 60
      |
Sbjct 50      GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 109

Query 61      CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 120
      |
Sbjct 110     CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 169

Query 121     TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 180
      |
Sbjct 170     TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 229

Query 181     GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 240
      |
Sbjct 230     GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 289

Query 241     CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 300
      |
Sbjct 290     CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 349

Query 301     GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 360
      |
Sbjct 350     GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 409

Query 361     ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 420
      |
Sbjct 410     ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 469

Query 421     GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 480
      |
Sbjct 470     GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 529

```



```
Sbjct 1130 CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT 1189

Query 1141 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC 1200
          |||
Sbjct 1190 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC 1249

Query 1201 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG 1260
          |||
Sbjct 1250 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG 1309

Query 1261 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC 1320
          |||
Sbjct 1310 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC 1369

Query 1321 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC 1380
          |||
Sbjct 1370 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC 1429

Query 1381 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA 1404
          |||
Sbjct 1430 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA 1453
```

Bacillus siamensis partial 16S rRNA gene, isolate RS8

Sequence ID: LR535796.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2588 bits (1401)	0.0	1403/1404 (99.93%)	0/1404 (0%)	Plus/Plus

```

Query 1   GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 60
          |||
Sbjct 34   GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 93

Query 61   CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 120
          |||
Sbjct 94   CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 153

Query 121  TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 180
          |||
Sbjct 154  TGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 213

Query 181  GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 240
          |||
Sbjct 214  GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 273

Query 241  CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 300
          |||
Sbjct 274  CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 333

Query 301  GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 360
          |||
Sbjct 334  GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 393

Query 361  ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 420
          |||
Sbjct 394  ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 453

Query 421  GCGGCGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 480
          |||
Sbjct 454  GCGGCGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 513

Query 481  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT 540
          |||
Sbjct 514  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT 573

```



```
Sbjct  1174  GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC  1233

Query  1201  AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG  1260
          |||
Sbjct  1234  AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG  1293

Query  1261  CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC  1320
          |||
Sbjct  1294  CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC  1353

Query  1321  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC  1380
          |||
Sbjct  1354  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC  1413

Query  1381  CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA  1404
          |||
Sbjct  1414  CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA  1437
```

Bacillus amyloliquefaciens strain Z17-2 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence

Sequence ID: MK271286.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2588 bits (1401)	0.0	1403/1404 (99.93%)	0/1404 (0%)	Plus/Plus

```

Query 1   GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 60
          |
Sbjct 19  GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA 78

Query 61  CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 120
          |
Sbjct 79  CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA 138

Query 121 TGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 180
          |
Sbjct 139 TGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG 198

Query 181  GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 240
          |
Sbjct 199  GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC 258

Query 241  CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 300
          |
Sbjct 259  CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 318

Query 301  GCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 360
          |
Sbjct 319  GCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG 378

Query 361  ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 420
          |
Sbjct 379  ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG 438

Query 421  GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 480
          |
Sbjct 439  GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 498

Query 481  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT 540
          |

```



```

|||||
Sbjct 1159 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC 1218

Query 1201 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG 1260
|||||
Sbjct 1219 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG 1278

Query 1261 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC 1320
|||||
Sbjct 1279 CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC 1338

Query 1321 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC 1380
|||||
Sbjct 1339 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC 1398

Query 1381 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA 1404
|||||
Sbjct 1399 CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA 1422

```