



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Bipolaris maydis*  
ที่ก่อโรคในข้าวโพด

**ชื่อบิสิต** นางสาวธัญณาพร สุนทรวารีย์ รหัสประจำตัว 6032325023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## เรื่อง

แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคในข้าวโพด

## โดย

นางสาวธัญญาพร สุนทรวารี

เลขประจำตัว 6032325023

## อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคในข้าวโพด

โดย นางสาวธัญญาพร สุนทรวารีย์ รหัสนิสิต 6032325023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

ปีการศึกษา 2563

---

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... *อนันท์ ปาลกะ* ..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ศาสตราจารย์ ดร.อนันท์ ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... *ปาหนัน เรืองสำราญ* ..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

..... *[Signature]* ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา)

..... *[Signature]* ..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

ชื่อโครงการ	แอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง <i>Bipolaris maydis</i> ที่ก่อโรคในข้าวโพด
นิสิตผู้ทำโครงการ	นางสาวธัญญาพร สุนทรวารี รหัสประจำตัว 6032325023
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	

---

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการแยก *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด และคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชชนิดนี้ โดยใช้แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้า จากการคัดแยกราก่อโรคจากใบข้าวโพดที่เป็นโรค และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าได้ราที่มีลักษณะของ *B. maydis* คือ โคลนีสีเทาดำ ลักษณะของเส้นใยมีสีน้ำตาลดำที่มีผนังกัน คอเนเดียมีรูปร่างยาวโค้งเล็กน้อย ที่แบ่งเป็น 5-11 เซกเมนต์ เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งด้วยการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคการขีดเชื้อ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์แสดงความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *B. maydis* จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดที่ 24.77% เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารเมแทบอลิต์ที่ผลิตออกจาก M22 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 92.84% เมื่อนำสายพันธุ์ M22 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมบวก และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ M22 มีความใกล้เคียง 100% กับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* CAB 1111 (KJ194590.1) การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งรา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) ให้ความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ  $92.84 \pm 0.00\%$  ผลการทดลองที่ได้นี้จะเป็นแนวทางเพื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของ *B. maydis* ซึ่งก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดต่อไป

**Project:** Antagonistic bacteria against *Bipolaris maydis* that caused Southern corn leaf blight

**Student:** Miss. Thannaporn Sunthonwaree Student ID 6032325023

**Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

### Abstract

The objectives of this study were isolation of *Bipolaris maydis*, which caused Southern corn leaf blight in maize, and screening of 10 bacterial isolates that previously could inhibit several phytopathogenic fungus. By isolating fungi from diseased corn leaf and examining morphology of the isolated fungus, it was found that the fungal morphology was resemble that of *B. maydis* which were grey-black colony, dark brown septate hyphae, and oval-shape conidia with slightly curve that dividing into 5-10 segments. By testing inhibition ability using 10 bacterial isolates by dual culture streak plate technique, the result showed that all tested bacteria were able to antagonize against *B. maydis*. Isolate M22 was selected for further experiment due to its highest inhibition percentage of 24.77%. Extracellular metabolites assay showed that M22 had highest inhibition rate, 92.84%. Morphological study showed that M22 was Gram positive rod shape bacteria. The nucleotide analysis of 16S rDNA revealed that M22 has 100% similarity to *Bacillus subtilis* CAB 1111 (KJ194590.1). Suitable culture media for the production of bioactive metabolites was evaluated. The test showed that *B. subtilis* M22 which cultured in Luria Bertani (LB) had highest inhibition rate with its inhibition percentage of  $92.84 \pm 0.00\%$ . The results from this study will be useful and serve as a preliminary data for controlling of Southern corn leaf blight in maize caused by *B. maydis*.

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยั้งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฯ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำโครงการนี้ อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบและแก้ไข ปรับปรุงโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อโครงการ และประสบการณ์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำโครงการนี้ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ ซึ่งได้แก่นางสาวสิริตา เสียมไหม และนายสิรภพ ภูมิภูติกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำโครงการนี้ ตลอดจนสนับสนุนการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตปริญญาตรีในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมาโดยตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	10
2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	
3.1.1 แบคทีเรีย	12
3.1.2 ราก่อโรคพืช	12
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา	12
3.2.1 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ	12
3.2.2 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร	13
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	13
3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	13
3.3.2 การศึกษาด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล	13
3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งรา	16
3.4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.4.2 ผลของความเป็นกรดเบส	16
3.4.3 ผลของอุณหภูมิ	16
3.4.4 ผลของระยะเวลา	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การแยก <i>Bipolaris maydis</i>	17

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>Bipolaris maydis</i>	17
4.2.1 การทดสอบด้วยเทคนิคการขีดเชื้อ	17
4.2.2 การทดสอบด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร	20
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	21
4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	21
4.3.2 การศึกษาด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล	21
4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งรา	22
4.4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ	22
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
ภาคผนวก ข สารละลายและบัฟเฟอร์	32
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์	33



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1: ผลการยับยั้งการเจริญของ <i>B. maydis</i> ด้วยแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์	18
ตารางที่ 4.2: ผลการยับยั้งการเจริญของ <i>B. maydis</i> ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27	20
ตารางที่ 4.3: ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของ <i>B. maydis</i>	22

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1: โรคราน้ำค้าง (downy mildew)	2
รูปที่ 1.2: โรคราสนิม (Southern corn rust)	2
รูปที่ 1.3: โรคใบไหม้แผลเล็ก (Southern corn leaf blight)	3
รูปที่ 1.4: โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight)	3
รูปที่ 1.5: โรคใบจุด (leaf spot)	4
รูปที่ 1.6: โรคแอนแทรคโนส (anthracnose)	5
รูปที่ 1.7: โรคกาบและใบไหม้ (banded leaf and sheath blight)	5
รูปที่ 1.8: โรคต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา (charcoal rot)	6
รูปที่ 1.9: คอนิเดียของ <i>Bipolaris maydis</i>	6
รูปที่ 4.1: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>B. maydis</i> A) โคลนีของ <i>B. maydis</i> และ B) ลักษณะเส้นใยและคอนิเดียของ <i>B. maydis</i> (400 เท่า)	17
รูปที่ 4.2: ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	21
รูปที่ 4.3: ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 เปรียบเทียบกับ 1kb DNA Ladder (ซ้าย)	21

# บทที่ 1

## บทนำ

### ข้าวโพด

ข้าวโพด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* Linn. ซึ่งเป็นธัญพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ทั้งนี้ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ทั้งตลาดในประเทศและตลาดต่างประเทศมีเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2558) ในบรรดาพืชอาหารที่ใช้เมล็ดด้วยกัน ข้าวโพดจัดว่าเป็นพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 3 ของโลก มีการผลิตทั่วไปในเขตอบอุ่น (temperate) เขตอากาศกึ่งร้อนชื้น (subtropic) และพื้นที่ราบเขตร้อน (lowland tropic) โดยข้าวโพดสามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย (ราเชนทร์ ธิรพร, 2545) ในปี ค.ศ. 2018 พบว่ามีการปลูกข้าวโพดถึง 490,145,927 ไร่ทั่วโลก คิดเป็นผลผลิต 1,147,621,938 ตัน (FAOSTAT, 2018) และในประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดถึง 7,176,972 ไร่ โดยเป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 6,929,904 ไร่ และข้าวโพดหวาน 247,068 ไร่ ซึ่งคิดเป็นผลผลิตรวม 5,606,900 ตัน โดยเป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 5,069,413 ตัน และข้าวโพดหวาน 537,487 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561)

### โรคของข้าวโพดที่มีสาเหตุจากรา

ในกลุ่มของจุลชีพที่เป็นสาเหตุโรคพืช ราเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ก่อความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด โรคที่มักพบในข้าวโพดมีดังนี้

#### โรคราน้ำค้าง (downy mildew)

โรคราน้ำค้างมีสาเหตุจากรา *Peronosclerospora sorghi* ซึ่งจะเข้าทำลายข้าวโพดได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกดอก

#### อาการ

ระยะแรกอาการจะเป็นแบบเฉพาะที่ (local lesion) โดยต้นกล้าจะพบจุดสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนบนใบเลี้ยงและใบจริง 2-3 ใบแรก ต่อจากนั้นจุดนี้จะขยายออกเป็นสีขาวลุกลามไปยังโคนใบ (รูปที่ 1.1)

ระยะที่สองอาการจะเป็นแบบทั่วทั้งต้น (systemic symptom) ซึ่งจะพบบนใบที่ผลิออกมาใหม่ โดยพบลักษณะลายทางสีขาว เขียวอ่อน หรือเหลืองอ่อนที่เกิดขึ้นจากโคนใบถึงปลายใบ ซึ่งอาจยาวติดต่อกันไปหรือขาดเป็นช่วง บางครั้งอาจพบลักษณะอาการเป็นปื้นสีขาวจากโคนใบไปยังปลายใบ อาการระยะที่สองเป็นระยะที่ข้าวโพดเกิดความเสียหายอย่างมาก (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.1 โครรน้ำค้าง (downy mildew)

ที่มา: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5573578>

### โรคราสนิม (Southern corn rust)

โรคราสนิมในข้าวโพดมี 3 แบบ คือ 1) common rust เกิดจากเชื้อ *Puccinia sorghi* 2) Southern rust เกิดจากเชื้อ *Puccinia polysora* และ 3) Tropical rust เกิดจากเชื้อ *Physopella zeae* สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบราสนิม 2 แบบ คือ common rust และ Southern rust

#### อาการ

พบเกือบทุกส่วนของต้นข้าวโพด โดยแสดงอาการเป็นจุดนูนเล็กสีน้ำตาลแดง ขนาดของแผล 0.2-2.0 มิลลิเมตร แผลจะเกิดด้านบนใบมากกว่าด้านล่างของใบ เมื่อเป็นโรคในระยะแรกจะพบเป็นจุดนูนเล็ก ต่อมาแผลจะแตกออกมองเห็นเป็นผงสีสนิมเหล็ก (รูปที่ 1.2) ในกรณีที่เป็นโรครุนแรงจะทำให้ใบแห้งตาย ในที่สุด (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.2 โรคราสนิม (Southern corn rust)

ที่มา: <https://www.mississippi-crops.com/2014/08/01/what-should-you-do-about-late-southern-corn-rust/>

### โรคใบไหม้แผลเล็ก (Southern corn leaf blight)

โรคใบไหม้แผลเล็กมีสาเหตุเกิดจากรา *Bipolaris maydis* โดยพบการระบาดทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพด และระบาดเพิ่มมากขึ้นในหลายพื้นที่ โรคนี้ นับว่าเป็นหนึ่งในโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลก

### อาการ

ระยะแรกจะเกิดจุดเล็กสีเขียวอ่อน ฉ่ำน้ำ ต่อมาจุดจะขยายออกตามความยาวของใบ โดยแผลขนานไปตามเส้นใบ ตรงกลางแผลจะมีสีเทา ขอบแผลมีสีเทาน้ำตาล ขนาดของแผลไม่แน่นอน แผลที่ขยายใหญ่เต็มที่มีขนาดกว้าง 6-12 มิลลิเมตร ยาว 6-27 มิลลิเมตร (รูปที่ 1.3) ใบข้าวโพดที่เป็นโรครุนแรงแผลจะขยายตัวรวมกันเป็นแผลใหญ่ และทำให้ใบแห้งตายในที่สุด ในต้นกล้าจะพบอาการเกิดขึ้นพร้อมกันทุกใบ ซึ่งอาจจะเหี่ยวและแห้งตายภายใน 3-4 สัปดาห์ หลังปลูก แต่ถ้าเกิดกับต้นแก่อาการจะเกิดบนใบล่างก่อน ทั้งนี้อาการสามารถปรากฏได้ทั้งบนต้น กาบใบ ฝัก และเมล็ด (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.3 โรคใบไหม้แผลเล็ก (Southern corn leaf blight)

ที่มา: <https://cropprotectionnetwork.org/resources/articles/diseases/southern-corn-leaf-blight-of-corn>

### โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight)

โรคใบไหม้แผลใหญ่มีสาเหตุเกิดจากรา *Exserohilum turcicum* ซึ่งพบการระบาดในบางพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวโพด โดยมีความสำคัญรองจากโรคใบไหม้แผลเล็ก

### อาการ

การเกิดโรคจะพบได้กับทุกส่วนของข้าวโพด โดยเฉพาะบนใบ กาบใบ ลำต้น และฝัก โดยเกิดเป็นแผลขนาดใหญ่สีเทา หรือสีน้ำตาล มีลักษณะยาวตามใบ หัวท้ายเรียวคล้ายรูปกระสวย อาการจะเกิดกับใบล่างก่อน ขนาดแผลยาว 2.5-15 เซนติเมตร (รูปที่ 1.4) ใบที่มีอาการรุนแรงแผลจะขยายตัวรวมกันเป็นแผลใหญ่ทำให้ใบไหม้และแห้งตายในที่สุด (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.4 โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight)

ที่มา: <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=16546>

### โรคใบจุด (leaf spot)

โรคใบจุดในข้าวโพดมีสาเหตุเกิดจากรา *Curvularia lunata* ซึ่งพบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพด

#### อาการ

ส่วนใหญ่จะปรากฏบนใบ แต่บางครั้งอาจพบบนกาบใบ และฝัก ระยะแรกเกิดเป็นจุดเล็กขนาดเท่าหัวเข็มหมุดสีเขียวอ่อน ต่อมาตรงกลางจุดจะแห้งมีสีเทาหรือน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีน้ำตาลแดง ในที่สุดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไหม้ และจะมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ จุดใหญ่สุดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร (รูปที่ 1.5) (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.5 โรคใบจุด (leaf spot)

ที่มา: <https://cropprotectionnetwork.org/resources/articles/diseases/curvularia-leaf-spot-of-corn>

### โรคแอนแทรคโนส (anthracnose)

โรคแอนแทรคโนสในข้าวโพดมีสาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum graminicola* ซึ่งจะเข้าทำลายข้าวโพดในระยะออกดอก ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ได้แก่ ใบ เมล็ด และลำต้น พืชอาศัยหลักที่สำคัญของรานี้อยู่ในวงศ์ Poaceae เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ราชนิดนี้พบในพื้นที่ที่มีอากาศเย็นหรือพื้นที่สูง

#### อาการ

พบลักษณะใบเป็นจุดกระจายทั่วจากเส้นกลางใบ อาการใบจุดจะแผ่ขยายกว้างในทิวใบที่ราเข้าทำลาย บริเวณกึ่งกลางจุดพบเป็นสีเทาหรือสีฟางข้าว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เทาถึงสีดำ วงซ้อนกันเป็นชั้น (concentric ring) ในพื้นที่ที่มีการเข้าทำลายของราอย่างรุนแรงอาจทำให้ใบแห้งตายได้ อาการที่ลำต้นพบว่าเนื้อเยื่อด้านในมีลักษณะฉ่ำน้ำและมีสีผิดปกติ (รูปที่ 1.6) เมื่อราเพิ่มปริมาณจะทำให้เนื้อเยื่อของลำต้นพอง ทำให้ลำต้นแตก ส่วนกลางลำต้นเป็นสีแดงขอบสีน้ำตาล ส่วนของเปลือกมีสีแดง ทำให้เมล็ดเล็กรูปร่างผิดปกติ (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.6 โรคแอนแทรคโนส (anthracnose)

ที่มา: <https://www.canr.msu.edu/resources/anthracnose-leaf-blight-of-corn>

### โรคกาบและใบไหม้ (banded leaf and sheath blight)

โรคกาบและใบไหม้มีสาเหตุจากรา *Rhizoctonia solani* มีการระบาดสร้างความเสียหายรุนแรง เป็นบริเวณกว้าง

#### อาการ

ทำให้ต้นกล้าเน่าหักล้มทั้งที่ส่วนยอดยังเขียว โคนต้นระดับคอดินมีรอยฉ่ำน้ำสีเขียวอมเทา อาจพบเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมที่ราก (รูปที่ 1.7) เราสามารถเข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดได้ เช่น ลำต้น ใบ กาบใบ กาบฝัก และฝัก (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.7 โรคกาบและใบไหม้ (banded leaf and sheath blight)

ที่มา: <http://nscrc-news.blogspot.com/2017/07/blog-post.html>

### โรคต้นเน่าดำ (charcoal rot)

โรคต้นเน่าดำมีสาเหตุเกิดจากรา *Macrophomina phaseolina* โดยโรคต้นเน่าดำพบทั่วไปในบริเวณพื้นที่ปลูกที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง หรืออยู่ในช่วงแล้ง ซึ่งรานี้มีพืชอาศัยหลายชนิดนอกจากข้าวโพด เช่น ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ทานตะวัน งา ฝัก และผลไม้หลายชนิด

### อาการ

ราเข้าทำลายข้าวโพดตั้งแต่ระยะกล้า หรือระยะที่ข้าวโพดเริ่มแก่ โดยจะแสดงอาการที่รากโดยเกิดเป็นรอยฉ่ำน้ำสีน้ำตาล ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำ (รูปที่ 1.8) เมื่อข้าวโพดแก่ราจะแพร่ระบาดเข้าไปในลำต้น ทำให้ข้าวโพดแก่ก่อนกำหนด ใบเหี่ยว โคนต้นแตก ต้นข้าวโพดจะหักล้มง่าย ราเข้าทำลายเมล็ดทำให้เมล็ดเป็นสีดำ (วาริรัตน์ สมประทุม, 2563)



รูปที่ 1.8 โรคต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา (charcoal rot)

ที่มา: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5366647>

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่ *Bipolaris maydis* หรือ *Cochliobolus heterostrophus* (teleomorph) (Balint-Kurti และคณะ, 2006) ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็ก รานี้จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Dothideomycetes, Order Pleosporales, Family Pleosporaceae (Pereira, 2014) การศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. maydis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะโคนิเดียสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างยาวรีโค้งเล็กน้อย ที่มีการแบ่งเป็น 5-11 เซกเมนต์ (รูปที่ 1.9) (Pál และคณะ, 2015)



รูปที่ 1.9 โคนิเดียของ *Bipolaris maydis*

ที่มา: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5564509>

### การควบคุมโรคที่เกิดในข้าวโพด

การป้องกันโรคโดยทั่วไปมักใช้การถอนและเผาทำลายพืชหรือชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค หรือใช้สารเคมีป้องกันรา เช่น ไตรโพรซีน 20 (ซาพอรอล) หรือ ซีเน็บ เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) แต่การใช้สารเคมีมักมีผลกระทบที่ตามมาคือ เกิดการตกค้างของสารเคมี เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม (รังสิมา เก่งการพานิช, 2558) ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าวิธีการควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ เช่น การใช้



จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมายับยั้งการเจริญเติบโตของรา ซึ่งวิธีนี้ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม (นิพนธ์ ทวีชัย, 2553)

### การควบคุมโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ

วิธีทางชีวภาพ (biocontrol) เป็นวิธีทางเลือกในการกำจัดสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น รา แบคทีเรีย หรือหนอนแมลงที่ทำให้เกิดโรคพืช (Pal และ Gardener, 2006) การใช้แบคทีเรียในการควบคุมโรคพืชสามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรายงานว่าสามารถใช้เพื่อการควบคุมทางชีวภาพได้ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Serratia* sp. และ *Acetobacter* sp. (Deketelaere และ คณะ, 2017) ซึ่งการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชสามารถเกิดได้ด้วยหลายกลไก

### กลไกการยับยั้งรา

#### 1. ภาวะแข่งขัน (competition)

เป็นการแข่งขันระหว่างแบคทีเรียและราก่อโรคพืช โดยจะแข่งขันกันในด้านอาหารและองค์ประกอบที่จำเป็นในการเจริญเติบโตในดินและรอบ ๆ รากของพืช เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเร็วกว่าราก่อโรคพืช จึงทำให้แบคทีเรียใช้สารอาหารบางชนิดไปอย่างรวดเร็ว อีกทั้งแบคทีเรียมีการแย่งชิงองค์ประกอบสำคัญบางอย่างในดิน เช่น ธาตุเหล็กที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบได้ทั่วไปในดิน มักพบในรูปที่ไม่ละลายน้ำ แบคทีเรียสามารถผลิตสารไซเดอร์โอโรเฟอร์ (siderophores) ที่สามารถจับกับไอออนของธาตุเหล็กและดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้ราก่อโรคพืชขาดธาตุเหล็กที่ใช้ในการเจริญเติบโต (Chet และคณะ, 1990)

#### 2. ภาวะหลังสารยับยั้งการเจริญ (antibiosis)

ภาวะหลังสารยับยั้งการเจริญมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งโรคในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ โดยแบคทีเรียจะผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคออกมา (Chet และคณะ, 1990) เช่น การยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ในดินด้วยการใช้เกลตาโนไมซิน (geldanamycin) ที่ผลิตจาก *Streptomyces hygroscopicus* (Rothrock และ Gottlieb, 1984)

#### 3. ภาวะปรสิตและการย่อยสลาย (parasitism and lysis)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสิ่งมีชีวิตอื่นได้มีอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศ จุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในด้านความสมดุลทางจุลชีววิทยาในดิน และยังเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมทางชีวภาพ (Henis และ Chet, 1975) ผนังเซลล์ของราหลายสายพันธุ์ประกอบไปด้วยไคติน (chitin) แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์บางชนิดที่มีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรา (cell wall digesting enzyme) หรือเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ซัสเตรตที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของรา (hydrolytic enzyme) นำไปสู่การสลายตัวของโครงสร้างของรา เอนไซม์เหล่านี้ เช่น ไคทิเนส

(chitinase), กลูแคนเนส (glucanase) และโปรตีเอส (protease) เป็นต้น (Chet และคณะ, 1990; Rahman และคณะ, 2018)

#### 4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced host resistance)

เป็นการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานทางสรีรวิทยา เพื่อเพิ่มความสามารถในการป้องกันโรคพืช โดยพืชจะได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าในสิ่งแวดล้อม โดยสารหรือจุลินทรีย์บางชนิด แล้วทำให้เกิดการกระตุ้นเพื่อเพิ่มความทนทานต่อการติดโรคพืชทางอ้อมได้ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันมี 2 ประเภท ได้แก่ systemic acquired resistance (SAR) ที่ถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค และ induced systemic resistance (ISR) ที่ถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ไม่ก่อโรค (Singh, 2014)

### ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมทางชีวภาพ

#### 1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนมีบทบาททั้งในด้านการสังเคราะห์ทางชีวภาพและด้านการสร้างพลังงานในสิ่งมีชีวิต การศึกษาเกี่ยวกับผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญของ *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ CPA-2 ของ Costa และคณะ (2002) โดยมีแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ฟรุกโทส, กาแลคโทส, มอลโทส, ซูโครส, แลคโทส, ทรีฮาโลส, แป้งที่ละลายน้ำได้, และเด็กซ์ทริน พบว่าฟรุกโทส, ซูโครส, ทรีฮาโลส, และมอลโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี โดยให้ปริมาณเซลล์อยู่ที่  $5.1-5.5 \times 10^9$  cfu/ml

#### 2. ความเป็นกรดเบส

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีภาวะความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมกับการเจริญแตกต่างกัน Abeyratne และ Deshappriya (2018) ได้ศึกษาช่วงของความเป็นกรดเบสที่มีผลต่อการควบคุมทางชีวภาพของ *Trichoderma* sp. ต่อ *Fusarium* sp. โดยศึกษาในช่วงความเป็นกรดเบสระหว่าง 4, 5, 6, และ 7 พบว่าในดินที่มีความเป็นกรดเบสในช่วง 4-5 เหมาะสำหรับการอยู่รอดของ *Trichoderma* sp. ในดิน และในช่วงที่ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์และการผลิตสารยับยั้งรา ต่อ *Fusarium* sp.

#### 3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและกิจกรรมเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ การศึกษาของ Zeinat และคณะ (2010) เกี่ยวกับการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวลที่ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรครากปมในถั่วปากอ้า โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เป็น *Serratia marcescens* และ *Pseudomonas fluorescens* ตั้งแต่ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *S. marcescens* และ *P. fluorescens* สามารถเจริญได้ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ 30 องศาเซลเซียส และเจริญได้น้อยลงที่ 20 และ 40 องศาเซลเซียส

#### 4. อัตราการได้รับออกซิเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการออกซิเจนไม่เท่ากัน Zeinat และคณะ (2010) ยังศึกษาเกี่ยวกับอัตราการดูดซับออกซิเจนที่มีผลต่อปริมาณการผลิตชีวมวลของ *S. marcescens* และ

*P. fluorescens* โดยแปรผันรอบการเขย่าที่ 80, 120 และ 160 รอบต่อนาที พบว่าที่ 120 และ 160 รอบต่อนาทีนั้น *S. marcescens* และ *P. fluorescens* สามารถลดความหนาแน่นประชากรของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดย *S. marcescens* สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่รอบการเขย่า 160 รอบต่อนาที และ *P. fluorescens* สามารถเจริญได้ดีที่รอบการเขย่า 120 รอบต่อนาที

มีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่พยายามยับยั้งการเจริญเติบโตของรา การติดเชื้อเพิ่ม รวมทั้งการทำให้ข้าวโพดมีความต้านทานการติดโรคใบไหม้แผลเล็ก เช่น การใช้ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PJ0210 ที่มีความสามารถยับยั้ง *B. maydis* ได้ด้วยกลไกการแย่งสารอาหารที่จำเป็น (Mohamed และ Caunter, 1995), การใช้โปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ N3 ที่สามารถยับยั้ง *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดได้ 65% หรือป้องกันการรุกรานของ *Bipolaris* sp. ได้มากกว่า 89% (สุดารัตน์ นุชวงศ์, 2556) เป็นต้น

ในการทดลองครั้งนี้ จะคัดแยก *B. maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กจากใบข้าวโพด จากนั้นค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อ *B. maydis* โดยจะใช้แบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของราก่อโรคได้หลายชนิด (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และอีก 2 สายพันธุ์คัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง และพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคได้หลายชนิด (ดรุณี จิวเจริญ, 2552) ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจและคาดว่าจะมีความสามารถในการยับยั้ง *B. maydis* ได้ จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราดังกล่าวและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. maydis* ได้สูงสุด

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้มุ่งแยก *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด จากนั้นหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *B. maydis* แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย และหาภาวะที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งราได้โดยมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อนำไปพัฒนาต่อเป็นสารชีวภาพในการยับยั้งราที่ก่อโรคแทนการใช้สารเคมี

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด
2. ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *B. maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด
3. ทราบเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย
4. ได้ภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

#### 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น UNILUX-12 ของบริษัท Kyowa, Japan
3. คอร์กบอเรีย (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
4. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
6. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องตรวจสอบเจล BluPAD LED Transilluminator ของบริษัท BIO-HELIX, Taiwan
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, German
12. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G506E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น MyCycler Thermal Cycler ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
14. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybermetics, Singapore
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
17. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโนรุ่น 2000 C (NanoDrop 2000c spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
18. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA

19. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
20. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
21. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic, Japan
22. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
23. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
24. แผ่นกระดาษรอง (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman, United Kingdom
25. ไมโครปิเปตต์และทีปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, USA
26. หลอดควิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA

## 2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
3. เปปโตน (peptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
5. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
6. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
7. สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของบริษัท Siberian Enzyme, Russia
8. สีย้อมดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า (6X loading dye) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
9. อาหารสำเร็จรูป NB (Nutrient Broth) ของบริษัท Difco™, USA
10. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
11. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Difco™, USA
12. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
13. 1Kb DNA Ladder ของบริษัท Thermo Scientific, USA
14. GeneJET PCR Purification Kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA
15. GoTaq® Green Master Mix ของบริษัท Promega, USA
16. Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit ของบริษัท Geneaid Biotech, Taiwan
17. SeaKem® LE Agarose ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
18. SERVA DNA stain G ของบริษัท Serva Electrophoresis GmbH, Germany
19. Tris base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) ของบริษัท Research Organics, USA

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียทั้งหมด 10 สายพันธุ์จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) agar (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

##### 3.1.2 ราก่อโรคพืช

แยก *Bipolaris maydis* จากใบข้าวโพดที่เป็นโรค โดยตัดใบข้าวโพดบริเวณที่แสดงอาการของโรคด้วยใบมีดที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นกำจัดเชื้อบริเวณผิวหนังด้านนอกด้วยการแช่ในสารละลาย 70% เอทานอล เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ นำใบที่เตรียมได้ไปวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 วัน ภายใต้ภาวะที่มีแสง (Zainab, 2016) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บบนหลอดอาหารแข็งเอียง PDA

พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของราก่อโรคและพิสูจน์โรคตามขั้นตอนของ Koch's postulate โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ราก่อโรคด้วยน้ำปลอดเชื้อที่มี 1% tween 80 นำใบข้าวโพดที่ไม่เป็นโรคมารักษาความสะอาดผิวใบด้วย 70% เอทานอล ผึ่งให้แห้ง แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ราก่อโรคที่เตรียมไว้มาหยดลงบนใบข้าวโพดที่ทำความสะอาดแล้ว ใช้สำลีชุบให้ทั่วบริเวณผิวใบ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ของราก่อโรค บ่มใบข้าวโพดในถุงพลาสติกที่มีกระดาษชุบน้ำเพื่อให้ความชื้น ปิดปากถุงหลวม ๆ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสังเกตเห็นการเกิดอาการของโรคบนใบข้าวโพด แยกราก่อโรคจากใบข้าวโพดที่เป็นโรค แล้วตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เลี้ยงราก่อโรคโดยวางชิ้นวุ้น (agar plug) ของราก่อโรคที่มีขนาด 6 มิลลิเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

#### 3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค

##### 3.2.1 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรียในข้อ 3.1.1 ร่วมกับราก่อโรค *B. maydis* ที่แยกได้จากข้อ 3.1.2 บนอาหาร PDA โดยวางชิ้นวุ้นของราก่อโรค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงบนด้านหนึ่งของจานอาหาร PDA ส่วนอีกด้านหนึ่งขีดแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์ สำหรับชุดควบคุมวางเฉพาะชิ้นวุ้นของราก่อโรค โดยไม่ขีดแบคทีเรีย แต่

ซีดน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนแบคทีเรีย บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน จนกระทั่งปรากฏกลุ่มทั่วผิวอาหารในชุดควบคุม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (Cheffi และคณะ, 2019) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตรต่อไปนี้ (Erdogan และ Benlioglu, 2010)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \left( \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดควบคุม (มม.)} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดทดลอง (มม.)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดควบคุม (มม.)}} \right) \times 100$$

### 3.2.2 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) เลี้ยงแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด โดยลงเชื้อ 1 หลูบในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก3) 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ 0.5 นำมาลงเชื้อ 1% ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไปกรองเซลล์ โดยใช้ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อ Millipore filter ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมครอน แล้วนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ได้ไปผสมกับ 2XPDA ที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (ภาคผนวก ก4) ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง วางชิ้นวุ้นของ *B. maydis* ที่กลางจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ สำหรับชุดควบคุมวางเฉพาะชิ้นวุ้นของราลงบนจานอาหารแข็ง PDA ที่ไม่มีน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย แต่ใส่อาหารเหลว LB ปลอดเชื้อแทน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏกลุ่มทั่วผิวอาหารในชุดควบคุม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (สุดารัตน์ นุชวงศ์, 2556) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตรข้างต้น

## 3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

### 3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง, ทดสอบสมบัติการย้อมติดสีแกรม (Gram stain)

### 3.3.2 การศึกษาด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ทดสอบระดับชีววิทยาโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน 9F และ 1510R เทียบกับฐานข้อมูล

### 3.3.2.1 เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียโดยใช้สารละลายและวิธีดำเนินการของชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) ดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรีย ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติมสารละลาย Gram positive bacteria buffer ที่เติม Lysozyme แล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตะกอนเซลล์ของแบคทีเรีย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยผสมสารละลายทุก ๆ 10 นาที เติม 20 ไมโครลิตรของ Proteinase K แล้วผสมให้เข้ากัน และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที โดยผสมสารละลายทุก ๆ 3 นาที จากนั้นเติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที โดยผสมสารละลายทุก ๆ 3 นาที จากนั้นเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม 100% เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมสารให้เข้ากัน เทสารละลายทั้งหมดลงใน GD column และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเปลี่ยน collection tube แล้วเติมสารละลาย W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ และเติม 600 ไมโครลิตรของ Wash buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลาย และปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Elution buffer ที่อุ่นไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3.3.2 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ดังนี้

2X GoTaq® Green Master Mix	25 ไมโครลิตร
10 µM 9F ไพริเมอร์	1.0 ไมโครลิตร
10 µM 1510R ไพริเมอร์	1.0 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0 ไมโครลิตร
Nuclease-Free Water	18 ไมโครลิตร



หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมที่กำหนดดังนี้ (Kaewklom และคณะ, 2014)

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	

### 3.3.3.3 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจาก 3.3.3.2 มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียม 1% อะกาโรสเจลที่ผสม SERVA DNA stain G ด้วยบัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE) (ภาคผนวก ข1) แล้วนำเจลไปวางในเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE จากนั้นโหลดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 และดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) แล้วให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าแถบสีเคลื่อนไปจนเกือบตกจากเจล นำเจลไปส่องภายใต้ UV ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล BluPAD และตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.3.3.4 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาทำบริสุทธิ์โดยใช้สารละลายและวิธีดำเนินการของชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาเติม Binding bufer ในอัตราส่วน 1:1 และผสมให้เข้ากัน นำสารละลายผสมที่ได้ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน GeneJet purification column ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที ที่สารละลายที่ผ่านคอลัมน์ แล้วเติม Wash buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที และทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ แล้วย้ายคอลัมน์ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์โดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 3.3.3.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.3.3.4 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการของบริษัท ATGC (ประเทศไทย) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จากฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN

### 3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งรา

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดใน LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8.000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำเลี้ยงเชื้อออกให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ปราศจากเชื้อ ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8.000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ผ่านการล้างมาแขวนลอยในน้ำปราศจากไอออนที่ปราศจากเชื้อ วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

#### 3.4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลงเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก4), Luria Bertani (LB) และ Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก5) ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. maydis* โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.2 ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

#### 3.4.2 ผลของความเป็นกรดเบส

ลงเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.1 ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. maydis* โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.2 ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

#### 3.4.3 ผลของอุณหภูมิ

ลงเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.1 ที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ได้จากข้อ 3.4.2 บ่มที่ อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. maydis* โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.2 ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

#### 3.4.4 ผลของระยะเวลา

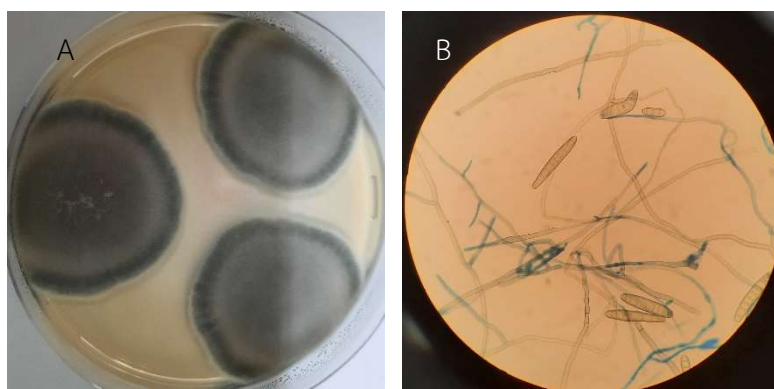
ลงเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.1 ที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ได้จากข้อ 3.4.2 บ่มที่ อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 3.4.3 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. maydis* โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.4.2 ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การแยก *Bipolaris maydis*

จากการแยก *B. maydis* จากใบข้าวโพดที่เป็นโรค พบว่าโคโลนีของรามีสีเทาดำ (รูปที่ 4.1 A) ลักษณะเส้นใยมีผนังกันสีดำน้ำตาลเข้ม คอนิเดียรูปทรงรียาวโค้งเล็กน้อย สีน้ำตาลอ่อน ดังรูปที่ 4.1 B ซึ่ง เป็นลักษณะที่คล้ายกับของ *B. maydis* จึงได้คัดเลือกโคโลนีให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง PDA



รูป 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. maydis*


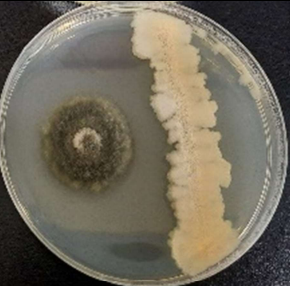
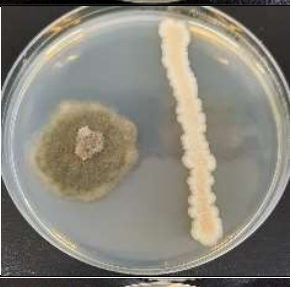

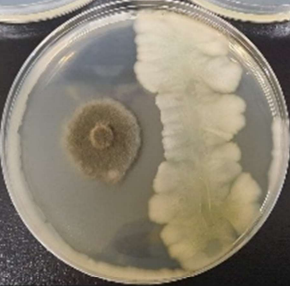

A) โคโลนีของ *B. maydis* และ B) ลักษณะเส้นใยและคอนิเดียของ *B. maydis* (400 เท่า)


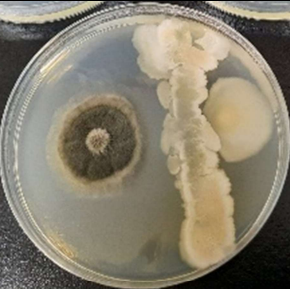

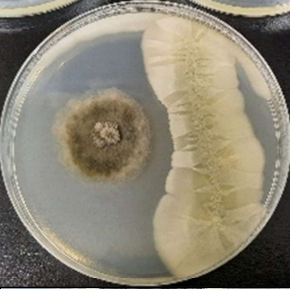

#### 4.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bipolaris maydis*

##### 4.2.1 การทดสอบด้วยเทคนิคการขีดเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราด้วยเทคนิคการขีดแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ได้แก่ TU12-11, TW1-1ng, N1, N3, M10, M22, M23, M25, M26 และ M27 ร่วมกับ *B. maydis* บนอาหารแข็ง PDA พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้ง *B. maydis* ดังแสดงในตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของรา เช่น สีของโคโลนีและการสร้างสปอร์ของราด้วย ทั้งนี้สายพันธุ์ M22, M25 และ M27 มีความสามารถยับยั้งสูงสุดสามลำดับแรก ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 24.77%, 18.84% และ 24.64% ตามลำดับ จึงคัดเลือกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis* ด้วยแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์



แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)	การเจริญของราและแบคทีเรีย
ชุดควบคุม	0	
TU12-11	2.90±0.00	
TW1-1ng	0.78±0.00	
N1	0.72± 1.06	
N3	14.49±0.00	
M10	0.92± 5.66	

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)	การเจริญของราและแบคทีเรีย
M22	24.77±0.00	
M23	1.45±0.00	
M25	18.84±0.00	
M26	7.25±0.00	
M27	24.64±0.00	

#### 4.2.2 การทดสอบด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ M22, M25 และ M27 กับ PDA หลอมเหลว จากนั้นเลี้ยง *B. maydis* บนอาหารที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis* ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยสายพันธุ์ M22 มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 92.84% จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ M22, M25 และ M27

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)	การเจริญของรา
ชุดควบคุม	0	
M22	92.84±0.00	
M25	68.54±9.12	
M27	62.91±11.85	

### 4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

#### 4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

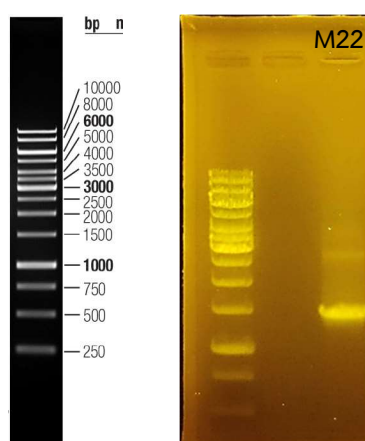
จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 โดยย้อมสีแกรม และตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

#### 4.3.2 การศึกษาด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์มาตรฐาน 9F และ 1510R แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.3 ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ GeneJET PCR Purification kit และตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เทียบกับฐานข้อมูล ได้ผลดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค. ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 มีความเหมือน 100% กับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CAB 1111 (KJ194590.1)







รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 เปรียบเทียบกับ 1kb DNA Ladder (ซ้าย)

#### 4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งรา


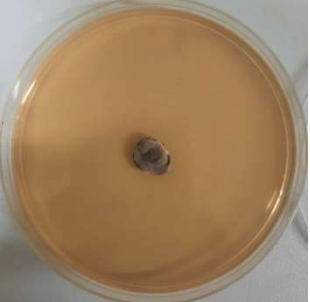
##### 4.4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* สายพันธุ์ M22 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Nutrient Broth (NB), Luria Bertani (LB) และ Tryptic Soy Broth (TSB) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แสดงผลการยับยั้งราดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ  $92.84 \pm 0.00\%$

ตารางที่ 4.3 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญของรา		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)
NB	ชุดควบคุม		13.48±0.00
	ชุดทดสอบ		
LB	ชุดควบคุม		92.84±0.00
	ชุดทดสอบ		



อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญของรา		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)
TSB	ชุดควบคุม		85.59±1.77
	ชุดทดสอบ		

เนื่องจากสถานการณ์โควิด-19 ทำให้ไม่ได้ทดสอบผลของความเป็นกรดเบส ผลของอุณหภูมิ และผลของระยะเวลาที่ใช้บ่มต่อการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis*

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยก *Bipolaris maydis* ที่ก่อโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพดจากใบข้าวโพดที่มีการแสดงอาการของโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ามีราที่มีลักษณะโคโลนีสีเทาดำ ซึ่งเป็นลักษณะของ *B. maydis* จึงนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าราชนิดนี้มีเส้นใยที่มีผนังกันสีน้ำตาลเข้ม คอนิเดียรูปทรงรียาว โค้งเล็กน้อย สีน้ำตาลอ่อน ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับรา *B. maydis* จึงคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ และนำมาแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิคการขีดแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ร่วมกับราก่อโรค พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ แสดงความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค โดยมีสายพันธุ์ M22, M27 และ M25 ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 24.77%, 24.64% และ 18.84% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของรา ซึ่งได้แก่ สีของโคโลนี และการสร้างสปอร์ของราด้วย จากความสามารถในการยับยั้งรา จึงคัดเลือกสายพันธุ์ M22, M25 และ M27 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดสามลำดับแรกมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ M22, M25 และ M27 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียในอาหารแข็ง PDA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 92.84%, 68.54±9.12% และ 62.91±11.85% ตามลำดับ จึงคัดเลือกสายพันธุ์ M22 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งราสูงที่สุด มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและทำการทดลองต่อไป

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22 ด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง เมื่อศึกษาด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ M22 มีความคล้ายคลึง 100% กับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CAB 1111 (KJ19450.1)

การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตสารยับยั้งราของ *B. subtilis* M22 โดยการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด ได้แก่ Nutrient Broth (NB), Luria Bertani (LB) และ Tryptic Soy Broth (TSB) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ให้ความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 92.84±0.00 จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป แต่เนื่องด้วยสถานการณ์โควิด-19 จึงทำให้ไม่ได้ทดสอบผลของความเป็นกรดเบส ผลของอุณหภูมิ และผลของระยะเวลาที่ใช้บ่ม

ต่อการยับยั้งการเจริญของ *B. maydis* ซึ่งการแปรผันปัจจัยเหล่านี้จะทำให้ได้ภาวะที่ทำให้แบคทีเรียผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่ดีขึ้น

*B. subtilis* มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง *B. maydis* ได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Yun-Feng และคณะ (2012) พบว่า *B. subtilis* B47 ซึ่งเป็นเอนโดไฟต์ที่แยกมาจากมะเขือเทศสามารถยับยั้ง *B. maydis* ได้ ซึ่งเมื่อนำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาตตะกอนด้วยกรด แล้วสกัดด้วยเมธานอล และทำบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟี จากนั้นวิเคราะห์ด้วย FT-IR และ MALDI-TOF-MS/MS CID พบว่าสารออกฤทธิ์เป็น iturin A2 ซึ่งเป็นไซคลิกลิโปเปปไทด์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำ *B. subtilis* ไปสร้างสูตรผสม แล้วนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด ทั้งในระดับเรือนกระจกและในแปลงปลูก ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมโรคได้ดี และยังสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดได้อีกด้วย (Suriani และคณะ, 2017) จากการศึกษาของ Ding และคณะ (2017) พบว่า *B. subtilis* DZSY21 ยับยั้ง *B. maydis* โดยการผลิตสารต้านราพวกลิโปเปปไทด์ และกระตุ้นการตอบสนอง ISR ของข้าวโพดผ่านวิธีการสื่อสารสัญญาณด้วยกรดซาลิไซลิกและกรดจัสโมนิก

จากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า *B. subtilis* M22 มีความสามารถในการยับยั้ง *B. maydis* ได้ในการทดสอบด้วยเทคนิคการฉีดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับราก่อโรคและการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร ทั้งนี้ ยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในด้านภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งรามากที่สุด เพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อโรคใบไหม้แผลเล็กที่เกิดจาก *B. maydis* ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Abeyratne, G. D. D., & Deshappriya, N. (2018). The effect of pH on the biological control activities of a *Trichoderma* sp. against *Fusarium* sp. isolated from the commercial onion fields in Sri Lanka. *Tropical Plant Research*, 5(2), 121-128.
- Balint-Kurti, P. J., Krakowsky, M. D., Jines, M. P., Robertson, L. A., Molnár, T. L., Goodman, M. M., & Holland, J. B. (2006). Identification of quantitative trait loci for resistance to Southern leaf blight and days to anthesis in a maize recombinant inbred line population. *Phytopathology*, 96(10), 1067-1071.
- Cheffi, M. A., Gharbi, Y., Medhioub, I., Ennouri, K., Barham, H., Tounsi, S., & Triki, M. A. (2019). The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against Verticillium wilt of olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control*, 142, 104168.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., & Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 129(1), 85-92.
- Costa, E., Teixido, N., Usall, J., Atares, E., & Vinas, I. (2002). The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 117-120.
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S. C., & Höfte, M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against Verticillium wilt. *Frontiers in Microbiology*, 8, 10.3389/fmicb.2017.01186.
- Ding, T., Su, B., Chen, X., Xie, S., Gu, S., Wang, Q., . . . Jiang, H. (2017). An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits Southern corn leaf blight. *Frontiers in Microbiology*, 8, 903.
- Erdogan, O., & Benlioglu, K. (2010). Biological control of Verticillium wilts on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 5, 39-45.
- FAOSTAT. (2018). Food and agriculture organization of United Nations. Retrieved from [http://www.fao.org/faostat/en/?fbclid=IwAR1\\_1\\_SgY1\\_hP7\\_iXLSl4\\_jzFrT6\\_xrySVgyOXz-eEKPOJPY3O9VfPSgdJNyljg4#data/OC/visualize](http://www.fao.org/faostat/en/?fbclid=IwAR1_1_SgY1_hP7_iXLSl4_jzFrT6_xrySVgyOXz-eEKPOJPY3O9VfPSgdJNyljg4#data/OC/visualize). 28/04/2020.
- Henis, Y., & Chet, I. (1975). Microbiological control of plant pathogens. *Advances in Applied Microbiology*, 19, 85-111.

- Kaewklom, S., Chueakhalm, W., Suthirawut, S., & Aunpad, R. (2014). Development of a novel pcr primer to differentiate and identify *Bacillus subtilis* and closely related species isolated from Thai fermented foods. *Food Biotechnology*, 28(4), 354-368.
- Mohamed, S., & Caunter, I. G. (1995). Isolation and characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain suppressive to *Bipolaris maydis*. *Journal of Phytopathology*, 143(2), 111-114.
- Pál, I., Singh, V., Gogoi, R., Hooda, K. S., & Bedi, N. (2015). Characterization of *Bipolaris maydis* isolates of different maize cropping zones of India. *Indian Phytopathology*, 68, 63-66.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Pereira, J. (2014). *Bipolaris maydis*. Retrieved from [https://wiki.bugwood.org/Bipolaris\\_maydis](https://wiki.bugwood.org/Bipolaris_maydis). 05/04/2021.
- Rahman, S. F. A., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.
- Rothrock, C. S., & Gottlieb, D. (1984). Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(12), 1440-1447.
- Singh, H. B. (2014). Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 443-454.
- Sowanpreecha, R., Kanchanabanca, C., Sangvanich, P., & Rerngsamran, P. (2018). *Bacillus subtilis* N3 as a biocontrol agent for *Curvularia lunata* and its antifungal protein properties. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20, 531-538.
- Suriani, Pakki, S., & Muis, A. (2017). The effectiveness of eight bacteria formulations of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. on maydis leaf blight (*Bipolaris maydis* (Nisik. & Miyake) Shoemaker) in corn (*Zea mays* L.). *AAB Bioflux*, 9(1), 11-20.
- Yun-Feng, Y., Qi-Qin, L., Gang, F., Gao-Qing, Y., Jian-Hua, M., & Wei, L. (2012). Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on Southern corn leaf blight. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1), 90-99.
- Zainab, M. B. a. S., S. A. (2016). Isolation and identification of fungi responsible for leaf spots disease of mango (*Mangifera indica* Linnaeus) in Sokoto state, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 9(2), 166-173.

- Zeinat, K. M., Nagwa, M. Atef, El-Sayed, S.A., and Abd El-Wahab G.S. (2010). Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. *Journal of American Science* 6(6), 245-255.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2560). โรคใบไหม้แผลเล็กข้าวโพด. Retrieved from [https://www.doae.go.th/article\\_detail.php?id=SC9qbEswVS9WeStweHN6ZlpOSmNVOT09](https://www.doae.go.th/article_detail.php?id=SC9qbEswVS9WeStweHN6ZlpOSmNVOT09). 28/04/2563.
- คงยุทธ์ เลิศมงคลธรรม. (2549). การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดร.ณิ จิวเจริญ. (2552). แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิพนธ์ ทวีชัย. (2553). โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ (Vol. 35). กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิโครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน.
- รังสิมา เก่งการพานิช. (2558). การลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว. Retrieved from กรมวิชาการเกษตร: <https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2274>.
- ราเชนทร์ ธิรพร. (2545). ข้าวโพดและความเป็นมาของข้าวโพดไทย. In พฤษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย: เอกสารทางวิชาการในการสัมมนากระดับประเทศว่าด้วยพฤษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย พ.ศ. 2534 และ 2539 (pp. 63-75). กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ.
- วาริรัตน์ สมประทุม. (2563). โรคและแมลงศัตรูของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์. In (pp. 37-64): กรมวิชาการเกษตร.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2558). ข้าวโพด : ความสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าวโพด. Retrieved from <https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=15990>. 28/04/2564.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561). ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์: เนื้อที่เพาะปลูก เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่รายจังหวัด ปีเพาะปลูก 2561/62. Retrieved from [http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/maize%20province%2061\(1\).pdf](http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/maize%20province%2061(1).pdf). 05/04/2564.
- สุดารัตน์ นุชวงษ์. (2556). การทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนจาก *Bacillus subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. วิทยานิพนธ์, ระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารแข็ง Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหารแข็ง Potato Dextrose (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB	24	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. อาหารเหลว Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

อาหารสำเร็จรูป NB	8	กรัม
-------------------	---	------

ผสมส่วนผสมในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



## 6. อาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป TSB

30 กรัม

ผสมส่วนผสมในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**สารละลายและบัฟเฟอร์**

1. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	242	กรัม
EDTA	18.61	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	กรัม

ละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane และ EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้นผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เตรียมบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยเจือจางบัฟเฟอร์ 50X TAE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 990 มิลลิลิตร

**ภาคผนวก ค**  
**ลำดับนิวคลีโอไทด์**

**1. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M22**

*Bacillus subtilis* strain CAB 1111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KJ194590.1 Length: 1086

Range 1: 377 to 1042

Core: 1230 bits(666), Expect: 0.0,

Identities: 666/666 (100%), Gaps: 0/666 (0%), Strand : Plus/Plus

```

Query 1      CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG 60
|
Sbjct 377    CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG 436

Query 61     TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGC 120
|
Sbjct 437    TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGC 496

Query 121    AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT 180
|
Sbjct 497    AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT 556

Query 181    GAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGA 240
|
Sbjct 557    GAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGA 616

Query 241    GGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG 300
|
Sbjct 617    GGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG 676

Query 301    CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC T GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAG 360
|
Sbjct 677    CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC T GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAG 736

Query 361    GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGGTTTCC 420
|
Sbjct 737    GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGGTTTCC 796

Query 421    GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGAC 480
|
Sbjct 797    GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGAC 856

Query 481    TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGA 540
|
Sbjct 857    TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGA 916

Query 541    AGCAACGCGAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC 600
|
Sbjct 917    AGCAACGCGAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC 976

Query 601    CCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT 660
|
Sbjct 977    CCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT 1036

Query 661    GGGTTA 666
|
Sbjct 1037  GGGTTA 1042

```