



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ แบบที่เรียบปฏิบัติด้าน *Fusarium solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ

ชื่อนิสิต นายอัฐภาวรุช แก้วกล้า รหัสประจำตัว 5832356923

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

แบคทีเรียปฏิชีวน์ต้าน *Fusarium solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ

โดย

นายอัษฎา กล้วยกล้า

เลขประจำตัว 583 23569 23

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ต้าน *Fusarium solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ

โดย

นายอัษฎารุช แก้วกล้า รหัสนิสิต 583 23569 23

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ)

ชื่อโครงการ แบททีเรียปฏิปักษ์ต้าน *Fusarium solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ

นิสิตผู้ทำโครงการ นายอัษฎาวุธ แก้ววักล้า รหัสประจำตัว 583 23569 23

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

มะเขือเทศเป็นพืชเศรษฐกิจหลักในหลายภูมิภาคของโลกรวมถึงประเทศไทย ซึ่งปัญหาที่เกษตรกรผู้เพาะปลูกมะเขือเทศพบคือ โรคเน่าที่มีสาเหตุมาจาก *Fusarium solani* ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกวิธีการทางชีวภาพเพื่อมายับยั้งราดังกล่าวโดยใช้แอนติโกนิสติกแบททีเรีย 10 สายพันธุ์ โดยทดลองเลี้ยง *F. solani* ร่วมกับแบททีเรีย 10 สายพันธุ์ ผลพบว่าแบททีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถยับยั้งราดังกล่าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเมื่อยับยั้งด้วยแบททีเรียสายพันธุ์ M25, M26 และ M27 ซึ่งมีค่าการยับยั้ง 38.97%, 36.15% และ 39.91% ตามลำดับ เมื่อนำน้ำเลี้ยงปราศจากเชื้อมาทดสอบผลการยับยั้ง โดยใช้อัตราส่วนการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ต่อ PDA ที่แตกต่างกัน ผลคือ แบททีเรียสายพันธุ์ M26 ที่อัตราส่วน 2:10 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา 39.84% จากการหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการยับยั้งราโดยการใช้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ให้ผลชี้ว่าเมื่อเลี้ยงแบททีเรียใน Luria-Bertani Broth จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า Nutrient Broth และ Tryptic Soy Broth โดยมีการยับยั้ง 43.96%, 43.00% และ 17.87% สำหรับแบททีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังต้องการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการยับยั้งราต่อไป ทั้งค่า pH ของอาหาร และระยะเวลาในการเลี้ยงแบททีเรีย รวมถึงระบุชนิดของแบททีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ได้โดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาแบททีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ แล้วนำแบททีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งราและโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ เพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดราโรคพืช

Project: Antagonistic bacteria against *Fusarium solani*, pathogenic fungus of tomatoes

Student: Atsadawut Klaeokla ID 583 23569 23

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Tomatoes are one of the economic crops in many regions of the world including Thailand. The main problem which tomato growers have been facing with is rot disease caused by *Fusarium solani*. This research aimed to use biocontrol method to inhibit such fungus using 10 isolates of antagonistic bacteria. By cultivating *F. solani* together with each of 10 isolated bacteria in dual culture assay, the result suggested that all of bacteria had the antagonistic abilities against *F. solani* with the highest inhibition percentages that were derived from strain M25, M26, and M27 with 38.97%, 36.15%, and 39.91% inhibition, respectively. Cell free supernatant method was examined by mixing cell free supernatant with PDA at different ratios. The result indicated that the highest percentage of inhibition made up 39.84% was received by bacteria strain M26 in 2:10 ratio. Optimization conditions was determined by varying the type of media, pH, and incubation time. The medium that showed maximum antagonistic activity was Luria-Bertani Broth, followed by Nutrient Both and Tryptic Soy Broth; with 43.96%, 43.00% and 17.87% inhibition, respectively. The optimization experiments include pH of medium and incubation time, as well as bacterial identification by molecular biology method of the 3 antagonistic bacteria that had abilities to inhibit *F. solani* are necessary to be performed. The purpose of this research was to screen for the antagonistic bacteria against *F. solani*, the main causal agent of disease in tomatoes, and use them in biocontrol method in order to reduce the use of chemical fungicide.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ผู้ให้ทั้งความรู้ ความเมตตา และคำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบความรู้และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งบประมาณปี 2562 ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในห้องปฏิบัติการ ที่ให้การสนับสนุนทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ และความรู้ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่มีส่วนร่วมให้การช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุน ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันสำคัญในชีวิตให้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
หน้าอนุมัติโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 เนื้อที่เก็บเกี่ยว, ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมะเขือเทศทั้งหมด ในปี 2560	1
ตารางที่ 1.2 เนื้อที่เพาะปลูก, เนื้อที่เก็บเกี่ยว, ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมะเขือเทศทั้งหมด ในประเทศไทย ปี 2561	2

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยวิธี dual culture	11
รูปที่ 4.1 ชุดควบคุมสำหรับเทคนิค dual culture ของ <i>F. solani</i> บน PDA	17
รูปที่ 4.2 dual culture ของแบคทีเรีย N1 และ <i>F. solani</i> บน PDA	18
รูปที่ 4.3 dual culture ของแบคทีเรีย N3 และ <i>F. solani</i> บน PDA	18
รูปที่ 4.4 dual culture ของแบคทีเรีย M10 และ <i>F. solani</i> บน PDA	18
รูปที่ 4.5 dual culture ของแบคทีเรีย M22 และ <i>F. solani</i> บน PDA	19
รูปที่ 4.6 dual culture ของแบคทีเรีย M23 และ <i>F. solani</i> บน PDA	19
รูปที่ 4.7 dual culture ของแบคทีเรีย M25 และ <i>F. solani</i> บน PDA	19
รูปที่ 4.8 dual culture ของแบคทีเรีย M26 และ <i>F. solani</i> บน PDA	20
รูปที่ 4.9 dual culture ของแบคทีเรีย M27 และ <i>F. solani</i> บน PDA	20
รูปที่ 4.10 dual culture ของแบคทีเรีย TD12-11 และ <i>F. solani</i> บน PDA	20
รูปที่ 4.11 dual culture ของแบคทีเรีย TW1-1n9 และ <i>F. solani</i> บน PDA	21
รูปที่ 4.12 เพอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. solani</i> โดยใช้เทคนิค dual culture ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท	21
รูปที่ 4.13 ชุดควบคุมสำหรับเทคนิค cell free supernatant ของ <i>F. solani</i> บน PDA	22
รูปที่ 4.14 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 และ 2:10	22
รูปที่ 4.15 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 และ 2:10	23
รูปที่ 4.16 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 และ 2:10	23
รูปที่ 4.17 เพอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. solani</i> โดยใช้เทคนิค cell free supernatant ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่อัตราส่วน 1:10 และ 2:10	24
รูปที่ 4.18 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน LB	25
รูปที่ 4.19 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน NB	25
รูปที่ 4.20 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน TSB	26
รูปที่ 4.21 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน LB	26
รูปที่ 4.22 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน NB	26
รูปที่ 4.23 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน TSB	27
รูปที่ 4.24 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน LB	27

รูปที่ 4.25 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน NB	27
รูปที่ 4.26 การเจริญของ <i>F. solani</i> บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน TSB	28
รูปที่ 4.27 เพอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>F. solani</i> ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย อาหารชนิดต่าง ๆ	28

บทที่ 1

บทนำ

มะเขือเทศ

มะเขือเทศมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicum* ซึ่งอยู่ใน family Solanaceae โดยประกอบไปด้วย 3,000 สปีชีส์ที่กระจายอยู่ทุกแห่งที่อยู่ (Knapp, 2002) *S. lycopersicum* ในอดีตเรียกว่า *Lycopersicon esculentum* Mill. แต่หลักฐานการยืนยันจากทั้งทางสัณฐานวิทยาและทางอนุกรมวิธานในปัจจุบัน สนับสนุนให้แก้ไขการเรียกชื่อเป็น *Solanum lycopersicum* L. (Peralta และ Spooner, 2001, 2005; Peralta และคณะ, 2008; Spooner และคณะ, 2005) โดยมีหลักฐานอ้างว่ามะเขือเทศมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับมันฝรั่ง และมีต้นกำเนิดจากทะเลทรายทางชายฝั่งตะวันตกของอเมริกาใต้ ก่อนจะถูกชาวสเปนนำไปยุโรป และกระจายตัวจนมีอยู่ทุกมุมโลกในปัจจุบัน (Knapp และ Peralta, 2016)

มะเขือเทศเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและทางอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งของประเทศไทย (กรุง สีตะธนี, 2537) จากรายงานของ FAOSTAT (ตารางที่ 1.1) ประจำปีพุทธศักราช 2560 พบว่าทั่วโลกมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ 30,239,900 ไร่ คิดเป็นผลผลิต 182,301,395 ตัน และประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศมากถึง 33,406.25 ไร่ คิดเป็นผลผลิตรวม 113,846 ตัน (Food Agriculture Organization of the United Nations, 2017)

ตารางที่ 1.1 เนื้อที่เก็บเกี่ยว, ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมะเขือเทศทั้งหมด ในปี 2560 (Food Agriculture Organization of the United Nations, 2017)

ภูมิภาค/ประเทศ	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (เฮกตาร์)	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)
โลก	4,848,384	30,302,400	182,301,395	6,016
เอเชีย	2,604,901	16,280,631	111,424,985	6,844
เอเชียตะวันออกเฉียงใต้	79,524	497,025	1,484,501	2,987
ประเทศไทย	5,345	33,406	113,846	3,408

ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (ตารางที่ 1.2) บ่งชี้ว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดสกลนคร หนองคาย และนครพนม และภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และตาก มีจำนวนผลผลิตมะเขือเทศเป็นส่วนมากในประเทศ โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีเนื้อที่เพาะปลูก 18,034 และ 11,538 ไร่ ตามลำดับ มีเนื้อที่เก็บเกี่ยว 17,165 และ 11,147 ไร่ ตามลำดับ และมีผลผลิต

รวม 66,715 และ 38,388 ตัน ตามลำดับ ในปีพุทธศักราช 2561 เนื่องจากมีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกและการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561)

ตารางที่ 1.2 เนื้อที่เพาะปลูก, เนื้อที่เก็บเกี่ยว, ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของมะเขือเทศทั้งหมดในประเทศไทย ปี 2561 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561)

ภาค/จังหวัด	เนื้อที่เพาะปลูก (ไร่)	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	
				ปลูก	เก็บ
รวมทั้งประเทศ	36,452	34,681	123,609	3,391	3,564
ภาคเหนือ	11,538	11,147	38,388	3,327	3,444
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	18,034	17,165	66,715	3,699	3,887
ภาคกลาง	6,840	6,333	18,431	2,695	2,910
ภาคใต้	40	36	75	1,875	2,083
เชียงราย	786	739	1,872	2,382	2,533
พะเยา	570	519	1,622	2,846	3,125
ลำปาง	992	945	3,368	3,395	3,564
ลำพูน	50	46	119	2,380	2,587
เชียงใหม่	7,260	7,148	25,608	3,527	3,583
แม่ฮ่องสอน	560	525	1,834	3,275	3,493
ตาก	922	837	3,333	3,615	3,982
อุทัยธานี	207	202	257	1,242	1,272
เพชรบูรณ์	191	186	375	1,963	2,016
เลย	23	20	42	1,826	2,100
หนองบัวลำภู	115	102	210	1,826	2,059
อุดรธานี	210	180	557	2,652	3,094
หนองคาย	3,511	3,370	15,022	4,279	4,458
บึงกาฬ	794	765	3,475	4,377	4,542
สกลนคร	6,580	6,226	25,905	3,937	4,161
นครพนม	3,512	3,365	13,158	3,747	3,910
มุกดาหาร	503	484	1,463	2,909	3,023
อำนาจเจริญ	43	40	62	1,442	1,550
อุบลราชธานี	613	566	1,431	2,334	2,528
ศรีสะเกษ	260	242	524	2,015	2,165

บุรีรัมย์	64	60	138	2,156	2,300
ร้อยเอ็ด	259	245	879	3,394	3,588
กาฬสินธุ์	314	296	735	2,341	2,483
ขอนแก่น	129	125	302	2,341	2,416
ชัยภูมิ	27	25	52	1,926	2,080
นครราชสีมา	1,077	1,054	2,757	2,560	2,616
สระบุรี	1,092	1,054	4,215	3,860	3,999
ลพบุรี	48	46	152	3,167	3,304
ชัยนาท	27	25	45	1,667	1,800
สุพรรณบุรี	215	210	507	2,358	2,414
นครปฐม	833	755	2,192	2,631	2,903
กาญจนบุรี	534	484	1,285	2,406	2,655
ราชบุรี	456	405	1,259	2,761	3,109
เพชรบุรี	2,045	1,878	4,944	2,418	2,633
ประจวบคีรีขันธ์	1,590	1,476	3,832	2,410	2,596
นครศรีธรรมราช	40	36	75	1,875	2,083

มะเขือเทศในประเทศไทย สามารถแบ่งตามการใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. มะเขือเทศพันธุ์อุตสาหกรรม เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมกับการแปรรูป เช่น น้ำมะเขือเทศเข้มข้น, มะเขือเทศปอกผิว น้ำมะเขือเทศ และมะเขือเทศแช่แข็ง ในต่างประเทศ พันธุ์มะเขือเทศอุตสาหกรรมมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดอย่างชัดเจน ขณะที่ในประเทศไทยการแบ่งพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดและอุตสาหกรรมยังไม่ชัดเจน มะเขือเทศหลายพันธุ์สามารถใช้ได้ทั้งรับประทานผลสดและแปรรูป ทั้งนี้ข้อกำหนดสำหรับมะเขือเทศอุตสาหกรรม ควรมีคุณลักษณะ ดังนี้

- ผลสุกแดงทั้งผล ไม่มีไหลหรือขั้วผลสีเหลือง
- เนื้อแน่น ทนทานต่อการขนส่ง
- มีค่าสี (a/b) มากกว่า 2.2
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้สุทธิ (total soluble solid) ≥ 5
- ความเป็นกรดต่าง ≤ 4.4
- ขั้วผลหลุดจากผลได้ง่าย
- เป็นพันธุ์พุ่ม ผลสุกแก่ในเวลาใกล้เคียงกันทั้งต้น
- รูปร่างและขนาดผลขึ้นกับผลิตภัณฑ์

- สำหรับน้ำมะเขือเทศเข้มข้น รูปร่างผลไม่กำหนด แต่ขนาดผลไม่ควรน้อยกว่า 2.5 เซนติเมตร

- มะเขือเทศเปลือกเปลือก ขนาดผลมีความสำคัญ โดยต้องมีขนาดไม่เกิน 60 กรัมต่อผล
- มะเขือเทศหั่นเป็นชิ้นลูกเต๋า ต้องการมะเขือเทศที่มีรูปทรงผลยาว เนื้อแน่น
- ทนทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวเป็นพื้นฐาน รองลงมาได้แก่โรคเหี่ยวเหลือง และไส้เดือนฝอย
- ผลผลิตต่อไร่สูง (ผลผลิตไม่ควรต่ำกว่า 3 กิโลกรัม/ต้น)

พันธุ์มะเขือเทศอุตสาหกรรมที่นิยมปลูกในปัจจุบันได้แก่ BT-2, เกษตรดอย NS2535, เพชรเมณีทอง 988, เพชรตะวัน 983, Perfect 89, Perfect Pro 58 และแก้วเมณี TW-5 115-8 (บุญส่ง เอกพงษ์, 2555)

2. พันธุ์บรีโกลสด มะเขือเทศบรีโกลสดในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1 มะเขือเทศพันธุ์บรีโกลสดผลเล็ก แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ มะเขือเทศสีดาและมะเขือเทศเซอร์ ซึ่งมะเขือเทศทั้ง 2 ชนิดใช้บรีโกลสดในลักษณะที่แตกต่างกัน

มะเขือเทศสีดาใช้เป็นส่วนประกอบอาหารและส้มตำเป็นหลัก ลักษณะของมะเขือเทศสีดาที่ดีต้องมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวและมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากจึงจะทำให้ส้มตำอร่อย พันธุ์มะเขือเทศสีดาที่สำคัญ ได้แก่ สีดาทิพย์ 3, สีดาทิพย์ 4, ส้มตา, พวงชมพู, เพชรชมพู และเทพประทาน

ส่วนมะเขือเทศเซอร์ใช้เป็นส่วนประกอบของสลัดผักและรับประทานเป็นผลไม้ ในจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกมะเขือเทศเซอร์จำนวนมาก เริ่มนำมะเขือเทศเซอร์มาเป็นส่วนประกอบส้มตำแทนมะเขือเทศสีดา ลักษณะมะเขือเทศเซอร์ที่ดี ต้องมีเนื้อแน่น รสหวานมากกว่ามะเขือเทศทั่วไป (Brix > 6) พันธุ์มะเขือเทศเซอร์ที่สำคัญ ได้แก่ พันธุ์ราชินี พันธุ์ CHT154 (บุญส่ง เอกพงษ์, 2555)

2.2 มะเขือเทศพันธุ์บรีโกลสดผลโต การบรีโกลสดมะเขือเทศผลโต มีทั้งในรูปสลัดผักและใช้ เป็นองค์ประกอบในอาหารไทยหลายชนิด ในประเทศไทยยังไม่มี การแบ่งพันธุ์มะเขือเทศบรีโกลสด เป็นมะเขือเทศรับประทานผลสดหรือมะเขือเทศโรงงานที่ชัดเจน เนื่องจากยังไม่มีพันธุ์ที่มีขนาดผลใหญ่ เนื้อผลนุ่ม ชุ่มฉ่ำ รสชาติดี มะเขือเทศโรงงานที่นำมาคัดเป็นมะเขือเทศผลสดจะคัดมาจากผลที่มีขนาด ใหญ่ ผลสวย รูปร่างผลกลมสูง (Roma type) มีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 100 กรัมต่อผล พันธุ์ที่นิยมปลูก บรีโกลสดทางภาคเหนือ ได้แก่ Extra 390 ส่วนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมปลูกพันธุ์ Perfect Gold 111 และ NS81 (บุญส่ง เอกพงษ์, 2555)

โรคของมะเขือเทศ

มะเขือเทศเป็นพืชที่พบว่ามีโรคจำนวนมาก ทั้งโรคจากรา แบคทีเรีย ไวรัส หนอนตัวกลม และแมลง รวมทั้งบางโรคซึ่งเป็นโรคที่ไม่ได้เกิดจากภาวะปรสิตอีกด้วย ตัวอย่างของโรคจากรา ได้แก่ โรค

Septoria leaf spot จากรา *Septoria lycopersici* อาการคือ จุดเล็ก ๆ ที่กระจาย แล้วเปลี่ยนเป็นจุดกลมขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร โรค early blight หรือโรคใบจุดสีน้ำตาล เกิดจาก *Alternaria solani* โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เกิดจาก *Collectotrichum coccodes* อาการคือ จุดกลมเล็กหยักบนผิวในช่วงแรก ต่อมาจะกลายเป็นจุดที่ใหญ่ขึ้นและมีจุดดำเกิดขึ้นตรงกลาง (Gleason และ Edmunds, 2005) โรคเหี่ยวซึ่งเป็นโรคที่พบมากที่สุดซึ่งมีสาเหตุจาก *Fusarium*, *Oospora*, *Cladosporium*, *Pleospora*, *Rhizopus* และ *Botrytis* รวมไปถึงแบคทีเรีย เช่น *Erwinia aroideae* และ *E. carotovora* นอกจากนี้ ยังมีโรคที่เกิดจากไวรัส ตัวอย่างเช่น Tomato mosaic จากไวรัส Tobacco mosaic virus (TMV) ที่ก่อโรคในใบยาสูบอีกด้วย โดยมีอาการของโรคคือ ใบหงิก และมีรอยด่างทั้งขาวและดำบนผิวใบ เป็นต้น โรคจากแมลงและหนอนตัวกลม เช่น โรค Psyllid yellow เป็นผลกระทบจากการกินอาหารของแมลงตัวเล็กชนิดหนึ่ง ที่ชื่อ *Paratrioza cockerelli* แล้วแมลงหลังสารพิษออกมา ทำให้มะเขือเทศเจริญเติบโตผิดปกติ โรคปมรากจากหนอนตัวกลม *Heterodera marioni*, *Heterodera roxtochiensis*, *Pratylenchus* spp., และ *Helicotylenchus* app. โรค cloudy spot ที่มักก่อจุดสีขาวหรือเหลืองใต้ผิวของผลมะเขือเทศ ที่เกิดจากแมลงในวงศ์ Pentatomid ที่ชื่อว่า stink bug (*Halyomorpha halys*) และโรคที่ไม่ได้เกิดจากภาวะปรสิต ตัวอย่างได้แก่ โรคปลายผลเน่า (blossom end rot หรือ BER) ที่เกิดจากการขาดแคลเซียม โดยมีอาการคือ ปลายของผลที่สุกจะบวมและเปลี่ยนเป็นสีเข้ม (Doolittle S.P., 1948)

Fusarium

ราในสกุล *Fusarium* มักพบว่าอาศัยอยู่ในดิน พบได้ทั่วทุกแห่ง และมักเป็นราที่ทำลายและก่อโรคทางระบบท่อลำเลียงพืช ทำให้เกิดอาการเน่าในส่วนของหัว เหง้า และราก พบโรคที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในพืชมากมาย ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว, ดอกไม้บางชนิด (Garibaldi และคณะ, 2017), ฝ้าย (Davis และคณะ, 2006), ถั่วลิสง (Rojo และคณะ, 2007), หัวหอม (Stankovic และคณะ, 2007), กะหล่ำปลี (Liu และคณะ, 2017), แดงโม (Netzer, 1976), มะเขือเทศ (Akköprü และ Demir, 2005), พริก (Saengnak และคณะ, 2013), ถั่วฝักยาว (Madhu Kumar, 2006), มันฝรั่ง (Haskell, 1917), กล้าย (Ploetz, 2015), ส้ม (Hannachi และคณะ, 2015) และแอปเปิ้ล (Ju และคณะ, 2014) ทั้งนี้มักเกิดจาก *F. oxysporum* ที่ก่อโรค fusarium wilt (Ploetz, 2006) และ *F. graminearum* (Duvnjak และคณะ, 2016), *F. acuminatum* (Mao และ คณะ, 1998), *F. avenaceum* (Fletcher และ คณะ, 1991), *F. culmorum* (Jaroszuk-Ścisiet และคณะ, 2008), และ *F. moniliforme* (Johnston และคณะ, 1979) ที่ก่อโรคผลเน่า (Fusarium fruit rot) โดยในประเทศไทยเกิดความเสียหายมากที่สุด คือ โรคเหี่ยวกรรมวิชาการเกษตร ในปีพุทธศักราช 2553 รายงานเกี่ยวกับ *Fusarium* ว่าในประเทศไทยพบ *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* และ *F. solani* ในพืชที่เป็นโรคทั่วประเทศ (อภิรัชต์ สมฤทธิ และคณะ, 2552) โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษา *Fusarium*

solani ที่ก่อโรคน้ำในมะเขือเทศ และเป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียผลผลิตของมะเขือเทศทั่วโลก *F. solani* จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Class Sordariomycetes, Order Hypocreales, Family Nectriaceae

F. solani ถูกกล่าวถึงครั้งแรกในปี 1940 โดย Snyder และ Hansen (Leslie และ Summerell, 2008; Snyder และ Hansen, 1940) เมื่อเลี้ยง *F. solani* บน potato dextrose agar จะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นปุยนุ่ม และมีเส้นใยสีขาว ใช้เวลาเจริญเติบโตรวดเร็ว (Mwang'ombe และคณะ, 2008) ซึ่งโดยปกติโคโลนีของ *F. solani* มีได้หลายสี เช่น ชมพู ม่วง คริม ขาว เขียวอมน้ำเงิน และเขียว เป็นต้น แต่จะไม่พบสีส้ม เส้นใยมีผนังกัน ไม่มีสี ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่มีการแตกกิ่ง โดยสร้างสปอร์ซึ่งเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ที่มี 2 ขนาด เมื่อสร้างโคนิเดียบริเวณปลายจะสร้างเป็นแบบโมนอเพียไลด์ (monophialide) หรือโมนอซีรีเอต (monoseriate) โคนิเดียขนาดใหญ่เรียกว่า macroconidia ซึ่งมีลักษณะโค้งอวบ ผนังหนา มีผนังกัน 3-5 ชั้น ขนาดประมาณ 6X65 ไมโครเมตร มักสร้างบนก้านชูสายสั้น ซึ่งต่อมาจะพัฒนาไปเป็น sporodochia โคนิเดียขนาดเล็กเรียกว่า microconidia ซึ่งถูกสร้างบนก้านชูสายยาว ประกอบไปด้วย 1-3 เซลล์ ขนาดประมาณ 2X8 ถึง 5X16 ไมโครเมตร บางครั้งอาจพบการสร้างคลามัยโดโคนิเดีย (chlamydoconidia) ทั้งแบบเดี่ยวและแบบคู่ (Saccardo, 1881)

F. solani มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคน้ำในมะเขือเทศซึ่งได้รับการพิสูจน์ด้วยการทดลองทางปฏิบัติการ (Karima และ Nadia, 2012) โดยมีการพิสูจน์และศึกษาวิธีการติดเชื้อและเกาะในรากของมะเขือเทศด้วยการใช้โปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียว และสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกนและวิเคราะห์ (Lagopodi และคณะ, 2002) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่า สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งของ *F. solani* สามารถติดเชื้อมากกว่าชนิดเดียว ซึ่งกล่าวได้ว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรค Fumartii wilt ในมันฝรั่ง สามารถเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ก่อโรคน้ำในมะเขือเทศ (Romberg และ Davis, 2007) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่พยายามยับยั้งการเจริญเติบโตของการติดเชื้อเพิ่ม ตลอดจนการทำให้มะเขือเทศมีความต้านทานการติดโรคน้ำ ทั้งวิธีการทางเคมีและวิธีการกระตุ้นให้พืชเกิดความสามารถต้านการติดเชื้อ วิธีการเคมี เช่น การใช้โคตินและโคโตซานในการยับยั้งการเกิดโรสดังกล่าว (Abd-El-Kareem และคณะ, 2006) ซึ่งโคตินและโคโตซานมีสมบัติหลายอย่าง เช่น มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดมะเร็ง และต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Struszczyk และคณะ, 2002) จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ด้วยการทำเป็นยาลดไขมันในกระแสเลือด (Koide, 1998) และนอกจากนี้ยังรวมถึงการใช้สารเคมีเหนี่ยวนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อ ได้แก่ โพลีเทสซีมซอร์เบต ไดโพลีเทสซีมไฮโดรเจนฟอสเฟต กรดซาลิไซลิก และกรดซอร์บิก ซึ่งมีรายงานว่าโพลีเทสซีมซอร์เบตให้ผลการยับยั้ง *F. solani* ที่ดีที่สุด (El-Mohamedy และคณะ, 2014) การใช้สารเคมีนั้นให้ผลที่ชัดเจนและมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งราสูง แต่มักส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม คือเมื่อสารเคมีถูกชะด้วยน้ำลงสู่แหล่งน้ำจะทำให้สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้รับผลกระทบจากสารเคมีตามไปด้วย (Couderchet, 2003) ส่วนวิธีการกระตุ้นให้พืชเกิดความสามารถต้านการติดเชื้อ ได้แก่ การศึกษาจีโนม

ไทป์ของพืชที่มีความทนต่อการติดเชื้อเพื่อนำยีนมาปรับแต่งให้กับจีโนมไทป์อื่น ๆ (Bilgi และคณะ, 2008) และการใช้หลักการทางเซลล์วิทยาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการทนต่อการติดเชื้อ (Pharand และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานานในการพัฒนาสายพันธุ์พืชที่มีสมบัติเหล่านี้

การควบคุมโดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมโดยวิธีทางชีวภาพ (biocontrol) เป็นวิธีหนึ่งที่ศึกษากลไกการควบคุมโรคและระบบการควบคุมโรคด้วยวิธีต่าง ๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่มีทั้งแบคทีเรียและรา โดยมีกลไก 4 ลักษณะ ได้แก่ 1) การแข่งขัน (competition) โดยเชื้อปฏิปักษ์จะสามารถแข่งขันกับเชื้อที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น แย่งธาตุอาหาร, อากาศ และการครอบครองพื้นที่ ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้, 2) การทำลายชีวิต (antibiosis) คือ การใช้เชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคได้ด้วยการผลิตสารพิษหรือสารปฏิชีวนะ, 3) การเป็นปรสิต (parasitism) โดยใช้เชื้อที่มีสมบัติเป็นปรสิตซึ่งเจริญเข้าไปและทำลายภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ซึ่งวิธีการนี้ยังไม่นิยมนัก เนื่องจากพบได้ยาก, และ 4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) ซึ่งเป็นการนำเชื้อก่อโรคมารักษาให้เสียความสามารถในการติดเชื้อ แล้วนำไปชักนำหรือกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อเชื้ออื่น ๆ ได้ (จิราพร เพชรรัตน์, 2548)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมราก่อโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 ซึ่งสร้าง พิโนสซิน-1-คาร์บอกซีไมด์ เพื่อยับยั้ง *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* ซึ่งก่อโรครากเน่าในมะเขือเทศ (Chin-A-Woeng และคณะ, 1998), การใช้แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และ *Burkholderia* ที่สร้างสารไพโรโรลนิตริน (pyrrolnitrin) เพื่อยับยั้ง *Rhizoctonia solani* Kühn ซึ่งก่อโรคโคนเน่าในข้าวโพดและโรคกาบใบแห้งในข้าว (Ligon และคณะ, 2000), การทำงานร่วมกันของ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas lilacinus* ที่สามารถสร้างเอธิลอะซีเตตเพื่อยับยั้งตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* และราที่ติดเชื้อในรากมะเขือเทศ ได้แก่ *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อโรครากเน่าและปมรากในมะเขือเทศ (Siddiqui และคณะ, 2000) และการทำงานร่วมกันของ *Trichoderma harzianum* และ *Trichoderma viride* เพื่อยับยั้ง *Fusarium solani* ซึ่งก่อโรครากเน่าในมะเขือเทศ (Bokhari และ Perveen, 2012) รวมทั้งการปรับปรุงทางพันธุกรรมของ *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 เพื่อให้สามารถยับยั้ง *F. solani* ซึ่งก่อโรครากเน่าในพืช (Lim และคณะ, 1991) เป็นต้น

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) หมายถึง จุลินทรีย์ใด ๆ ทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือไวรัส ที่มีความสามารถในการควบคุมจำนวนประชากรหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโทษได้ รวมไปถึงการลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคเพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงขึ้น (อนุเทพ ภาสุระ, 2557) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งร่ากอโรคในพืช เช่น การใช้ *Fusarium oxysporum* Fo47 ที่ไม่ก่อโรค และ *Pseudomonas putida* WCS358 ในการยับยั้งความหนาแน่นประชากรและเมแทบอลิซึมของ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* สายพันธุ์ F0ln3GUS ที่ก่อโรค Fusarium wilt ในต้นลิ้น (Duijff และคณะ, 1999) การใช้ *Streptomyces violaceusniger* สายพันธุ์ G10 ในการยับยั้ง *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ที่ก่อโรคเหี่ยวในกล้วย (Getha และ Vikineswary, 2002) การใช้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SG6 ในการยับยั้งโรค Fusarium Head Blight (FHB) ในข้าวสาลี ที่เกิดจาก *Fusarium graminearum* (Zhao และคณะ, 2014) และการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ที่ก่อโรคเหี่ยวในเมลอน ซึ่งผลการระบุชนิดชี้ว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *Trichoderma harzianum* 2413, *Aspergillus tubingensis*, *Absidia corymbifera*, *Aspergillus fumigatus*, และ *Aspergillus niger* (Suárez-Estrella และคณะ, 2007) เป็นต้น

งานวิจัยก่อนหน้า ได้คัดแยกแบคทีเรียมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3, N9 และ P1 โดยมี 7 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* sp. ที่ก่อโรคในผลมะเขือเทศ และ 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum capsici* ที่ก่อโรคในผลมะเขือเทศ (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ TU13-9, TD12-11 และ TW1-1N9 ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Curvalaria lunata*, *Bipolaris* sp., *Collectotrichum* sp., *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ได้ (ตรุณี จิวเจริญ, 2555) ในงานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราสกุล *Fusarium* ได้ จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ N1, N3, M10, M22, M23, M25, M26, M27, TD12-11 และ TW1-1N9 มาทดสอบการยับยั้ง *Fusarium solani* ที่ก่อโรคเน่าในมะเขือเทศ

ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคเน่าในมะเขือเทศ เพื่อประโยชน์ทางการเกษตรสำหรับเกษตรกรที่เพาะปลูกมะเขือเทศทั้งเชิงพาณิชย์ และเพื่อรับประทานในครัวเรือน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้มุ่งหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคน้ำในมะเขือเทศ จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและหาภาวะที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งราได้โดยมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อนำไปพัฒนาต่อเป็นสารชีวภาพในการยับยั้งราที่ก่อโรคแทนการใช้สารเคมีฆ่ารา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคในต้นมะเขือเทศ
2. ได้ภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคในต้นมะเขือเทศ
3. ทราบเอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ได้

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น InnovaTM 4300 บริษัท New Brunswick
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG2002-s บริษัท Mettler Toledo
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
6. ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) No.3 เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
7. ไมโครปิเปต บริษัท SCILAB
8. หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น ss-325 บริษัท Tomy
9. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
10. Laminar flow บริษัท Boss Tech

เคมีภัณฑ์

1. Agar
2. Bacto™ Tryptic Soy Broth บริษัท M&P IMPEX
3. Crystal Violet
4. Difco™ Nutrient Broth บริษัท Becton, Dickinson and Company
5. Emsure™ Sodium chloride บริษัท Merck KGaA, Darmstadt ประเทศเยอรมัน
6. HiMedia™ Potato Dextrose Broth บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.
7. Himedia™ Tryptone Type-1 บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.
8. HiMedia™ Yeast Extract Powder บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.
9. Hydrochloric acid
10. Iodine
11. Lacto phenol aniline blue
12. LiChrosolv™ Ethanol บริษัท Merck KGaA, Darmstadt ประเทศเยอรมัน
13. LiChrosolv™ Methanol บริษัท Merck KGaA, Darmstadt ประเทศเยอรมัน
14. Safranin O
15. SERVA DNA G บริษัท Serva Electrophoresis GmbH ประเทศเยอรมัน
16. Sodium hydroxide

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

1) การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการยับยั้งรา *Fusarium solani*

นำแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้า^๑ ซึ่งคัดแยกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี 8 ไอโซเลท (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และคัดแยกมาจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง 2 ไอโซเลท (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) รวมทั้งหมด 10 ไอโซเลท มาเลี้ยงบน Luria-Bertani agar (LA) (ภาคผนวก ก1) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะย้ายไปเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก2) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

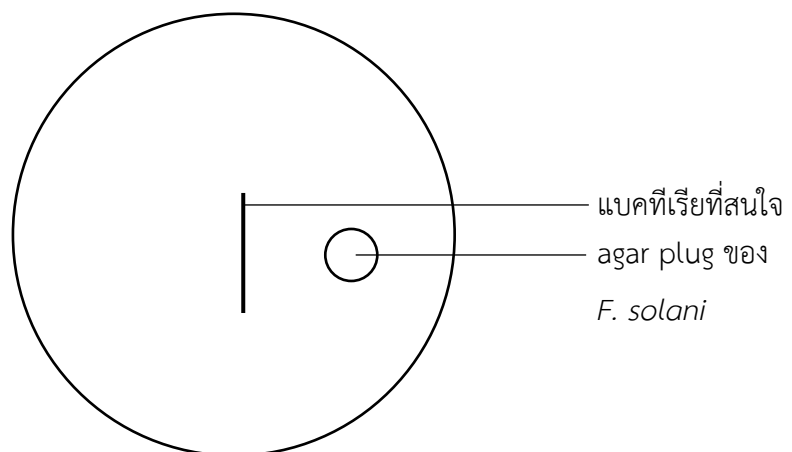
เลี้ยงรา *F. solani* บน PDA โดยวิธีวาง agar plug ตรงกลางเพลท แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง

2) การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *F. solani*

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ในการยับยั้งรา ดังนี้

2.1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งด้วยวิธี dual culture

ทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ N1, N3, M10, M22, M23, M25, M26, M27, TD12-11 และ TW1-1n9 ร่วมกับ *F. solani* บนอาหาร PDA โดยขีดแบคทีเรียบนอาหาร PDA ยาว 2 เซนติเมตร ส่วนราใช้วิธีวาง agar plug ที่ได้มาจากการเจาะด้วย cork borer No.3 ให้มีระยะห่างระหว่างแบคทีเรียและราประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* ด้วยวิธี dual culture

บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดการเจริญของเส้นใยราและนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \left[1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญได้}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดควบคุม}} \right) \right] \times 100$$

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 3 อันดับแรก จากข้อ 2.1) เพื่อนำไปทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา

2.2) การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา (cell free supernatant)

ทดสอบโดยนำแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุด 3 อันดับ เลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani Broth (LB) (ภาคผนวก ก3) 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ก่อนจะนำมาวัดค่า OD ที่ 730 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.50 เท่า ๆ กัน ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แล้วนำไปเลี้ยงต่อใน LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มารองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยสัดส่วน 1:10 และ 2:10 แล้วเทเพลท ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นวาง agar plug ของรากับอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดการเจริญของเส้นใยรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เลือกสัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหารที่เห็นผลชัดเจนเพื่อใช้ในการทดลองอื่นต่อไป

3) การหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

3.1) การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

ทดสอบได้โดยนำแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุด 3 อันดับ เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อสองครั้ง เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่ตกค้างออก ก่อนจะนำมาวัดค่า OD ที่ 730 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.50 เท่า ๆ กัน ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารผันแปร 3 ชนิด ได้แก่ LB, Nutrient Broth (Lagopodi และคณะ) (ภาคผนวก ก4) และ Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก5) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

18 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ ด้วยสัดส่วนที่เห็นผลชัดเจนจากข้อ 2.2) แล้วเทเพลท ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นวาง agar plug ของราบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดการเจริญของเส้นใยรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และเลือกอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

3.2) การหา pH ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

ทดสอบโดยนำแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุด 3 อันดับ เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อสองครั้ง เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่ตกค้างออก ก่อนจะนำมาวัดค่า OD ที่ 730 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.50 เท่า ๆ กัน ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดจากข้อ 3.1) ที่ปรับ pH เป็น 5.0, 7.0 และ 9.0 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ ด้วยสัดส่วนที่เห็นผลชัดเจนจากข้อ 2.2) แล้วเทเพลท ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นวาง agar plug ของราบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดการเจริญของเส้นใยรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เลือกค่า pH ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

3.3) การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา

ทดสอบโดยนำแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุด 3 อันดับ เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อสองครั้ง เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่ตกค้างออก ก่อนจะนำมาวัดค่า OD ที่ 730 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.50 เท่า ๆ กัน ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดจากข้อ 3.1) และที่ค่า pH ที่ได้จากข้อ 3.2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มากรองด้วยตัวกรองปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ ด้วยสัดส่วนที่เห็นผลชัดเจนจาก 2.2) แล้วเทเพลท ตั้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นวาง agar

plug ของราบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดการเจริญของเส้นใยรา และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เลือกระยะเวลาที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเราได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

4) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงสุดมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางกายภาพ, วิธีทางชีวเคมี, และวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ดังนี้

4.1) วิธีทางกายภาพโดยการย้อมสีแบคทีเรียตามหลักของการย้อมแกรม

ย้อมสี Crystal Violet แล้วทำให้ติดแน่นด้วยไอโอดีน ก่อนล้างด้วย 95%แอลกอฮอล์ หลังจากนั้นย้อมทับด้วยสีย้อม Safranin O แล้วตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4.2) วิธีทางชีวเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

ทดสอบความสามารถการใช้ออกซิเจนในการเจริญของแบคทีเรีย และทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส

4.3) วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการสกัด DNA ของแบคทีเรีย เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้มาจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน 8F และ 1492R (Kaewklom และคณะ, 2014)

4.3.1) การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit ดังนี้

เลี้ยงแบคทีเรียให้อยู่ในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ในอาหารเหลว LB ถายน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม TE Buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) และเติมเอนไซม์ lysozyme 10 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร กับเอนไซม์ Proteinase K 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase A 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ถายน้ำเลี้ยงเชื้อใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม BL buffer 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 100% ethanol 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นถ่ายตัวอย่างผ่าน HiBind® DNA Mini Column ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวผลกรองออก นำ HiBind® DNA Mini Column กลับใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และเติม HBC buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวผลกรองออก นำคอลัมน์กลับใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดเดิม จากนั้นเติม DNA Wash buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวผลกรองออก นำคอลัมน์กลับใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดเดิม แล้วล้างด้วย DNA Wash buffer 700 ไมโครลิตรซ้ำ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำ HiBind® DNA Mini Column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม elution buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C

4.3.2) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 4.3.1) มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเตรียมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังนี้

5X PCR buffer	10 ไมโครลิตร
50 µM 8F (forward primer)	1 ไมโครลิตร
50 µM 1492R (reverse primer)	1 ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.25 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยเครื่อง PCR และปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดดังนี้

Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ทำปฏิกิริยารวม 30 รอบ ซึ่งประกอบด้วย

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.3.3) การทำอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม เพื่อเตรียม 0.8% อะกาโรสเจล แล้วผสมลงใน 1X TAE buffer (ภาคผนวก ข1) 100 มิลลิลิตร นำไปใส่ไมโครเวฟเพื่อหลอมละลาย สังเกตจากสารละลายจะใสไม่มีเม็ดวุ้น ตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนถึงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม 2 ไมโครลิตร SERVA DNA G (Serva Electrophoresis GmbH, Germany) ซึ่งเป็นสารละลายสำหรับย้อม DNA ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในถาดที่มีหัวเพื่อทำหลุมตามขนาดที่ต้องการ ทิ้งให้แข็ง แล้วนำไปวางในเครื่อง Electrophoresis (Major Science, USA) เท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล แล้วโหลด DNA มาตรฐาน GeneRuler 1 กิโลเบส DNA ladder (Thermo Scientific, USA) เพื่อใช้เทียบขนาดของ DNA ที่สนใจ และ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 4.3.2) ซึ่งผสมกับ 6X Loading dye (Thermo Scientific, USA) ในอัตราส่วน 5:1 เริ่มกระบวนการโดยใช้ความต่างศักย์ของไฟฟ้า 100 Volts เวลา 25 นาที แล้ว DNA จะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกตามขนาดของ DNA หลังจากนั้น บันทึกภาพผลเจลด้วย Gel Documentation ร่วมกับโปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA)

4.3.4) การทำบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอออกจากเจล

โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) ดังนี้

ตัดเจลบริเวณที่มี DNA ที่ต้องการ แล้วชั่งน้ำหนักเจลใส่ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ก่อนเติม QG buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปอุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที สังเกตสี หากเป็นสีม่วงหรือส้มให้เติม 3M sodium acetate (pH 5.0) 10 ไมโครลิตร หากเป็นสีเหลือง (pH \leq 7.5) ให้เติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันก่อนย้ายไปใส่ QIA column เพื่อปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 13,000 รอบต่อวินาที 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม QG buffer 500 ไมโครลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 13,000 รอบต่อวินาที 1 นาทีอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง แล้วชะล้าง QIA column ด้วย PE buffer 750 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 2-3 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 13,000 รอบต่อวินาที 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่มารอง QIA column เติม EB buffer 30 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 1 นาที เพื่อชะล้าง DNA ให้ลงมาในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ก่อนนำ DNA ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยสามารถตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์ว่าได้ DNA ที่ต้องการหรือไม่ จากการทำอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง

4.3.5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 4.3.4) ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่เรียกฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. solani*

บทที่ 4

ผลการทดลอง

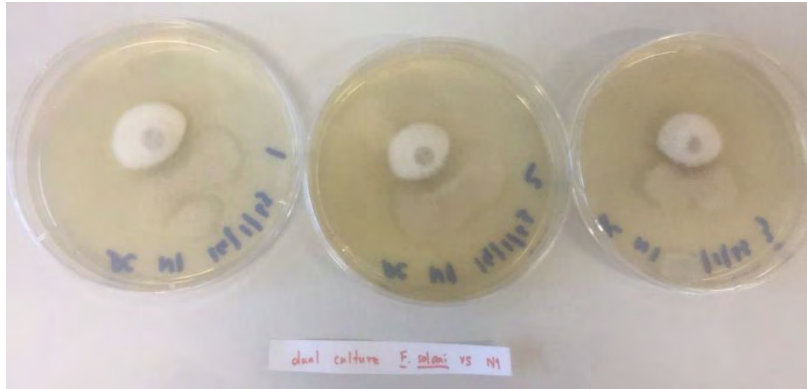
1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Fusarium solani*

1.1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture

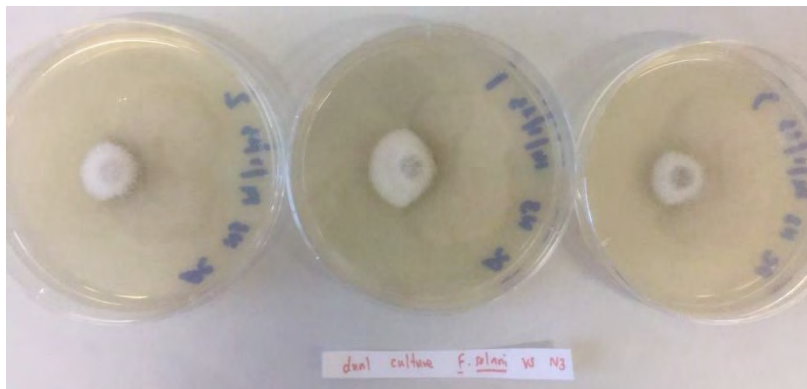
การทดลองการยับยั้งราด้วยแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ได้แก่ N1, N3, M10, M22, M23, M25, M26, M27, TD12-11 และ TW1-1n9 ด้วยวิธี dual culture เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย (รูปที่ 4.1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.2-4.11 และรูปที่ 4.12 ซึ่งพบว่าผลการยับยั้งที่มากที่สุด 3 อันดับแรกมาจากแบคทีเรีย M27, M25 และ M26 ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 39.91%, 38.97% และ 36.15% ตามลำดับ (รูปที่ 4.12) โดยคาดว่าแบคทีเรียทั้งสามชนิดน่าจะผลิต secondary metabolite ออกมานอกเซลล์ โดยเมแทบอลิต์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราได้ จึงนำแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทไปทดสอบความสามารถของการยับยั้งรา *F. solani* ด้วยการใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (cell free supernatant)



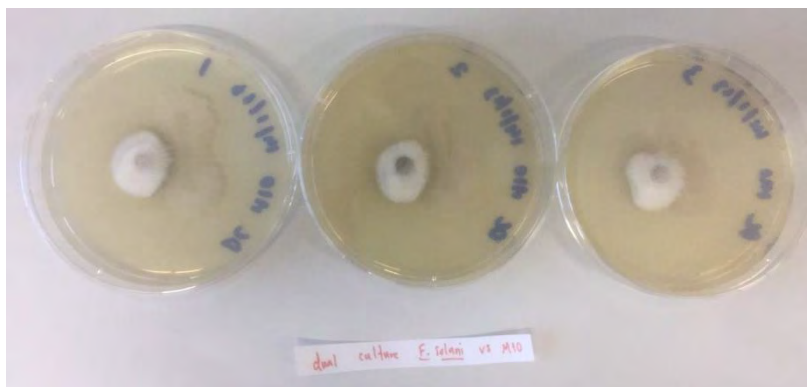
รูปที่ 4.1 ชุดควบคุมสำหรับเทคนิค dual culture ของ *F. solani* บน PDA



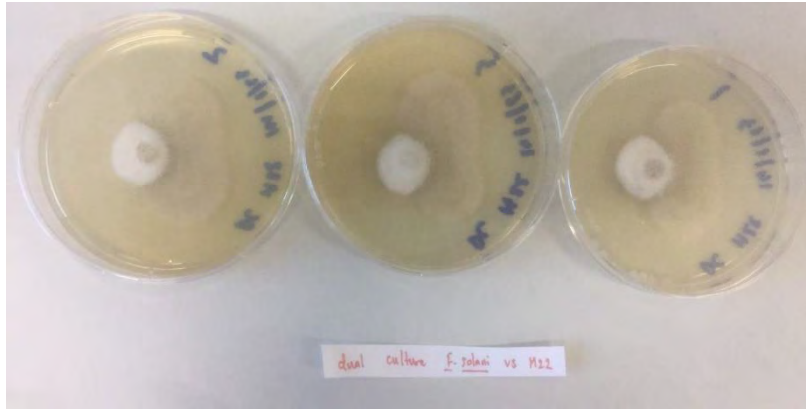
รูปที่ 4.2 dual culture ของแบคทีเรีย N1 และ *F. solani* บน PDA



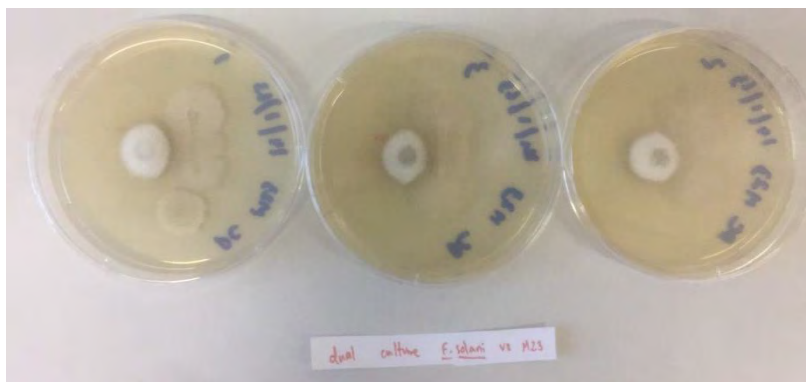
รูปที่ 4.3 dual culture ของแบคทีเรีย N3 และ *F. solani* บน PDA



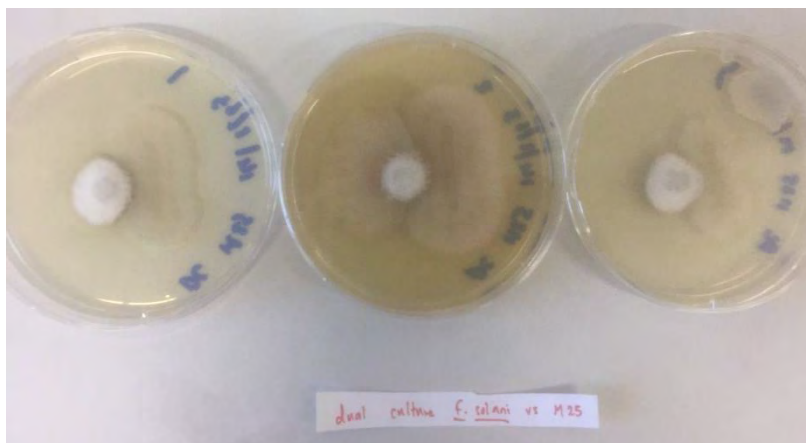
รูปที่ 4.4 dual culture ของแบคทีเรีย M10 และ *F. solani* บน PDA



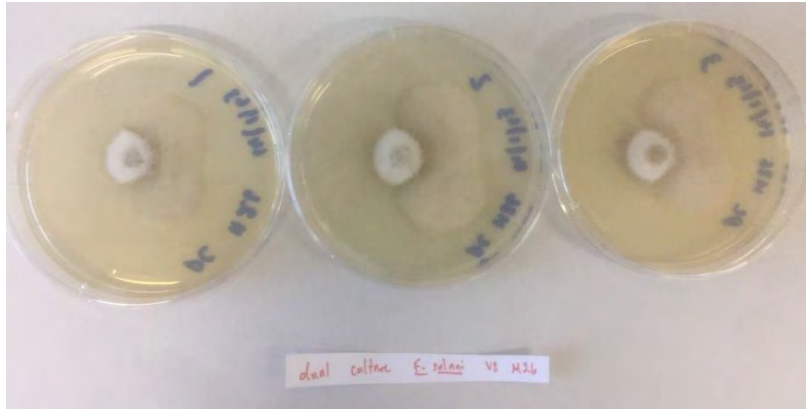
รูปที่ 4.5 dual culture ของแบคทีเรีย M22 และ *F. solani* บน PDA



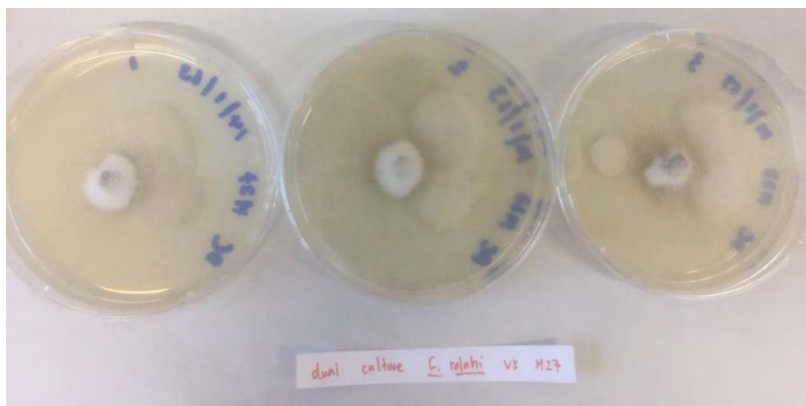
รูปที่ 4.6 dual culture ของแบคทีเรีย M23 และ *F. solani* บน PDA



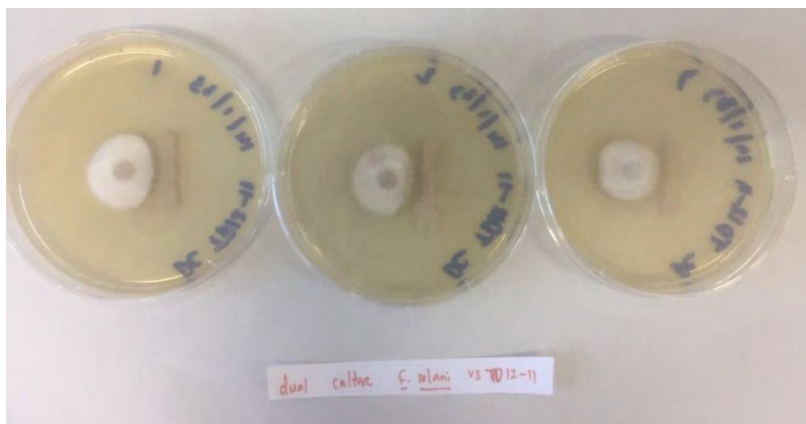
รูปที่ 4.7 dual culture ของแบคทีเรีย M25 และ *F. solani* บน PDA



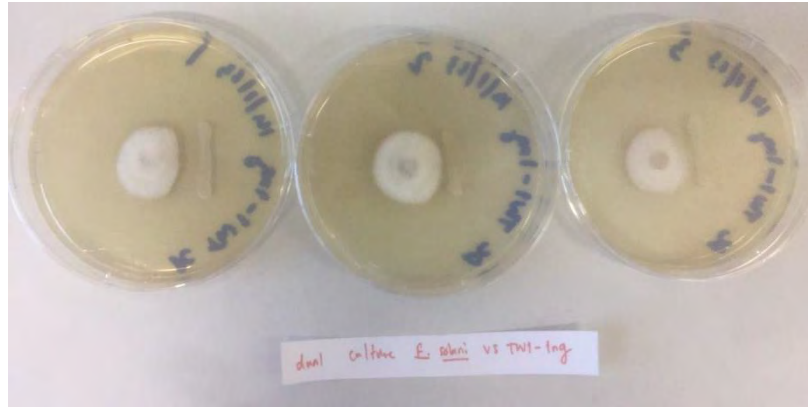
รูปที่ 4.8 dual culture ของแบคทีเรีย M26 และ *F. solani* บน PDA



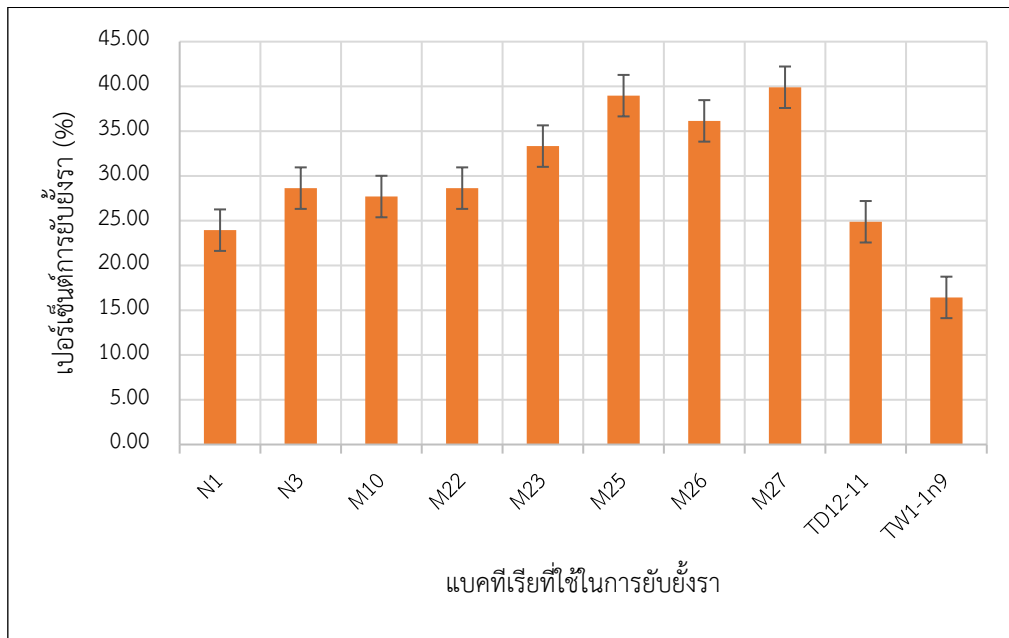
รูปที่ 4.9 dual culture ของแบคทีเรีย M27 และ *F. solani* บน PDA



รูปที่ 4.10 dual culture ของแบคทีเรีย TD12-11 และ *F. solani* บน PDA



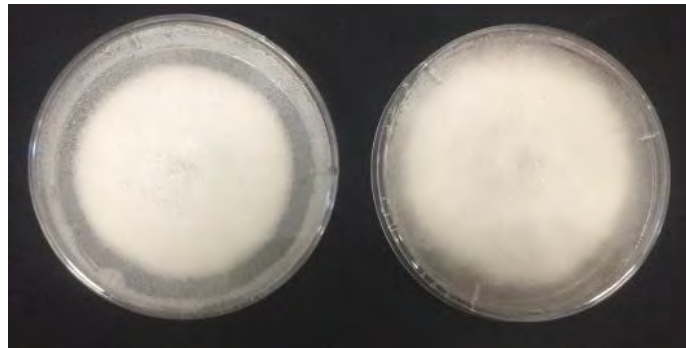
รูปที่ 4.11 dual culture ของแบคทีเรีย TW1-1n9 และ *F. solani* บน PDA



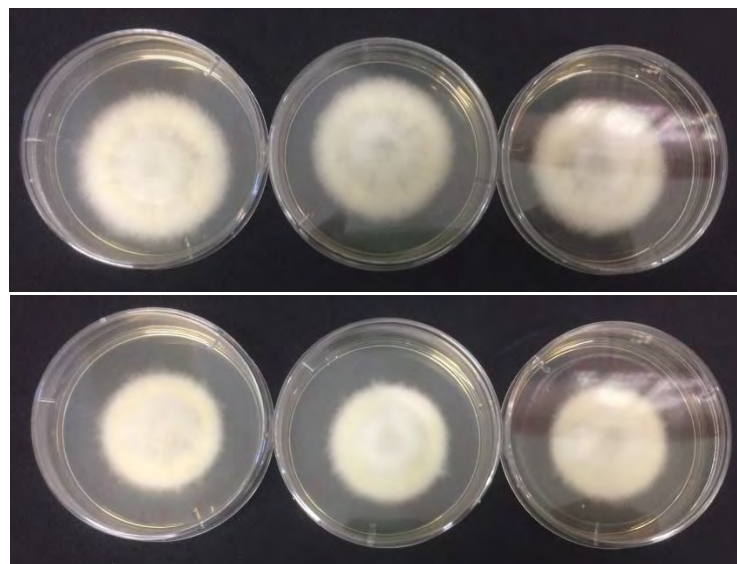
รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. solani* โดยใช้เทคนิค dual culture ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

1.2) การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา (cell free supernatant)

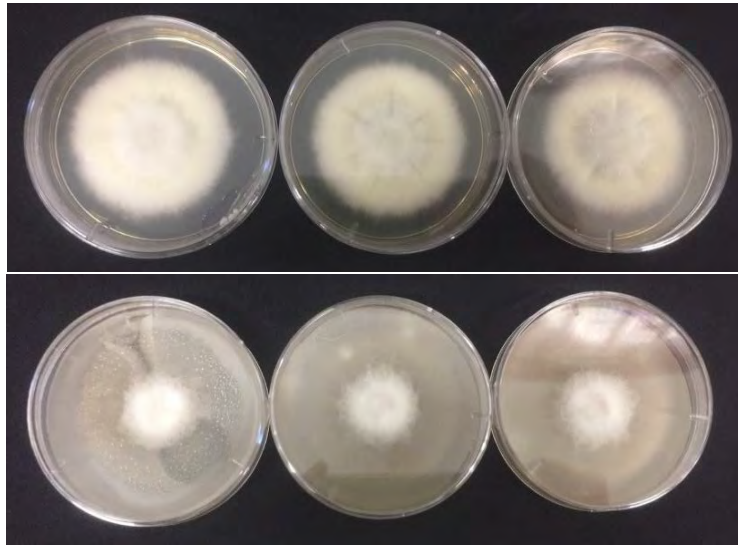
การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ในการยับยั้ง *F. solani* ผลปรากฏว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 4.13) แล้ว ทั้งการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ต่อ PDA ที่ 1:10 และที่ 2:10 สามารถยับยั้งราได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.16 และเนื่องจากที่อัตราส่วน 2:10 ให้ผลที่ชัดเจนดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนนี้เพื่อใช้ในการทดลองอื่นต่อไป โดยใช้เทคนิค cell free supernatant ที่อัตราส่วน 2:10 พบว่าแบคทีเรีย M26 สามารถยับยั้งราได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 39.84%, อันดับรองลงมาคือ แบคทีเรีย M25 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 26.02% และตามด้วยแบคทีเรีย M26 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 17.07%



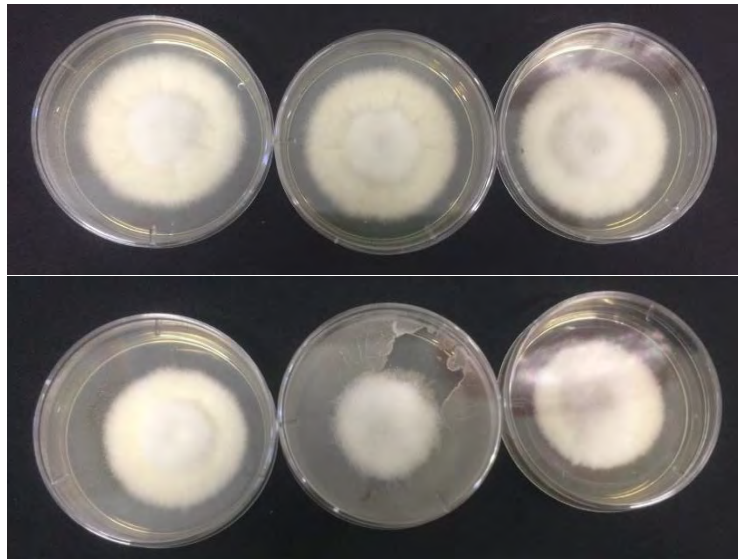
รูปที่ 4.13 ชุดควบคุมสำหรับเทคนิค cell free supernatant ของ *F. solani* บน PDA



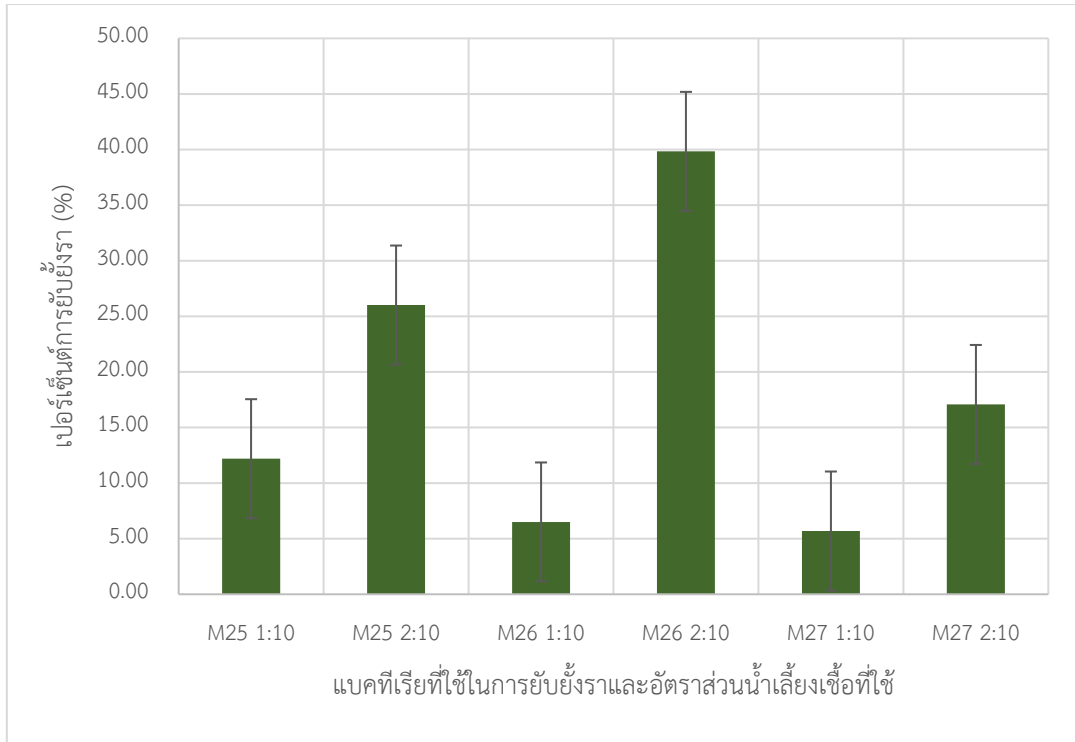
รูปที่ 4.14 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 (บน) และ 2:10 (ล่าง)



รูปที่ 4.15 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26
ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 (บน) และ 2:10 (ล่าง)



รูปที่ 4.16 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27
ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1:10 (บน) และ 2:10 (ล่าง)

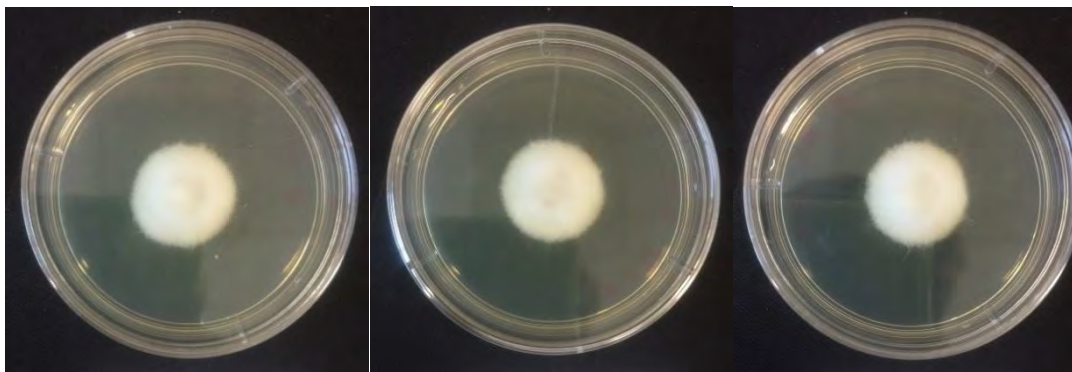


รูปที่ 4.17 เปอร์เซนต์การยับยั้ง *F. solani* โดยใช้เทคนิค cell free supernatant ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่อัตราส่วน 1:10 และ 2:10

2) การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

2.1) การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

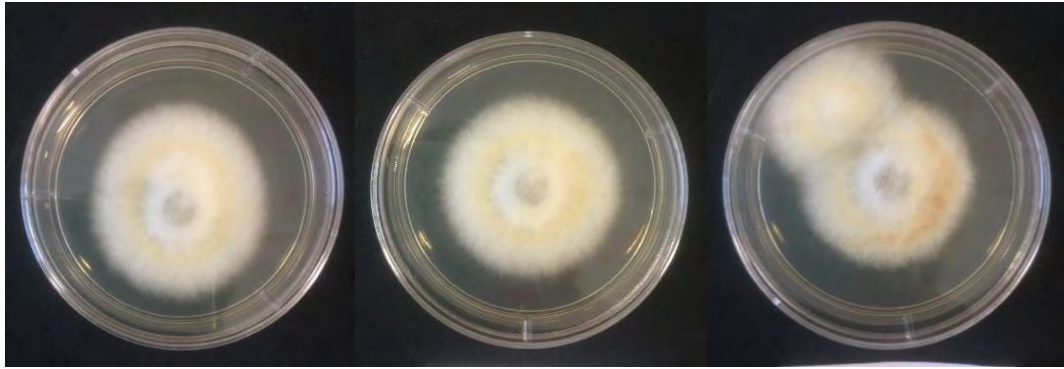
การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ในการยับยั้ง *F. solani* เมื่อเลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน ได้แก่ Tryptic Soy Broth (TSB), Luria-Bertani Broth (LB) และ Nutrient Broth (Lagopodi และคณะ) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.18-4.27 พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อยับยั้ง *F. solani* คือ Luria-Bertani Broth (LB) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 43.96%, 43.00% และ 17.87% สำหรับแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ รองลงมา คือ Nutrient Broth (Lagopodi และคณะ) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 15.94%, 38.16% และ 9.18% สำหรับแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ และอันดับสุดท้าย คือ อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 1.45%, 6.28% และ 4.35% สำหรับแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ LB เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับใช้ยับยั้ง *F. solani* ในการทดลองต่อไป



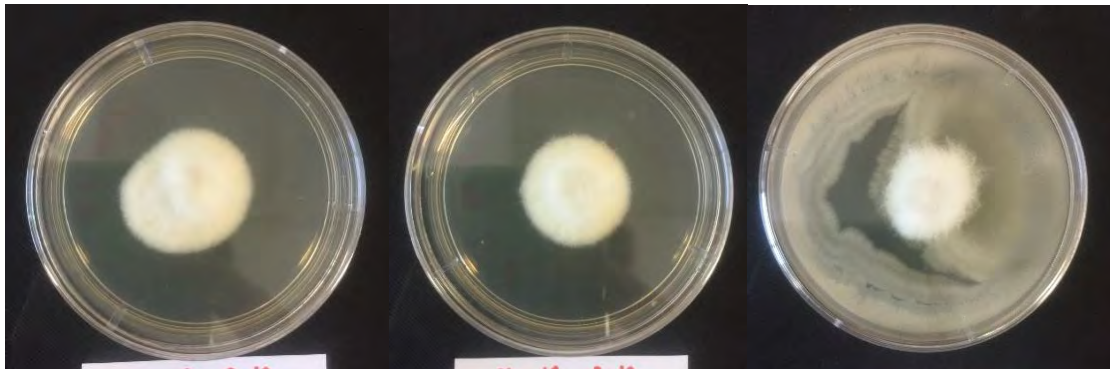
รูปที่ 4.18 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน LB



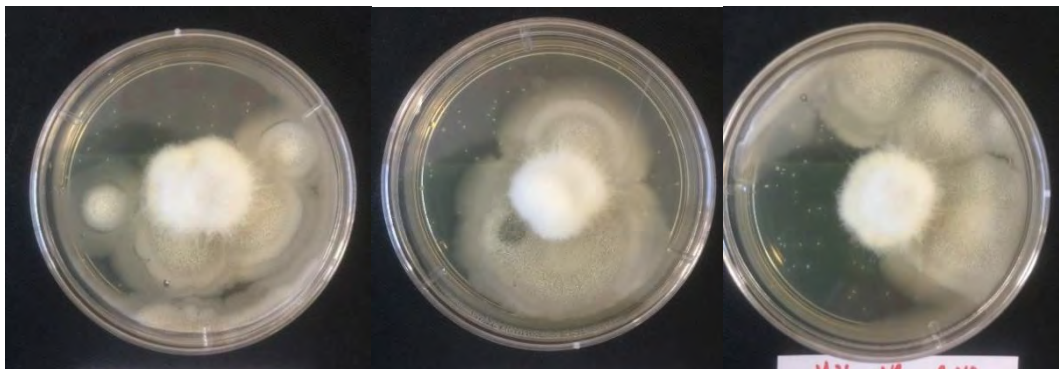
รูปที่ 4.19 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน NB



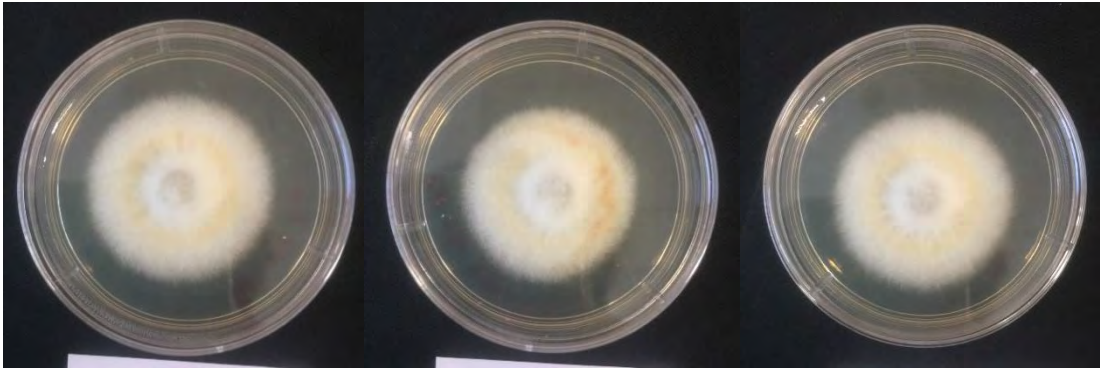
รูปที่ 4.20 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 ที่เลี้ยงใน TSB



รูปที่ 4.21 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน LB



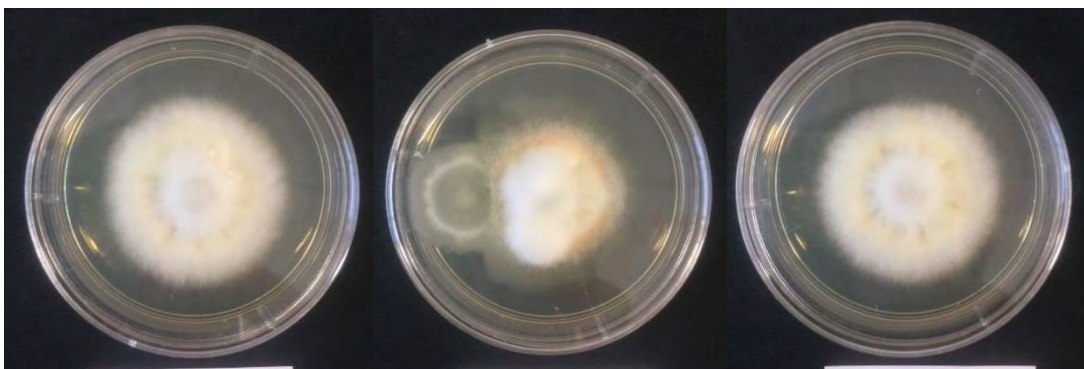
รูปที่ 4.22 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน NB



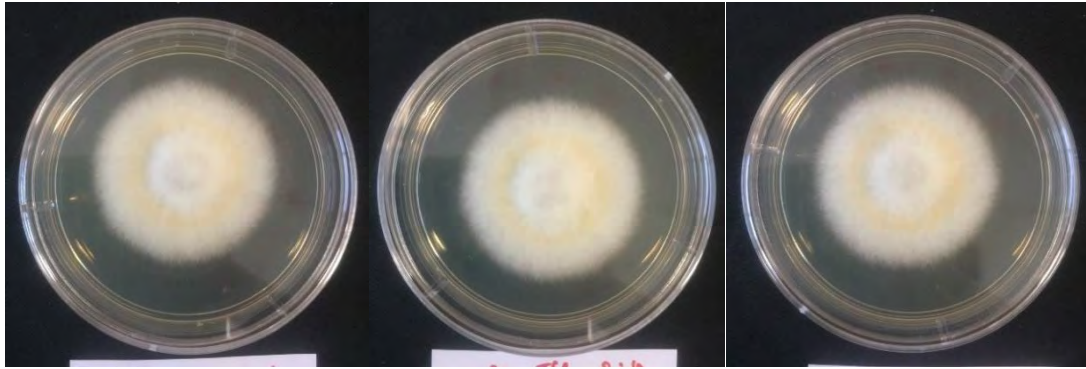
รูปที่ 4.23 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M26 ที่เลี้ยงใน TSB



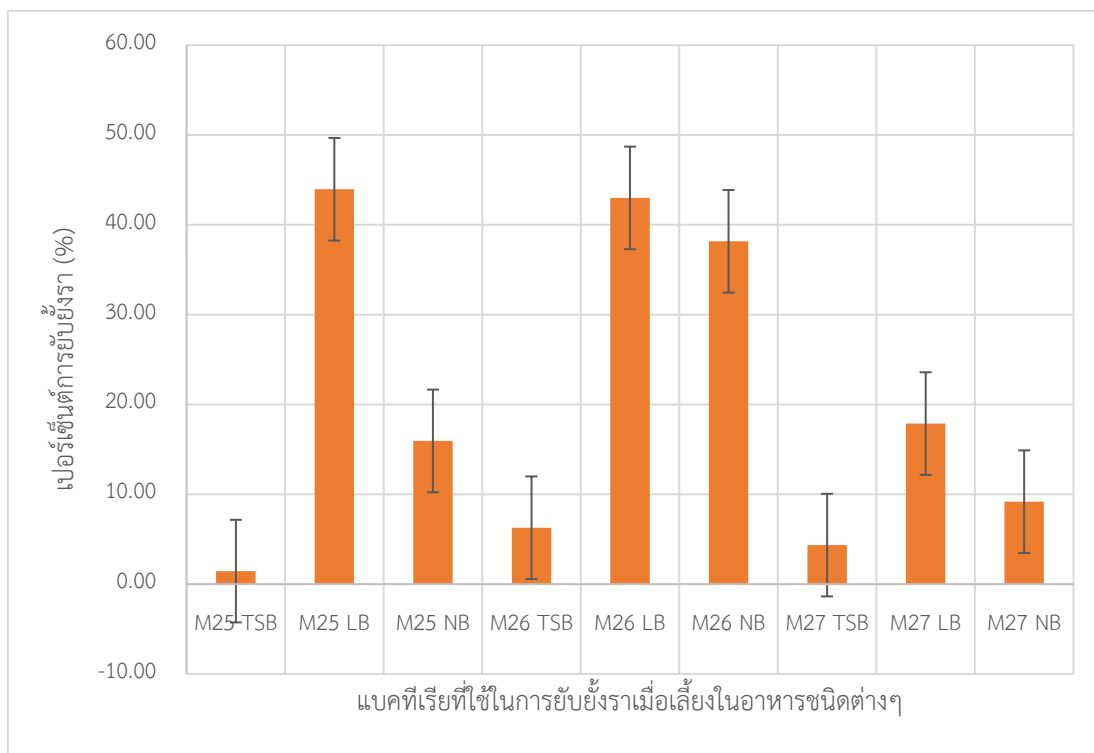
รูปที่ 4.24 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน LB



รูปที่ 4.25 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน NB



รูปที่ 4.26 การเจริญของ *F. solani* บน PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M27 ที่เลี้ยงใน TSB



รูปที่ 4.27 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. solani* ด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารชนิดต่าง ๆ

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับหากทำการทดลองต่อไป

2.2) การหา pH ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งรา

การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ในการยับยั้ง *F. solani* เมื่อเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) Broth ที่มีค่า pH แตกต่างกันได้แก่ 5.0 7.0 และ 9.0 จะได้ผลค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสูงที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยอื่นส่วนใหญ่ นั้น ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *F. solani* อยู่ในช่วง 7.0 (Hammami และคณะ, 2009)

2.3) การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา

การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ในการยับยั้ง *F. solani* เมื่อเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) Broth ที่มีค่า pH ที่เหมาะสม เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง ณ ระยะเวลาที่แตกต่างกันได้แก่ 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งรา แล้ววาดกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราต่อเวลา จะได้ผลระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสร้างสารยับยั้งราได้สูงที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าเวลาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 24 ชั่วโมง (Cook, 1996)

3) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.1) วิธีทางกายภาพโดยการย้อมสีแบคทีเรียตามหลักของการย้อมแกรม

การเขี่ยเชื้อแบคทีเรียมาย้อม Gram แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จะสามารถเห็นรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย คือ รูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) เป็นแท่ง (bacillus) หรือเป็นเกลียว (spiral) และสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้นได้ จากการติดสีย้อมตามหลัก Gram Stain คือ หากเซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีน้ำเงินอมม่วงของ Crystal Violet จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และหากเซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีแดงของ Safranin O จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* คือ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Abeyasinghe, 2007; Lim และคณะ, 1991)

3.2) วิธีทางชีวเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

การทดสอบด้วยอาหารเหลวในหลอดทดลองที่ไม่เขย่า สามารถให้ผลว่า ออกซิเจนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สนใจหรือไม่ หากมีการเจริญบริเวณผิวหน้าของอาหาร จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligated aerobic bacteria) หรือมีการเจริญบริเวณส่วนบนของอาหาร แต่ไม่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนปริมาณน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophilic bacteria หรือ microaerophile) หรือมีการเจริญบริเวณก้นหลอดทดลองเป็นจำนวนมาก จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligated anaerobic bacteria) หรือสามารถเจริญได้ทั่วทั้งหลอดทดลอง แต่มีจำนวนมากที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้ แต่

หากไม่มีออกซิเจนก็สามารถเจริญเติบโตได้เช่นกัน (facultative aerobic bacteria) หรือสามารถเจริญได้ทั่วทั้งหลอดทดลอง จะถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถทนต่อภาวะที่มีออกซิเจนได้ (aerotolerant anaerobic bacteria) โดยผลการเจริญเติบโตจะแสดงออกเป็นลักษณะขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการทดสอบการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถให้ผลว่าแบคทีเรียที่สนใจสามารถใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตได้หรือไม่ หากสามารถใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตได้ จะทำให้อาหารขุ่น ในทางกลับกัน แบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้กลูโคสในการเจริญเติบโต จะให้ผลเป็นหลอดทดลองที่มีอาหารใส ซึ่งจากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *F. solani* คือ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ดังกล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นผลการทดลองของแบคทีเรียดังกล่าวจะพบว่า เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและสามารถใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตได้ (Becker และคณะ, 1997; Slininger และคณะ, 2000)

3.3) วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยการสกัด DNA ของแบคทีเรีย

การสกัด DNA ของแบคทีเรียแล้วเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 8F และ 1492R โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส สำหรับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. นั้น ควรได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (Kaewklom และคณะ, 2014) ซึ่งเมื่อส่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จะนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งสามารถแสดงผลเป็นชื่อสกุลและสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่สนใจ และสามารถแสดงผลเป็นแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic tree) เพื่อแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งหาแบคทีเรียที่มีสมบัติผลิตเมแทบอลิต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium solani* ได้ โดยในขั้นแรกทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี dual culture ผลคือ แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้ง *F. solani* ได้ โดยแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งสูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ M27, M25 และ M26 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 39.91%, 38.97% และ 36.15% ตามลำดับ จึงนำแบคทีเรียสามอันดับแรกไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ผลการทดสอบชี้ว่า แบคทีเรีย M26 สามารถยับยั้งได้มากที่สุด ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ต่อ PDA ขณะหลอมเหลว 2:10 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 39.84% รองลงมา คือ M25 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 26.02% และ M27 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 17.07% จึงสนับสนุนได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีสมบัติในการผลิตสารเมแทบอลิต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. solani* ได้ และหลังออกมาภายนอกเซลล์ แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารชนิดใด ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดและอธิบายสมบัติของสารต่อไป

งานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาโดยใช้เทคนิค dual culture ในการยับยั้งราก่อโรคในพืชหลายชนิด โดยเทคนิคนี้สามารถใช้ศึกษาได้กับทั้งแบคทีเรีย เช่น การศึกษาซึ่งใช้ *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 ที่คัดแยกมาจากดินบริเวณโคลนชายฝั่งประเทศเกาหลี ในการยับยั้ง *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum acutatum*, *Corynespora cassicola*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Phytophthora capsica*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotiorum* (Ji และคณะ, 2013), ใช้ได้กับแอคติโนมัยซีท เช่น การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (FOC) และ *Rhizoctonia bataticola* ที่ก่อโรคในถั่วลูกไก่ โดยใช้ *Streptomyces africanus*, *Streptomyces caviscabies*, *Streptomyces setonii*, และ *Streptomyces tsusimaensis* (Gopalakrishnan และคณะ, 2011), และยังใช้ได้กับราด้วยตัวเอง เช่น การใช้ *Trichoderma harzianum* เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Botrytis fabae* ซึ่งก่อโรคจุดช็อกโกแลตในถั่ว (Bendahmane และคณะ, 2012) เป็นต้น เช่นเดียวกันแล้ว การศึกษาโดยใช้เทคนิค cell free supernatant ก็มีการใช้อย่างแพร่หลายเช่นกัน เช่น การใช้ cell free supernatant จาก *Bacillus subtilis* ET-1 ที่สร้างสาร iturin A ในการควบคุมราเขียวและราดำ (Ambrico และ Trupo, 2017) และ การใช้เทคนิค cell free supernatant ในการศึกษาพิษจาก *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัดพยาธิ *Meloidogyne incognita* ในปมราก (Mohammed และคณะ, 2008) เป็นต้น

เมื่อได้ผลจากการทดลองข้างต้นที่ทดสอบความสามารถในการยับยั้งด้วยวิธี dual culture และ cell free supernatant แล้วจึงนำมาทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *F. solani* พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อยับยั้งรา คือ Luria-Bertani Broth (LB) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 43.96%, 43.00% และ 17.87% โดยแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ รองลงมา คือ Nutrient Broth (Lagopodi และคณะ) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 15.94%, 38.16% และ 9.18% โดยแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ และน้อยที่สุดในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 1.45%, 6.28% และ 4.35% โดยแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ตามลำดับ โดยผลแตกต่างกันจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน เกิดจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปริมาณเกลือ NaCl ที่เติมลงไป รวมถึงแร่ธาตุที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดด้วย (Lakshmi และคณะ, 2014)

ตัวอย่างเช่น ในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. solani* โดย *Aspergillus tubingensis* CTM 507 พบว่าการแปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนนั้น นอกจากจะส่งผลต่อการเจริญของ *A. tubingensis* CTM 507 แล้ว ยังทำให้มีผลการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันไปด้วย (Kriaa และคณะ, 2015), และอีกตัวอย่างหนึ่งเป็นงานวิจัยซึ่งศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างโคตินเนสของ *Alcaligenes xylosoxydans* โดยการผันแปรแหล่งไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ แต่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตโคตินเนสขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Vaidya และคณะ, 2001)

จากงานวิจัยนี้แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถยับยั้ง *F. solani* ได้สูงสุด 3 อันดับแรกคือ แบคทีเรีย M25, M26 และ M27 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดย คงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีย้อมสีน้ำเงินของ crystal violet และมีรูปร่างเป็นแท่ง (bacillus) และไม่พบการสร้างเอ็นโดสปอร์ สายพันธุ์ M25 และ M26 ไม่พบการเคลื่อนที่ แต่สายพันธุ์ M27 พบว่ามีการเคลื่อนที่ได้ การศึกษาสมบัติทางชีวเคมี พบว่า เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) และใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตได้ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวเปรียบเทียบกับผลการทดลองกับคู่มือ Practical Atlas for Bacterial Identification แล้ว คงยุทธ เลิศมงคลธรรม คาดว่าแบคทีเรีย M25, M26 และ M27 อยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Corynebacterium* และ *Brochothrix* ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่แน่นอนจำเป็นต้องได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ต่อไป

สกุลของแบคทีเรียที่ตั้งสมมติฐานเบื้องต้น พบว่า มีรายงานการใช้ในการยับยั้งราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215 มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง *Mucor circinelloides*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* และ *Penicillium roqueforti* (Quattrini และคณะ, 2018), และ *L. plantarum* มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง *Erwinia amylovora* ที่ก่อโรค fire blight ในแอปเปิ้ลและลูกแพร์ (Roselló และคณะ, 2013) มีรายงานการใช้

Corynebacterium sp. ที่คัดแยกมาจาก Mandapam อ่าว Mannar เพื่อยับยั้ง *A. niger* และ *Alternaria alternata* ที่ก่อโรคในพืช (Dhinakaran และคณะ, 2012), และ *Corynebacterium xerosis* NB-2 ที่ใช้ในการควบคุมโรคใบจุดในมะกอกซึ่งมีสาเหตุจาก *Cycloconium oleaginum* (*Spilocea oleaginea*) (Al-Khatib และคณะ, 2010) เป็นต้น ส่วน *Brochothrix* ยังไม่มีรายงานว่าใช้เพื่อการควบคุมราที่ก่อโรคในพืช แต่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อสัตว์ดิบ (Dainty และ Hibbard, 1980; Russo และคณะ, 2006)

งานวิจัยนี้ทำให้พบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถยับยั้ง *F. solani* ที่ก่อโรคน้ำในมะเขือเทศได้ และยังทำให้ทราบภาวะเบื้องต้นของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 และประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร ลงวันที่ วันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2563 (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2563; ราชกิจจานุเบกษา, 2563) รวมถึงประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สืบเนื่องจากการระบาดดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองได้ครบตามที่วางแผนไว้ ซึ่งหากทำการทดลองได้ครบถ้วน จะทำให้ได้ภาวะเหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *F. solani* ได้เพิ่มเติม นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวได้แม่นยำขึ้น

ผลของการวิจัยนี้ เป็นผลจากการทดลองภายในห้องปฏิบัติการทั้งหมด จึงยังต้องการการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคน้ำกับต้นมะเขือเทศในเรือนกระจกและในแปลง เพื่อศึกษาและยืนยันว่าสามารถนำไปใช้ในการยับยั้งการเกิดโรคได้จริง นอกจากนี้ นอกเหนือจากแผนการทดลองที่วางไว้ ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราคือสารชนิดใด รวมไปถึงมีโครงสร้างและกลไกในการยับยั้งอย่างไร และยังจำเป็นต้องคำนึงถึงความเหมาะสมและความปลอดภัยสำหรับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในอนาคตด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N.S., El-Gamal, N.G., Fatouh, Y., 2006. Use of chitin and chitosan against tomato root rot disease under greenhouse conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2, 147-152.
- Abeyasinghe, S., 2007. Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01. *Ruhuna Journal of Science* 2, 82-88.
- Akköprü, A., Demir, S., 2005. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Journal of Phytopathology* 153, 544-550.
- Al-Khatib, M., Alhussaen, K., El-Banna, N., Zyadeh, M., 2010. Biological control of olive leaf spot (peacock spot disease) caused by *Cycloconium oleaginum* (*Spiloea oleaginea*). *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 2, 64-67.
- Ambrico, A., Trupo, M., 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology* 134, 5-10.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G., Märkl, H., 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 184-190.
- Bendahmane, B.S., Mahiout, D., Benzohra, I.E., Benkada, M.Y., 2012. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. *World Applied Sciences Journal* 17, 278-283.
- Bilgi, V., Bradley, C., Khot, S., Grafton, K., Rasmussen, J., 2008. Response of dry bean genotypes to Fusarium root rot, caused by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, under field and controlled conditions. *Plant Disease* 92, 1197-1200.
- Bokhari, N.A., Perveen, K., 2012. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research* 6, 7193-7197.
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A., Tichy, H.V., 1998. Biocontrol by

- phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1069-1077.
- Cook, L.K.N., 1996. Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 19, 54-58.
- Couderchet, M., 2003. Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. *Vitis*- 42, 165-171.
- Dainty, R., Hibbard, C.M., 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *Journal of Applied Bacteriology* 48, 387-396.
- Davis, R., Colyer, P., Rothrock, C., Kochman, J., 2006. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. *Plant Disease* 90, 692-703.
- Dhinakaran, A., Rajasekaran, R., Jayalakshmi, S., 2012. Antiphytopathogenic activity of bacterial protein of a marine *Corynebacterium* sp. isolated from Mandapam, Gulf of Mannar. *Journal of Biopesticides* 5, 17-22.
- Doolittle S.P., 1948. *Tomato diseases*. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Duijff, B.J., Recorbet, G., Bakker, P.A., Loper, J.E., Lemanceau, P., 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89, 1073-1079.
- Duvnjak, T., Sudarić, A., Kočar, M.M., Čosić, J., Vrandečić, K., 2016. First report of soybean Fusarium wilt caused by *Fusarium graminearum* in Croatia. *Plant Disease* 100, 648.
- El-Mohamedy, R.S., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., 2014. Control of root rot diseases of tomato plants caused by *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using different chemical plant resistance inducers. *Tunisian Journal of Plant Protection* 9, 45-55.
- Fletcher, J., Broadhurst, P., Bansal, R., 1991. *Fusarium avenaceum*: A pathogen of lentil in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19, 207-210.
- Food Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FAOSTAT database. FAO-ESS Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/OC>. 13 February 2020.

- Garibaldi, A., Gilardi, G., Matic, S., Gullino, M., 2017. First report of *Fusarium* wilt on orange coneflower (*Rudbeckia fulgida*) in northern Italy. *Plant Disease* 101, 1546-1546.
- Getha, K., Vikineswary, S., 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 303-310.
- Gleason, M.L., Edmunds, B.A., 2005. *Tomato diseases and disorders*. Iowa State University, University Extension.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B.K., Sandeep, D., Vidya, M.S., Deepthi, K., Rupela, O., 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection* 30, 1070-1078.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A., Nesme, X., 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in Applied Microbiology* 48, 253-260.
- Hannachi, I., Poli, A., Rezgui, S., Prasad, R.D., Cherif, M., 2015. Genetic and phenotypic differences of *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri* isolated from sweet orange and tangerine. *European Journal of Plant Pathology* 142, 269-280.
- Haskell, R.J., 1917. *The Fusarium Wilt of the Potato in the Hudson River Valley*, New York. Cornell University.
- Jaroszuk-Ścisęł, J., Kurek, E., Winiarczyk, K., Batur, A., Łukanowski, A., 2008. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control* 45, 297-307.
- 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, 234-242.
- Johnston, S., Springer, J., Lewis, G., 1979. *Fusarium moniliforme* as a cause of stem and crown rot of asparagus and its association with asparagus decline. *Phytopathology* 69, 778-780.

- Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Jiang, H., Liu, P., Yang, T., Bao, Z., Zhou, B., Zhou, X., Liu, X., 2014. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology* 64, 377-383.
- 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, 354-368.
- Karima, H., Nadia, G., 2012. *In vitro* study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the damping off and root rot diseases in tomatoes. *Nature and Science* 10, 16-25.
- Knapp, S., 2002. *Solanum* section *geminata* (Solanaceae). New York Botanical Garden Press, New York.
- Knapp, S., Peralta, I.E., 2016. The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koide, S., 1998. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research* 18, 1091-1101.
- Kriaa, M., Hammami, I., Sahnoun, M., Azebou, M.C., Triki, M.A., Kammoun, R., 2015. Biocontrol of tomato plant diseases caused by *Fusarium solani* using a new isolated *Aspergillus tubingensis* CTM 507 glucose oxidase. *Comptes Rendus Biologies* 338, 666-677.
- Lagopodi, A.L., Ram, A.F., Lamers, G.E., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A., Lugtenberg, B.J., Bloemberg, G.V., 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 172-179.
- Lakshmi, B., Sri, P., Devi, K.A., Hemalatha, K., 2014. Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of alkaline protease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3, 650-659.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2008. *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H.J., Pée, K.H.v., 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* 56, 688-695.

- Lim, H.-S., Kim, Y.-S., Kim, S.-D., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 510-516.
- Liu, X., Ling, J., Xiao, Z., Xie, B., Fang, Z., Yang, L., Zhang, Y., Lv, H., Yang, Y., 2017. Characterization of emerging populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causing cabbage wilt in China. *Journal of Phytopathology* 165, 813-821.
- Madhu Kumar, K., 2006. Genetic variability for yield and fusarium wilt resistance in yard long bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdcourt). Department of Plant Breeding and Genetics, College of Agriculture, Vellayani.
- Mao, W., Carroll, R., Whittington, D., 1998. Association of *Phoma terrestris*, *Pythium irregulare*, and *Fusarium acuminatum* in causing red root rot of corn. *Plant Disease* 82, 337-342.
- Mohammed, S., El Saedy, M.A., Enan, M.R., Ibrahim, N.E., Ghareeb, A., Moustafa, S.A., 2008. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Cell and Molecular Biology* 7, 57-66.
- Mwang'ombe, A.W., Kipsumbai, P.K., Kiprop, E.K., Olubayo, F.M., Ochieng, J.W., 2008. Analysis of Kenyan isolates of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* from common bean using colony characteristics, pathogenicity and microsatellite DNA. *African Journal of Biotechnology* 7, 1662-1671.
- Netzer, D., 1976. Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytoparasitica* 4, 131-136.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88, 1888-1902.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Sect. *Lycopersicon*). *Monographs In Systematic Botany* 104, 227-257.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., Knapp, S., 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs* 84, 1-186.

- Pharand, B., Carisse, O., Benhamou, N., 2002. Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Phytopathology* 92, 424-438.
- Ploetz, R.C., 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96, 653-656.
- Ploetz, R.C., 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105, 1512-1521.
- Quattrini, M., Bernardi, C., Stuknytė, M., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., Vallone, L., De Noni, I., Brasca, M., Fortina, M.G., 2018. Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Research International* 106, 936-944.
- Rojó, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* 26, 549-555.
- Romberg, M., Davis, R., 2007. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Disease* 91, 585-592.
- Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E., Montesinos, E., 2013. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology* 137, 621-633.
- Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., Villani, F., 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiology* 23, 797-802.
- Saccardo, P., 1881. *Fungi italici autographice delineati Fascs 17–28. Patavii, Italy Tabs*, 641-1120.
- Saengnak, V., Chaisiri, C., Nalumpang, S., 2013. Antagonistic *Streptomyces* species can protect chili plants against wilt disease caused by *Fusarium*. *Journal of Agricultural Technology* 9, 1895-1908.
- Siddiqui, I.A., Qureshi, S.A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., Ghaffar, A., 2000. Biological control of root rot-root knot disease complex of tomato. *Plant and Soil* 227, 163-169.
- Slininger, P., Burkhead, K., Schisler, D., Bothast, R., 2000. Isolation, identification, and accumulation of 2-acetamidophenol in liquid cultures of the wheat take-all

- biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology and Biotechnology 54, 376-381.
- Snyder, W.C., Hansen, H., 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany 27, 64-67.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E., Knapp, S., 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. Taxon 54, 43-61.
- Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A., Moretti, A., 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal of Plant Pathology 118, 165-172.
- Struszczyk, M.H., PoŚpieszny, H., Gamzazade, A., 2002. Chitin and chitosan, Part II. applications of chitosan. Polymery 47, 396-403.
- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., Lopez, M., Capel, C., Moreno, J., 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Crop Protection 26, 46-53.
- Vaidya, R., Shah, I., Vyas, P., Chhatpar, H., 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17, 691-696.
- Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. Public Library of Science: PLOS ONE 9.
- กรุง สีตะธนี, 2537. การปลูกมะเขือเทศ: ข่าวนานวิจัยและเทคโนโลยี. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 39, 58-64.
- คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จิราพร เพชรรัตน์, 2548. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
<http://www.natres.psu.ac.th/Service/sweb/article/48%20-microorganism%20for%20control.pdf>. 20 กุมภาพันธ์ 2563.
- จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2563. ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง การปิดที่ทำการเป็นการชั่วคราวเนื่องจากการแพร่ระบาดของเชื้อโรค COVID-19. <https://www.chula.ac.th/news/28502/>. 2 พฤษภาคม 2563.

- ดร.ณิ จิวเจริญ, 2555. แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืช. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญส่ง เอกพงษ์, 2555. การจัดการผลิตมะเขือเทศ ในหน่วยที่ 11 การจัดการผลิตผักวงศ์พริกและมะเขือ. เอกสารคำสอนชุดวิชาการจัดการผลิตไม้ผลและผักเชิงเศรษฐกิจ, 11-67.
- ราชกิจจานุเบกษา, 2563. ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร.
http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/069/T_0001.PDF. 2 พฤษภาคม 2563.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561. มะเขือเทศ: เนื้อที่เพาะปลูก เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ พันธุ์โรงงานและบริโภค ปี 2561.
http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/1_%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%82%E0%B8%B7%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B8%A8%2061.pdf. 13 กุมภาพันธ์ 2563.
- อนุเทพ ภาสุระ, 2557. การควบคุมเชื้อก่อโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์.
http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/pop_printer_friendly.asp?TOPIC_ID=5992. 20 กุมภาพันธ์ 2563.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, ธารทิพย์ ภาสบุตร, สุณิรัตน์ สีมะเต็อ, 2552. สำรวจ รวบรวมและจำแนกราก *Fusarium* สาเหตุโรคพืช.
<http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1865>. 13 กุมภาพันธ์ 2563.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม Luria-Bertani (LB) Agar

ซึ่งส่วนผสมสำหรับเตรียม Luria-Bertani Medium 300 มิลลิลิตร ดังต่อไปนี้

10 กรัมต่อลิตร Tryptone	3 กรัม
5 กรัมต่อลิตร Yeast Extract	1.5 กรัม
10 กรัมต่อลิตร NaCl	3 กรัม
Agar	4.5 กรัม

ผสมส่วนประกอบตามลำดับลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำเข้าหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ ก่อนนำมาเทเพลทแก้ว เพลทละ 20-25 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ให้แข็งตัว

2. การเตรียม Potato Dextrose Agar (PDA)

ซึ่งส่วนผสมสำหรับเตรียม Potato Dextrose Medium 300 มิลลิลิตร ดังต่อไปนี้

24 กรัมต่อลิตร Potato Dextrose Powder	7.2 กรัม
Agar	4.5 กรัม

ผสมส่วนประกอบตามลำดับลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำเข้าหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ ก่อนนำมาเทเพลทแก้ว เพลทละ 20-25 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ให้แข็งตัว

3. การเตรียม Luria-Bertani (LB) Broth

ซึ่งส่วนผสมสำหรับเตรียม Luria-Bertani Medium 50 มิลลิลิตร ดังต่อไปนี้

10 กรัมต่อลิตร Tryptone	0.5 กรัม
5 กรัมต่อลิตร Yeast Extract	0.25 กรัม
10 กรัมต่อลิตร NaCl	0.5 กรัม

ผสมส่วนประกอบตามลำดับลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำเข้าหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้

4. การเตรียม Nutrient Broth (Lagopodi และคณะ)

ชั่งผง Nutrient Broth Powder 0.8 กรัม สำหรับเตรียม Nutrient Medium 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร นำเข้าหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้

5. การเตรียม Tryptic Soy Broth (TSB)

ชั่งผง Tryptic Soy Medium Powder 3 กรัม สำหรับเตรียม Nutrient Medium 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร นำเข้าหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. การเตรียม 1X TAE buffer

เตรียม 1X TAE buffer จาก 50X TAE buffer ที่มีส่วนประกอบ ดังนี้

Tris Base	242 กรัม
Glacial Acetic Acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8)	100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วคำนวณเป็น 1X TAE buffer 500 มิลลิลิตร ด้วยสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ จะได้ว่าต้องปิเปต 50X TAE buffer มา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปลอดภัยให้เป็น 500 มิลลิลิตร