

การแยกและฤทธิ์ของโปรตีนต้านราก่อโรคในมะเขือเทศจาก *Bacillus* sp. M10



นางสาวประภาศรี ศรีคง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND ACTIVITY OF ANTIFUNGAL PROTEIN AGAINST FUNGAL
PATHOGENS OF TOMATO FROM *Bacillus* sp. M10



Miss Prapasri Srikhong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การแยกและฤทธิ์ของโปรตีนต้านราก่อโรคในมะเขือเทศจาก
Bacillus sp. M10

โดย

นางสาวประภาศรี ศรีคง

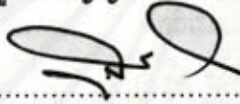
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

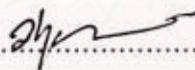


..... คณบดีคณะคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒน์ เจริญพรวัฒนา)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วศิมน เรืองเล็ก)

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกาศ ศรีคง : การแยกและฤทธิ์ของโปรตีนต้านราโรคในมะเขือเทศจาก *Bacillus* sp. M10 (ISOLATION AND ACTIVITY OF ANTIFUNGAL PROTEIN AGAINST FUNGAL PATHOGENS OF TOMATO FROM *Bacillus* sp. M10)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, 134 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรีย เอ็ม10 ซึ่งสามารถสร้างสารต้านราโรคพืชได้ศึกษาทดสอบฤทธิ์ในการต้านรา *Fusarium* sp. และ *Colletotrichum capsici* ซึ่งก่อให้เกิดโรคผลเน่าและโรคแอนแทรคโนสในมะเขือเทศ ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรีย เอ็ม10 มีสมบัติในการยับยั้งราทั้งสองชนิดได้ จากการทำปฏิกริยากับกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารออกฤทธิ์นี้เป็นสารประเภทโปรตีน และเป็นโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย เมื่อติดตามแอกทิวิตีในการยับยั้งราในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียพบว่า การสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรามีลักษณะเป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ และหลั่งออกมาในระยะ late stationary phase สำหรับการทำให้บริสุทธิ์โปรตีนประกอบด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 40-60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสารบนดีเอไอเจลอะกาโรส และพบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งรามีประจุลบและถูกชะออกมาในระหว่างการชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0-1 โมลาร์ จากการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE พบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียวและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55.35 kDa โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 11.10 เท่า มีแอกทิวิตีจำเพาะ 189.57 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน จากการทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนบนผลมะเขือเทศสายพันธุ์สีดา ห้อ และราชินี พบว่าสามารถป้องกันและยับยั้งการเกิดโรค ในมะเขือเทศทุกสายพันธุ์ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถลดขนาดของแผลบนผลมะเขือเทศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการหาค่า IC_{50} ของโปรตีนต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. พบว่ามีค่าเท่ากับ 53.05 และ 201.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและแบบส่องกราดพบว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ทำให้เส้นใยและสปอร์ของราเกิดการบวมและแตกหัก จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนโดย MALDI-TOF MS พบว่ารูปแบบของเพปไทด์มีความใกล้เคียงกับโปรตีน KatA ของ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งมีแอกทิวิตีของแคทาเลส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย เอ็ม10 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. เท่ากับ 96% จากผลการทดลองเหล่านี้ทำให้สามารถนำโปรตีนจาก *Bacillus* sp. เอ็ม10 ไปประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันและยับยั้งราดังกล่าวในมะเขือเทศได้ต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ป.ระภาณี ศรีคง.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....

4972360723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : ANTIFUNGAL / FUNGAL PATHOGEN / TOMATO / CATALASE

PRAPASRI SRIKHONG : ISOLATION AND ACTIVITY OF ANTIFUNGAL PROTEIN AGAINST FUNGAL PATHOGENS OF TOMATO FROM *Bacillus* sp. M10. THESIS ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 134 pp.

Bacteria M10 which was able to inhibit the growth of several fungal pathogens was tested against *Fusarium* sp. and *Colletotrichum capsici*, the causing agent of fruit rot and antracnose disease in tomato. It was found that bacteria M10 inhibited the growth of both fungi. Preliminary treatment of cultured medium with 1 M HCl and 1 M NaOH indicated that the active substance which was produced and secreted into the medium was protein. Testing the inhibitory activity along with the growth of bacteria, the result showed that this protein was a secondary metabolite and secreted during the late exponential phase. The purification procedure for this protein comprised 40-60% ammonium sulfate precipitation and DEAE anion exchange column chromatography. The antifungal protein had net cationic charge and was eluted during the gradient of 0-1 M sodium chloride. SDS PAGE analysis of the purified protein revealed one single band with a molecular mass of 55.35 kDa. The purity of the protein was increased to 11.10 folds and a specific activity was 189.57 AU/mg of protein. The purified protein demonstrated a great protection and inhibition on three varieties of tomato fruits; Sida, Big, and Queen as observed by smaller lesion size of tomato fruits ($P < 0.05$). The IC_{50} of the purified protein toward *Fusarium* sp. and *C. capsici* were 53.05 and 201.9 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Microscopic and scanning electron microscopy observations revealed conidial swelling and rupture of the fungal treated with such protein. Based on MALDI-TOF MS analysis, it was found that the purified protein had peptide fingerprint closest to KatA of *Bacillus amyloliquefaciens* which contains catalase activity. Bacterial identification using 16S rDNA sequencing revealed that the bacteria had 96% identity to *Bacillus* sp. This antifungal protein from *Bacillus* sp. M10 could possibly be used as a biocontrol protein to protect tomato fruits from fungal diseases.

Department : Microbiology

Student's Signature Prapasri Srikhong.....

Field of Study : Industrial Microbiology

Advisor's Signature Panan Rerngsamran.....

Academic Year : 2009

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมทั้งได้อบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา ตลอดจนได้กรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ดร. วศิมน เรืองเล็ก เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย พร้อมทั้งคำแนะนำที่มีประโยชน์สำหรับขั้นตอนการทำงานปริสฐิติสาร

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เลขา มาโนช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้อนุเคราะห์สำหรับงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และบรรลุเป้าหมายในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณยาย และพี่สาวที่น่ารัก ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่ดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	3
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.2 เคมีภัณฑ์.....	27
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	29
3.3.1 แบคทีเรีย.....	29
3.3.2 ราโรคพืช.....	29
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย.....	29
3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรา.....	29
3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	29
3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	29
3.5.2 การเก็บรักษารา.....	30
3.6 ทดสอบความสามารถของเซลล์แบคทีเรียและส่วนน้ำใส (supernatant) ในการยับยั้งราโรคพืช.....	30
3.6.1 การเตรียมแบคทีเรีย M10	30
3.6.2 การเตรียมสปอร์ราโรคพืชเพื่อใช้ศึกษาการยับยั้งราบนอาหารแข็ง	30
3.6.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้งราบนอาหารแข็ง.....	30
3.6.4 การเตรียมส่วนน้ำใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10.....	31

3.6.5 การทดสอบความสามารถของส่วนน้ำใส (supernatant) ในการยับยั้งราก่อโรคพืช	31
3.6.6 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชว่าเป็นโปรตีนหรือไม่.....	31
3.7 การแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช.....	31
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย M10.....	31
3.7.2 การหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์.....	32
3.7.3 หาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรค.....	32
3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	33
3.7.5 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน.....	33
3.7.6 การทำโปรตีน ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography).....	33
3.7.7 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).....	34
3.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรากด้วยโปรตีนที่แยกได้จากผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีดำ พันธุ์ท้อ และพันธุ์ราชินี.....	36
3.8.1 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งการเกิดโรค (inhibition)	36
3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการป้องกัน (prevention) การเกิดโรค.....	37
3.8.3 การหาความเข้มข้นที่ ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory Concentration 50%, IC ₅₀).....	37
3.8.4 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต่อรา <i>C. capsici</i>	38
3.8.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	38
3.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย.....	38
3.9.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย.....	38
3.9.2 การเตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	39
3.9.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	39
3.9.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จาก ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	40

บทที่	หน้า
3.9.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์.....	41
3.9.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ ของแบคทีเรีย.....	41
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	42
3.10.1 สถิติพรรณนา (Descriptive statistics)	42
3.10.2 สถิติวิเคราะห์ (Analysis statistics)	42
3.10.3 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Covariance)	42
4. ผลการทดลอง.....	43
4.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียและส่วนน้ำใส (supernatant) ในการ ยับยั้งราโรคพืช.....	43
4.1.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้งการเจริญของ ราบนอาหารแข็ง.....	43
4.1.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในส่วนน้ำใส (supernatant) ต่อการยับยั้งราก่อโรค.....	43
4.1.3 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราว่าเป็นโปรตีนหรือไม่.....	44
4.2 การแยกและการทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา <i>C. capsici</i> และ <i>Fusarium</i> sp.....	46
4.2.1 การหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์.....	46
4.2.2 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอน โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา.....	48
4.2.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	51
4.2.4 การทำโปรตีน ให้บริสุทธิ์โดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความ แตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography).....	52
4.2.5 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำ บริสุทธิ์ได้ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ไฟเวซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).....	54
4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคกับผลของมะเขือ เทศพันธุ์ สีดา พันธุ์ท้อ และพันธุ์ราชินี ด้วยโปรตีนที่แยกได้.....	56
4.3.1 ผลของรา <i>C. capsici</i> ต่อการเกิดโรคของมะเขือเทศพันธุ์สีดา และผล ของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	56

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>C. capsici</i> กับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา.....	57
4.3.3 ผลของรา <i>C. capsici</i> ต่อการเกิดโรคกับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	61
4.3.4 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>C. capsici</i> กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ.....	62
4.3.5 ผลของรา <i>C. capsici</i> ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	66
4.3.6 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>C. capsici</i> กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี.....	67
4.3.7 ผลของรา <i>Fusarium</i> sp. ต่อการเกิดโรค กับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	71
4.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>Fusarium</i> sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา.....	72
4.3.9 ผลของรา <i>Fusarium</i> sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	76
4.3.10 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>Fusarium</i> sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ.....	77
4.3.11 ผลของรา <i>Fusarium</i> sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ.....	81
4.3.12 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา <i>Fusarium</i> sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี.....	82
4.4 ความเข้มข้นที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory concentration 50%, IC ₅₀).....	86
4.5 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อการงอกของสปอร์และการเจริญของราโรคพืช.....	88
4.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	91
4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M10	91
4.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	91
4.7.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรีย M10.....	92

บทที่	หน้า
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	93
รายการอ้างอิง.....	99
ภาคผนวก.....	108
ภาคผนวก ก.....	109
ภาคผนวก ข.....	111
ภาคผนวก ค.....	117
ภาคผนวก ง.....	119
ภาคผนวก จ.....	122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	134



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การนำเข้าและการส่งออกของมะเขือเทศในปี 2545	6
2.2	แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมะเขือเทศ (ต่อ 100 กรัม ของมะเขือเทศ).....	7
2.3	แสดงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะ.....	14
2.4	ตัวอย่างสารต้านราที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	17
2.5	หมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ	22
2.6	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ	23
2.7	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก.....	24
4.1	การยับยั้งการเจริญของราจากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40%, 40-60% และ 60-80%.....	49
4.2	การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่มีฤทธิ์ ในการยับยั้งรา <i>C. capsici</i>	51
4.3	ขั้นตอนการทำโปรตีนจากแบคทีเรีย M10 ให้บริสุทธิ์.....	54
4.4	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> บนผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา	57
4.5	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> บนผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ	62
4.6	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> บนผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี	67
4.7	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา.....	72
4.8	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้ง และป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ.....	77

ตารางที่		หน้า
4.9	ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจ ากรา <i>Fusarium</i> sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี.....	82
4.10	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืช±ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน โดยโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	86
4.11	ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนที่ทำ บริสุทธิ์ได้ พร้อมกับค่าสมการ การถดถอย.....	88

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 สปอร์ (conidia) (ซ้าย) และ acervulus (ขวา) ของ <i>Colletotrichum</i>	9
2.2 อาการของโรคแอนแทรคโนสของมะเขือเทศ.....	10
2.3 macroconidia (ซ้าย) และ microconidia (ขวา) ของรา <i>Fusarium</i> sp.....	11
2.4 อาการของโรคผลเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจาก <i>Fusarium</i> sp.	12
2.5 แสดงคอกลมโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบ และคอกลมโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก	21
4.1 แสดงบริเวณยับยั้ง ของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้ง <i>C. capsici</i> [a] และ <i>Fusarium</i> sp. [b].....	43
4.2 แสดงบริเวณยับยั้ง โดยส่น้ำไนโตรเจนของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10 ต่อการยับยั้ง <i>C. capsici</i> [a] และ <i>Fusarium</i> sp. [b]	44
4.3 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาณ 100 ไมโครลิตร [b] กับ <i>C. capsici</i>	45
4.4 แสดง การทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาณ 100 ไมโครลิตร [b] กับ <i>C. capsici</i>	45
4.5 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาณ 100 ไมโครลิตร [b] กับ <i>Fusarium</i> sp.....	46
4.6 แสดง การทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาณ 100 ไมโครลิตร [b] กับ <i>Fusarium</i> sp.....	46
4.7 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย M10.....	47
4.8 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา <i>C. capsici</i> และรา <i>Fusarium</i> sp. โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย M10 ในชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 ตามลำดับ.....	47
4.9 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา <i>C. capsici</i> และ <i>Fusarium</i> sp. โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย M10 ในชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 [A, B, และ C ตามลำดับ]	48
4.10 การยับยั้งการเจริญของ <i>C. capsici</i> ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% [a] ช่วง 40-60% [b] และช่วง 60-80% [c].....	50
4.11 การยับยั้งการเจริญของ <i>Fusarium</i> sp. ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% [a] ช่วง 40-60% [b] และช่วง 60-80% [c].....	50

ภาพที่	หน้า
4.12 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ.....	52
4.13 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญของ <i>C. capsici</i> โดยโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และโปรตีนบริสุทธิ์ที่ชะจากคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนในช่วง 40-60% และ อาหารเลี้ยงเชื้อ (NB).....	53
4.14 การวิเคราะห์น้ำหนัก โมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส.....	55
4.15 แสดงการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a] ผลมะเขือเทศสีดา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]	56
4.16 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีดาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์.....	58
4.17 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a] ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	59
4.18 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])	59
4.19 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])	60
4.20 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	60
4.21 แสดงการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c].....	61

ภาพที่	หน้า	
4.22	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์.....	63
4.23	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])	64
4.24	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	64
4.25	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	65
4.26	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	65
4.27	แสดงการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c].....	66
4.28	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>C. capsici</i> โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์.....	68
4.29	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	69
4.30	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	69

ภาพที่	หน้า
4.31 แสดงผลทดสอบ ฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]) 70	70
4.32 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้อง กันการเกิดโรคจากรา <i>C. capsici</i> ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]) 70	70
4.33 แสดงการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศสีดา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และ ผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]..... 71	71
4.34 เปรียบเทียบการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีดาเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีน บริสุทธิ์..... 73	73
4.35 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])..... 74	74
4.36 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])..... 74	74
4.37 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]) 75	75
4.38 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])..... 75	75
4.39 แสดงการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผล ของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]..... 76	76

ภาพที่	หน้า	
4.40	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ เปรียบเทียบ กับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีน บริสุทธิ์.....	78
4.41	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	79
4.42	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	79
4.43	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	80
4.44	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	80
4.45	แสดงการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และ ผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c].....	81
4.46	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา <i>Fusarium</i> sp. โดยโปรตีน บริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี เปรียบเทียบ กับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีน บริสุทธิ์.....	83
4.47	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])	84
4.48	แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของ โปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสาร แขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	84

ภาพที่	หน้า
4.49 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])	85
4.50 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา <i>Fusarium</i> sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c]).....	85
4.51 การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชโดยโปรตีนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ...	87
4.52 แสดงลักษณะสปอร์ของรา <i>C. capsici</i> ในชุดควบคุม [a] และ ในชุดทดสอบ [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	89
4.53 แสดงลักษณะสปอร์ของรา <i>Fusarium</i> sp. ในชุดควบคุม [a] และ ในชุดทดสอบ [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	89
4.54 แสดงลักษณะสปอร์ของรา <i>C. capsici</i> ในวันที่ 1 [a] วันที่ 2 [b] และวันที่ 3 [c] ภายหลังบ่มกับโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	90
4.55 แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของรา <i>C. capsici</i> ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2,500 เท่า.....	90
4.56 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	92
5.1 แสดงปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์ โปรตีนเนสเคกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ข้าว) และปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. M10 กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ข้าว).....	95

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ซึ่งผลผลิตที่ได้นอกจากจะใช้เพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังเป็นสินค้าส่งออกซึ่งสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรและประเทศในแต่ละปีอย่างมาก ดังนั้นรายได้ส่วนใหญ่ของประชากรและของประเทศจึงมาจากสินค้าการเกษตรเป็นสำคัญ ทั้งนี้ยังไม่รวมถึงกิจกรรมสาขาอื่น ๆ ซึ่งต้องอาศัยผลผลิตการเกษตรเป็นปัจจัยขั้นปฐมในการผลิต ซึ่งถ้าหากรวมเข้าด้วยกันแล้วความสำคัญของการเกษตรจะเพิ่มขึ้นอีกเป็นทวีคูณ ในด้านการค้ากับต่างประเทศ นั้นสินค้าส่งออกส่วนใหญ่ของประเทศเป็นสินค้าที่เป็นผลผลิตทางเกษตรทั้งสิ้น ดังนั้นแนวทางการพัฒนาเศรษฐกิจส่วนรวมจึงต้องมุ่งไปในการพัฒนาการเกษตรให้เจริญขึ้นก่อนเพื่อชักจูงและสนับสนุนให้สาขาอื่น ๆ ได้เจริญตามไปด้วย

มะเขือเทศเป็นสินค้าออกที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ โดยพบว่าในปี 2541 การส่งออกมะเขือเทศสดต่อปีมีปริมาณ 1,170 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9.4 ล้านบาท และมะเขือเทศอุตสาหกรรมมีการส่งออกปริมาณ 9,834 ตัน คิดเป็นมูลค่า 234 ล้านบาท (ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย, 2551) แนวโน้มปริมาณการส่งออกมะเขือเทศสดและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี จึงทำให้มะเขือเทศเป็นพืชที่ทำรายได้ให้กับประเทศค่อนข้างมาก แต่อย่างไรก็ตามมักพบว่ามะเขือเทศเกิดโรคได้ง่ายโดยมีสาเหตุมา จาการเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีการแพร่ระบาดของโรคโดยสปอร์ โดยมี น้ำ ลมหรือสิ่งมีชีวิตเป็นพาหะ ตัวอย่างของโรคที่มักพบว่าเกิดกับมะเขือเทศ และมีสาเหตุมาจากการ ได้แก่ โรคใบจุดวง (early blight) ที่มีสาเหตุมาจากการ *Alternaria solani* โรคแห้งดำ (leaf blight) ที่มีสาเหตุมาจากการ *Stemphylium* sp. โรคใบไหม้ (late blight) ที่มีสาเหตุมาจากการ *Phytophthora infestans* โรคครากำมะหยี่ (leaf mold) ที่มีสาเหตุมาจากการ *Cladosporium fulvum* และที่สำคัญคือ โรคแอนแทรกคโนสที่มีสาเหตุมาจากการ *Colletotrichum capsici* และโรคเหี่ยวเหลือง (wilt) ที่มีสาเหตุมาจากการ *Fusarium oxysporum* ที่พบว่าแพร่ระบาดมากในประเทศไทย (กลุ่มงานโรคพืช, 2551) นอกจากนี้ยังประสบกับปัญหาของมะเขือเทศที่ เกิดขึ้นภายหลังการเก็บเกี่ยวด้วย โดยมีรายงานว่า 25% ของพืชผลที่เก็บเกี่ยวแล้วมีการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการได้มากถึง 50% (Spadaro และ Gullino, 2004) โรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดกับมะเขือเทศส่วนใหญ่ทำให้เกิดผลเน่า โดยมีสาเหตุมาจากการหลายชนิด ตัวอย่างเช่น โรคผลเน่าจาก เชื้อ *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp. และ

Fusarium spp. นอกจากนี้ยังพบการเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. และโรคจุดดำจากเชื้อ *Corynespora cassiicola* เป็นต้น (Mahovic และคณะ, 2004)

เกษตรกรมัก ป้องกันการเกิด โรคของมะเขือเทศที่เกิด จากราโดยการคลุมเมล็ดกับสาร ป้องกันกำจัดราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทไฮโดรไดโอน และหากในแปลงปลูก มะเขือเทศเกิดการระบาดของโรคเหล่านี้ เกษตรกรมักแก้ไขโดยการพ่นแปลงที่ปลูกมะเขือเทศด้วย สารป้องกันกำจัดรา เช่น ไฮโดรไดโอนและทาโลนิล อย่างไรก็ตาม การป้องกันและการกำจัด การเกิดโรคโดยการใส่สารเคมีก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงมากและทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อสารเคมีดังกล่าวด้วย (วิโรจน์ สุนทรภัก และ เจริญ จินเจียม , 2550) นอกจากนี้การป้องกันและกำจัดราก็ทำได้ด้วย สารเคมียังก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อมและเกิดสารพิษตกค้าง ในผลผลิตที่กำจัดออกได้ยาก ซึ่งส่งผลถึงสุขภาพของผู้บริโภคและเกษตรกรเองอีกด้วย (Korsten และคณะ, 1988)

เพื่อลดปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืช ที่มีสาเหตุจากราโดยวิธี อื่นที่ไม่ใช้สารเคมีขึ้นมาทดแทน วิธีหนึ่งที่ได้ผลดีและมีการแนะนำให้เกษตรกรนำมาใช้คือ การ ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็น ปฏิปักษ์ (antagonist) ต่อราโรคพืช โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีสมบัติในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของราสาเหตุโรคพืชได้ ข้อดีของการใช้สารปฏิชีวนะคือ มีความจำเพาะในการกำจัด ศัตรูพืชชนิดที่เฉพาะเท่านั้น โดยไม่ทำอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์อื่นๆ รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดความ เป็นพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและสภาพแวดล้อมอีกด้วย (Theis และ Stahl, 2004)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่อุดมสมบูรณ์ในจังหวัดกาญจนบุรี (คง ยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) และพบว่าแบคทีเรีย M10 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ รา *C. capsici* และควบคุมการเจริญของรา *Fusarium* sp. ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผล มะเขือเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรีย M10 มาศึกษาเพิ่มเติมถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการหลั่ง สารออกฤทธิ์ จากนั้นแยกและทำบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ดังกล่าวเพื่อนำไปทดสอบผลที่มีต่อราโรคพืช ในอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผลมะเขือเทศ รวมทั้งตรวจสอบสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ และ พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M10 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำสารที่ คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งและป้องกันราที่เกิดกับมะเขือเทศภายหลังการเก็บเกี่ยวได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

แยกและทดสอบฤทธิ์ของสารต้านราต่อโรคในมะเขือเทศจากแบคทีเรีย M10

ปริทรรศน์วรรณกรรม

มะเขือเทศและความสำคัญ

มะเขือเทศเป็นพืช ผักที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* (วรรณวิทย์ คนขยัน, 2551) จัดเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และนับวันยิ่งมีความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากผลของมะเขือเทศสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น นำมาประกอบอาหารหรือบริโภคสด และสามารถนำไปแปรรูปเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการเกษตรได้อย่างกว้างขวาง เช่น น้ำมะเขือเทศ ซอสมะเขือเทศ เป็นต้น ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) รัฐบาลได้เห็นถึงความสำคัญของมะเขือเทศ จึงกำหนดให้เป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่กำหนดไว้ในแผนพัฒนาฯ นี้ โดยเน้นในเรื่องการปรับปรุงคุณภาพและให้ความสำคัญในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์ และคณะ, 2531)

ตลาดส่งออกมะเขือเทศที่สำคัญของไทยคือ ฮองกง เนื่องจากประเทศนี้นำเข้ามะเขือเทศในแต่ละปีคิดเป็นประมาณร้อยละ 80-90 ของการส่งออกทั้งหมดของประเทศไทย และประเทศที่รับซื้อมะเขือเทศจากไทยรองลงมาคือ มาเลเซีย สิงคโปร์ บรูไน และซาอุดีอาระเบีย สำหรับประเทศที่เป็นคู่แข่งในการส่งออกมะเขือเทศของไทย ได้แก่ ไต้หวัน สาธารณรัฐประชาชนจีน ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย ทั้งนี้เนื่องจากมะเขือเทศจากประเทศต่างๆ เหล่านี้มีราคาถูกกว่าประเทศไทย (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์ และคณะ, 2531) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเร่งพัฒนาคุณภาพของมะเขือเทศเพื่อให้เป็นที่ต้องการของตลาดโลก พร้อมทั้งลดปัญหาประเทศคู่แข่งในการส่งออกมะเขือเทศของไทยด้วย

ประวัติและถิ่นกำเนิด

มีผู้สันนิษฐานกันว่า มะเขือเทศมีถิ่นกำเนิดในบริเวณแถบอเมริกาใต้ โดยเฉพาะในบริเวณที่ราบสูงของประเทศเปรูเนื่องจากพบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมของมะเขือเทศเป็นจำนวนมากในบริเวณนี้และยังเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ กันในประเทศเปรู ต่อมาพบว่าประเทศ เม็กซิโก

โคลัมเบีย และโบลิเวีย ได้มีการนำมะเขือเทศมาเป็นพืชที่ปลูกเพื่อการบริโภคด้วย และในศตวรรษที่ 16 มะเขือเทศได้นำมาปลูกในทวีปยุโรป และแถบเอเชีย โดยพ่อค้าชาวยุโรป หลังจากนั้นก็ได้แพร่กระจายไปปลูกที่ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกา (Peralta และ Spooner, 2001)

สำหรับการนำมะเขือเทศเข้ามาปลูกในประเทศไทยนั้น ไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่ามีการนำเข้ามาปลูกตั้งแต่เมื่อใด แต่เชื่อว่ามีปลูกมาก่อนปี พ.ศ. 2472 เนื่องจากในหนังสือกสิกรรมเล่มที่ 10 ปีที่ 3 พ.ศ. 2472 ได้กล่าวถึงมะเขือเทศว่ามีภา รทดลองปลูกที่โรงเรียนฝึกหัดครูประถมกสิกรรมทับกวาง (วรรณวิทย์ คนชัยัน, 2551) นอกจากนี้ในหนังสือยังได้กล่าวถึงมะเขือเทศพันธุ์ *L. pimpinellifolium* ซึ่งเป็นมะเขือเทศสายพันธุ์แรกที่น่าเข้ามาปลูกในประเทศไทย ซึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยเรียกกันว่า “มะเขือเครือ อ” ต่อมาคณะอาจารย์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และนักวิชาการจากกรมกสิกรรมได้นำมะเขือเทศพันธุ์ Porter หรือพันธุ์สีดา จากประเทศสหรัฐอเมริกาเข้ามาปลูกและได้มีการพัฒนาทางด้านพันธุ์ของมะเขือเทศกันมากขึ้น (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์ และคณะ, 2531)

พันธุ์มะเขือเทศ

พันธุ์มะเขือเทศที่ปลูกในประเทศไทย ส่วนใหญ่มักนำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ ซึ่ง เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์ และคณะ (2531) ได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้รับประทานสด และพันธุ์มะเขือเทศที่ปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม สำหรับพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้รับประทานสด พบว่ามีทั้งขนาดผลเล็กและผลใหญ่ ถ้าเป็นผลเล็กมักนิยมปลูกพันธุ์ที่ให้ผลสีชมพูมากกว่าสีแดง สำหรับผลใหญ่จะมีลักษณะคล้ายผลแอปเปิ้ล เนื่องจากเมื่อสุกจะมีสีแดงเข้ม เนื้อหนาแข็ง เปลือกไม่เหนียว ได้แก่ พันธุ์มานาปาล พันธุ์ฟลอราเดล พันธุ์มาร์โกลบ พันธุ์มาสเตอร์เบอร์ 2 พันธุ์คาลิปโซ พันธุ์เซอร์รี่ พันธุ์ราชินี และพันธุ์สีดา มก. ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ประเทศไทยนิยมปลูกเพื่อใช้ในการประกอบอาหารมากที่สุด เนื่องจากสามารถปลูกได้เกือบทุกสภาพภูมิอากาศและดินต่างๆได้ดี ส่วนพันธุ์มะเขือเทศที่ปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมนั้น จะมีสมบัติที่เฉพาะ ได้แก่ ผลต้องสุกพร้อมกันเป็นส่วนใหญ่ การเก็บเกี่ยวง่าย มีเนื้อมาก น้ำน้อย มีเมล็ดน้อยหรือใส่กลวง เปลือกหนาและเหนียว เนื่องจากต้องขนส่งในระยะทางไกลๆ ผลมะเขือเทศจะได้ไม่ช้ำและหลังการเก็บเกี่ยวผลมะเขือเทศควรเก็บไว้ได้นานโดยที่ไม่เน่าเสียง่าย ตัวอย่างเช่น พันธุ์วีเอฟ 134-1-2 พันธุ์โรมา พันธุ์คาลเจ และ พันธุ์เฟซเซเตอร์ 502 เป็นต้น

อย่างไรก็ตามทั้งพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้รับประทานผลสดและส่งโรงงานอุตสาหกรรมจะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในการเลือก มะเขือเทศพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งมาปลูกจึงควรมีการศึกษาถึงเรื่องสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศในแต่ละภาค รวมทั้งชนิดของดินและความต้องการของตลาดด้วย

สถานการณ์การตลาดมะเขือเทศ

สำหรับตลาดภายในประเทศนั้น มีรายงานว่าในปี 2540-2541 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศรวมทั้งสิ้น 55,404 ไร่ คิดเป็น ผลผลิตเฉลี่ย 2,984 กก./ไร่ โดยแยกเป็นพันธุ์ที่ปลูกมะเขือเทศบริโภคสด 28,209 ไร่ มีผลผลิตเฉลี่ย 2,047 กก./ไร่ ส่วนพันธุ์ที่นิยมใช้คือ พันธุ์สีดา ทิพย์ สีดา และเชอริ พื้นที่ที่ปลูกมะเขือเทศส่งโรงงาน 27,195 ไร่ มีผลผลิตเฉลี่ย 3,956 กก./ไร่ พันธุ์ที่นิยมใช้คือ เบต้า เดลต้า บีโต้ 94 และ TW 4 เป็นต้น (ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย, 2551) การผลิตมะเขือเทศที่ผ่านมาส่วใหญ่มีปัญหาเนื่องจากในแต่ละปีมีการผลิตที่ไม่แน่นอน มีการเปลี่ยนแปลงของผลผลิตมะเขือเทศอยู่ตลอดปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การผลิตของภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นสำคัญเนื่องจากเป็นแหล่งผลิตหลัก

ส่วนตลาดภายนอกนั้น มีรายงานว่าการผลิตมะเขือเทศของโลกส่วนใหญ่มีราคาไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับฤดูกาล ในช่วงฤดูหนาวจะได้ผลผลิตสูงทำให้ตัวผลผลิตราคาต่ำ แต่ช่วงฤดูฝนหรือฤดูร้อนจะได้ผลผลิตในปริมาณน้อยมะเขือเทศจะมีราคาสูง ดังนั้นในต่างประเทศจึงมักแปรรูปมะเขือเทศแล้วส่งออกจำหน่ายในตลาดโลกเนื่องจากผลิตภัณฑ์แปรรูปเก็บไว้รับประทานได้นานและยังคงคุณค่าทางอาหารไว้ได้อีกด้วย (ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย, 2551)

ประเทศไทยมีทั้งการนำเข้าและการส่งออกมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการนำเข้าและการส่งออกผลผลิตของมะเขือเทศประเภทต่างๆ ได้แก่ มะเขือเทศสดหรือแช่เย็น มะเขือเทศทั้งผลหรือเป็นชิ้นปรุงแต่ง ซอสมะเขือเทศ และน้ำมะเขือเทศ แล้วพบว่า ประเทศไทยยังมีการส่งออกผลผลิตของมะเขือเทศมากกว่า การนำเข้าอย่างมาก และดังนั้นจึงทำรายได้ให้กับประเทศได้มากด้วยเช่นกัน ดังตัวอย่างในปี พ.ศ. 2545 ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การนำเข้าและการส่งออกของมะเขือเทศในปี 2545

ประเภท	ผลผลิตที่นำเข้า		ผลผลิตที่ส่งออก	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
มะเขือเทศสดหรือแช่เย็น	8.69	0.06	697.4	6.10
มะเขือเทศทั้งผลหรือเป็นชิ้นปรุงแต่ง	112	5.02	3,069.78	75
มะเขือเทศอื่นๆปรุงแต่งไม่ให้เสีย	2,771	66.87	578.68	17.23
ซอสมะเขือเทศ	1,402	41.63	3,603.24	18.43
น้ำมะเขือเทศ	59	2.51	494.64	18.43

ที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร (2551)

สารสำคัญที่พบในมะเขือเทศและคุณค่าทางโภชนาการ

จากการรายงานของ Palamakumbura (1987) พบว่าในผลมะเขือเทศอุดมไปด้วยวิตามินเอและวิตามินซี ซึ่งช่วยในการบำรุงเลือดและช่วยเพิ่มรสชาติให้อาหาร นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2 นอกจากนี้ Rodriguez-Muñoz และคณะ (2009) ยังพบสารจำพวกแคโรทีนอยด์ หรือสารเบต้า -แคโรทีน ชื่อไลโคพีน (lycopene) ซึ่งเป็นสารสีแดง ช่วยป้องกันและต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งต่างๆได้ โดยมีรายงานว่าเม็ดทุเรียนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมดลูกและมะเร็งปอด อีกทั้งยังเป็นส่วนผสมในตำรับยาที่ใช้ป้องกันอันตรายอันเกิดจากการผลิตอนุมูลอิสระที่ผิดปกติด้วย (Rodriguez-Muñoz และคณะ, 2009)

มะเขือเทศ เป็นพืชที่เติบโตเร็ว ให้ผลผลิตเร็ว และเป็นแหล่งของวิตามินที่สำคัญมากมาย รวมทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีรายงานว่าใน 100 กรัม ของผลมะเขือเทศที่รับประทานสด มีคุณค่าทางโภชนาการดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมะเขือเทศ (ต่อ 100 กรัม ของมะเขือเทศ)

พลังงาน	20 แคลอรี
ไนอะซิน (Niacin)	0.6 มิลลิกรัม
คาร์โบไฮเดรต	4.2 กรัม
เส้นใย	0.7 กรัม
โปรตีน	1.2 กรัม
แคลเซียม	0.7 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	30 มิลลิกรัม
เหล็ก	0.6 มิลลิกรัม
วิตามินเอ	842 หน่วยสากล (I.U.)
วิตามินบี 1	0.06 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	0.04 มิลลิกรัม
วิตามินซี	23 มิลลิกรัม

ที่มา : เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์ และคณะ (2531)

โรคของมะเขือเทศ

มะเขือเทศเป็นพืชที่มีโรคทำความเสียหายได้หลายโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตลดลง คุณภาพไม่ได้มาตรฐาน สาเหตุของโรคสามารถเกิดได้จากทั้งรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลง โดยพบว่าราเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแก่พืชมากที่สุด และทำให้เกิดอาการประเภทต่างๆ บนพืชมากที่สุด (Gleason และ Edmunds, 2006) โดยมีการประมาณไว้ว่า โรคพืชที่เกิดจากรามีมากกว่า 80% ของโรคพืชที่เกิดขึ้นทั้งหมด (Agrios, 1997) ดังนั้นในที่นี้จะกล่าวถึงเพียงโรคพืชที่เกิดจากราที่พบได้บ่อยในมะเขือเทศเท่านั้น

ราและกลไกการเกิดโรค

การเกิดโรคในพืชที่มีสาเหตุจากราเกิดขึ้นเมื่อส่วนหนึ่งส่วนใดของราซึ่งปกติมักจะเป็นสปอร์ไปสัมผัสกับพืช จากนั้นสปอร์จะงอกเข้าไปภายในส่วนต่างๆของพืช การเข้าสู่พืชของราสามารถเข้าได้ 3 ทาง ได้แก่ 1) การเข้าทางบาดแผล 2) การเข้าทางช่องเปิดทางธรรมชาติ (natural opening) ซึ่งได้แก่ ปากใบ ช่องเปิดปลายใบ รอยแตกตามธรรมชาติที่ลำต้นและราก เป็นต้น และ

3) การเข้าโดยตรงทางชั้นเคลือบผิว (cuticle) และเซลล์ผิว (direct penetration) (Howard และ Valent, 1996)

หลังจากที่ราเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชแล้ว ราจะใช้อาหารจากพืชเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ ทำให้พืชเกิดการขาดอาหาร และเป็นสาเหตุทำให้พืชเกิดอาการของโรคขึ้น นอกจากนี้อาการของโรคที่เกิดจากการขาดอาหารเนื่องจากราเป็นสาเหตุโดยตรงแล้ว อาการของโรคยังเกิดจากราได้โดยทางอ้อม โดยที่ราปล่อยสารต่างๆออกมาแล้วไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกิจกรรมเมแทบอลิซึมของเนื้อเยื่อพืช สารที่ราสร้างขึ้นดังกล่าว ได้แก่ เอนไซม์ ทอกซิน สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ เป็นต้น ราวางชนิดอาจสร้างสารเพียงชนิดเดียว บางชนิดก็สร้างหลายชนิดรวมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ สารต่างๆเหล่านี้อาจทำลายเซลล์พืชโดยตรงหรือมีอิทธิพลกับกลไกที่ควบคุมขบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆในเซลล์ (Kosuge และ Nester, 1989)

ในกรณีของโรคที่เกิดภายหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับผลผลิตของพืช ในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการขนส่งจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดบาดแผลขึ้น ซึ่งหลังจากนั้นราฉวยโอกาส (opportunistic fungi) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติก็สามารถเจริญเข้าไปในพืชผลทางการเกษตรและก่อให้เกิดโรคต่อไปได้ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการตั้งแต่การเข้าสู่เซลล์พืชไปจนถึงการก่อโรคนั้น ราจะเพิ่มจำนวนและสืบพันธุ์รวมทั้งปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโครงสร้างของพืชและทำให้พืชผลข้างเคียงติดเชื้อไปด้วย (Mahovic และคณะ, 2004)

โรคของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากรา

โรคพืชของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากรา ได้แก่ โรคเหี่ยวที่เกิดจาก *Fusarium oxysporum* โรคโคนเน่าที่เกิดจาก *Sclerotium rolfsii* โรคใบจุดวงแหวนที่เกิดจาก *Alternaria solani* โรคใบไหม้ที่เกิดจาก *Phytophthora infestans* โรครากำมะหยี่สีเขียวที่เกิดจาก *Cladosporium fluvum* โรคใบจุดเทาที่เกิดจาก *Stemphylium solani* โรครากำมะหยี่สีเทาที่เกิดจาก *Cercospora fuligena* โรคแผลจุดขาวที่เกิดจาก *Septoria lycopersici* และโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจาก *Colletotrichum phomoides* เป็นต้น (นิพนธ์ ไชยมงคล, 2552)

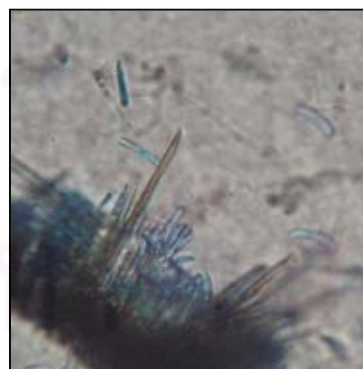
สำหรับโรคที่มีสาเหตุจากราที่เกิดภายหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว ราสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อของมะเขือเทศผ่านทางบาดแผลที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บเกี่ยวหรือในระหว่างการขนส่ง และรา

ที่ก่อให้เกิดโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวนี้อาจเกิดได้จากทั้งราที่ติดเชื้อมาจากแปลงปลูกหรือจากการปนเปื้อนก็ได้ ตัวอย่างของโรคเหล่านี้ ได้แก่ โรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp. และ *Fusarium* spp. นอกจากนี้ยังพบการเกิดโรคแอนแทรกคโนสจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. และโรคจุดดำจากเชื้อ *Corynespora cassiicola* เป็นต้น (Mahovic และคณะ, 2004) ในเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยนี้จะสนใจเพียงโรคผลเน่าที่เกิดจาก *Fusarium* sp. และโรคแอนแทรกคโนสที่เกิดจาก *Colletotrichum* sp. เท่านั้น ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละโรคดังนี้

โรคแอนแทรกคโนส

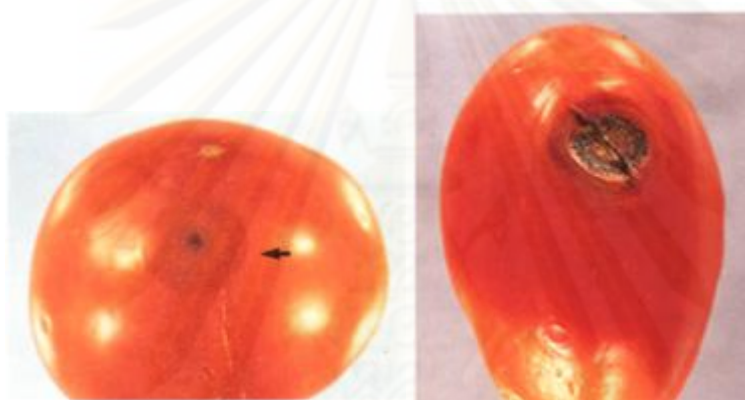
โรคแอนแทรกคโนสมีเชื้อสาเหตุจากราในสกุล *Colletotrichum* เช่น *C. capsici*, *C. coccodes* และ *C. gloeosporioides* เป็นต้น ราสกุลนี้จัดอยู่ใน Kingdom Fungi, Phylum Ascomycota (Roberts และคณะ, 2009)

ลักษณะทั่วไปของราในสกุล *Colletotrichum* นั้น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างสปอร์ (conidia) ซึ่งมีลักษณะโค้งคล้ายรูปเคียว (falcate) ไม่มีผนังกันเซลล์ มีขนาดเล็กประมาณ 14-31 x 3-5 ไมโครเมตร ลักษณะสีน้ำตาลหรือสีดำ (Bowden และ คณะ, 1984) สปอร์จะถูกสร้างภายในโครงสร้างที่เรียกว่า acervulus ซึ่งจะมีโครงสร้างคล้ายหนามแหลมสีดำ (black spines) ที่เรียกว่า setae อยู่เป็นจำนวนมาก (Roberts และคณะ, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างแอสโคสปอร์อยู่ในถุง (ascus) และบรรจุอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า perithecium (Agrios, 1997)



รูปที่ 2.1 สปอร์ (conidia) (ซ้าย) และ acervulus (ขวา) ของ *Colletotrichum*

อาการ (symptom) ของโรคแอนแทรกโนสมักเห็นได้ชัดเจนในระยะการติดผลโดยเฉพาะผลที่สุก ซึ่งจะพบอาการเริ่มแรกบริเวณผิวของผลที่จะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ และนุ่มลงไปเพียงเล็กน้อย เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น อากาศชื้น ผลมะเขือเทศจะเริ่มเกิดอาการเน่า (fruit rot) โดยราจะสร้างเส้นใยคลุมบริเวณชั้นผิว (epidermis) ของผล (Kamara และคณะ, 1989) จากนั้นจะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นวงสีดำซ้อนกันเป็นวง และกระจายไปตามวงกว้างของแผล เมื่ออาการลุกลามจะเห็นเป็นลักษณะเป็นปุ่มสีดำเล็กๆ ของ acervulus ซึ่งภายในจะบรรจุสปอร์ของราและเกิดเมือกสีส้มถึงเทาดำออกมา ซึ่งก็คือกลุ่มของสปอร์ (Gleason และ Edmunds, 2006) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 อาการของโรคแอนแทรกโนสของมะเขือเทศ (<http://www.public.iastate.edu/~taber/Extension/tomatoes/tomatoes.html>)

สำหรับวงจรการเกิดโรค (disease cycle) นั้น ในภาวะที่ไม่เหมาะสมราสามารถอยู่รอดได้โดยพักตัวอยู่ในเมล็ดพืชและสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ เมื่อภาวะแวดล้อมที่ชื้น อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส หรือในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นสภาพที่เอื้อต่อการเจริญของรา ราจะสร้าง acervulus ขึ้นมาใหม่ ซึ่งภายในจะมีสปอร์ อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อเจริญเต็มที่สปอร์จะถูกดันหรือดีดออกมาจาก acervulus และเกิดการแพร่กระจายโดย ลม แมลง หรือติดไปกับเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะปลูก และสามารถเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้โดยผลิตสารทุติยภูมิออกมาบริเวณผิวของผลมะเขือเทศ และส่งผลให้เกิดผลเน่าขึ้น (Roberts และคณะ, 2009; Gleason และ Edmunds, 2006)

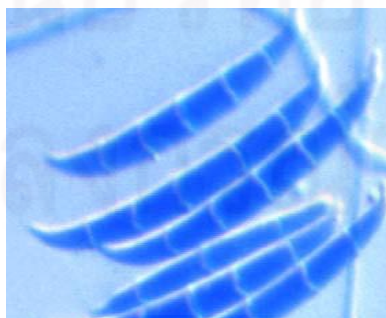
กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร (2551) ได้แนะนำการป้องกันและกำจัดการเกิดโรคแอนแทรกโนสไว้ดังนี้

1. เลือกซื้อเมล็ดพันธุ์ที่มีการทดสอบและรับรองว่าไม่มีราปนเปื้อน หากไม่แน่ใจก่อนปลูก ควรนำเมล็ดแช่น้ำอุ่น 49 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจุ่มในสารละลายของจุนสี (CuSO_4) เพื่อป้องกันรา
2. เมื่อพบต้นกล้าที่เป็นโรคควรถอดพ่นด้วยสารเคมี ไทแรม หรือแคปแทน อัตรา 50-60 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกๆ 5-7 วัน และ หากพบว่ามีการระบาดของโรคให้ฉีดพ่นด้วยมาเนบ หรือแมนเซท ดี ทุก 5-7 วัน จนกว่าจะพ้นระยะการระบาดของโรค
3. หลีกเลี่ยงการปลูกมะเขือเทศบริเวณที่เคยมีโรคระบาดอย่างน้อย 3 ปี โดยปลูกพืชชนิดอื่นทดแทน
4. เก็บทำลายซากพืชที่เป็นโรค รวมทั้งต้นมะเขือเทศที่ออกหลังจากเก็บเกี่ยวแล้วให้หมด

โรคผลเน่าจากฟิวซาเรียม

โรคผลเน่าจากฟิวซาเรียมมีเชื้อสาเหตุจากราหลายชนิดในสกุล *Fusarium* ซึ่งเป็นราที่จัดอยู่ใน Kingdom Fungi Phylum Ascomycota (Kobayashi และคณะ, 1990)

ลักษณะทั่วไปของราในสกุล *Fusarium* นั้น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ 3 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะกลมมี เรียกว่า chlamydospore มีขนาดประมาณ 4-7.5 x 20-30 ไมโครเมตร เป็นสปอร์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมที่หนาวเย็น และสามารถเก็บสะสมอาหารที่จำเป็นให้กับเซลล์ได้ 2) ลักษณะโค้งเล็กน้อยคล้ายรูปไข่ เรียกว่า microconidia มีขนาดเล็กประมาณ 2.5-4 x 6-15 ไมโครเมตร มีผนังกันเซลล์ และ 3) ลักษณะโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (crescent-shaped spores) เรียกว่า macroconidia มีขนาดใหญ่ประมาณ 3.5-5.5 x 5.5-21-35 ไมโครเมตร และมีผนังกันเซลล์ (Harveson, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 สำหรับการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะสร้างแอสโคสปอร์ภายในถุง แต่อย่างไรก็ตามไม่ค่อยพบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในธรรมชาติ (Agrios, 1997)



รูปที่ 2.3 macroconidia (ซ้าย) และ microconidia (ขวา) ของรา *Fusarium* sp.

อาการ (symptom) โดยทั่วไปของผลมะเขือเทศที่เป็นโรคนี้ จะพบอาการของแผลในลักษณะที่ชุ่มน้ำ (water soak) และหดตัว (shrunken) โดยมักพบร่วมกับอาการของเนื้อเยื่อที่เลอะและเหี่ยว ดังรูปที่ 2.4 ลักษณะปรากฏของราจะเริ่มเกิดขึ้นที่จุดกลางของรอยแผลโดยเริ่มจากพบเส้นใยสีขาว และเมื่อราเริ่มสร้างสปอร์จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู อาการเหล่านี้จะเกิดอย่างรวดเร็วและทำให้ทั้งผลเน่าไปในที่สุด (Srivastava และ Tandon, 1966)



รูปที่ 2.4 อาการของโรคผลเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจาก *Fusarium* sp. (Mahovic และคณะ, 2004)

วงจรการเกิดโรค (disease cycle) นี้เริ่มจากราสารารถอยู่รอดข้ามฤดูหรืออยู่รอดในภาวะที่ไม่เหมาะสมได้โดยอาศัยอยู่ในดินและเศษซากพืชที่เป็นโรคนี้ในรูปของ chlamydospore เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมโดยมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24-27 องศาเซลเซียส chlamydospore จะงอกเป็นเส้นใยและสร้าง macroconidia และสามารถเจริญเข้าไปในเซลล์ของพืชได้ (Harveson, 2008)

กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร (2551) ได้แนะนำการป้องกันและกำจัดโรคแอนแทรคโนสไว้ดังนี้

1. รักษาความสะอาดในแปลงเพาะปลูก และเก็บเศษซากพืชที่ตกค้างอยู่ในพื้นที่เพาะปลูกออกให้หมด
2. บำรุงและปรับปรุงดินด้วยปุ๋ยคอกและปุ๋ยขาว
3. ถ้าพบต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคนี้ควรถอนทิ้งและทำลายด้วยการเผา
4. ไม่ควรปลูกมะเขือเทศในแปลงที่มีโรคนี้อายุไม่ต่ำกว่า 4 ปีและปลูกพืชหมุนเวียนทดแทน

5. ควรเลือกสถานที่เพาะปลูกที่แน่ใจว่าไม่มีราสาเหตุโรคนี้
6. ใช้สารป้องกันกำจัดโรค พืชเอ็นบี ไวตาแว็กซ์ เอทรีไดอาโซล พืชเอ็นบี+เอทรีไดอาโซล สามารถลดอัตราการเป็นโรคลงได้ แต่ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

บทบาทของจุลินทรีย์ต่อการควบคุมโรคพืช

วิธีการควบคุมโรคพืชโดยการใช้สารเคมีในรูปแบบต่างๆ แม้จะเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว แต่ส่งผลเสียมากมายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม เช่น ก่อให้เกิดผลของพิษตกค้างในผลผลิตจากพืช ดิน และแหล่งน้ำ นอกจากนี้การใช้สารเคมียังทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อประโยชน์กับพืช เช่น จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ส่งผลทำลายสภาพสมดุลของธรรมชาติอย่างเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นผู้ใช้จะต้องมีเป้าหมายในการใช้ที่เด่นชัดคือ ใช้ต่อเมื่อจำเป็นจริงๆ เพื่อลดปัญหาพิษภัยที่อาจจะเกิดขึ้น และเนื่องจากการใช้สารเคมีที่สะสมมานานตั้งแต่อดีตทำให้ทั่วโลกประสบกับปัญหาต่างๆมากมาย ปัจจุบันจึงหันมาศึกษาถึงการควบคุมโดยวิธีทางชีวภาพ (biological control) กันอย่างจริงจัง

การควบคุมโดยวิธีทางชีวภาพ หมายถึง การใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งจุลินทรีย์ประเภทนี้สามารถทำลายและยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อโรคพืชได้ โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคให้กับพืช (Roberts และคณะ, 2008) หรือวิธีการแข่งขันใช้อาหารเพื่อการเจริญเติบโตกว่าเชื้อโรคพืช หรือการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อโรคพืชโดยตรง และ/หรือการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช (Thomashow และ Weller, 1990)

สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ หมายถึง ผลผลิตที่ได้จากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีผลในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยใช้ปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น (Pal และ McSpadden, 2006) ฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1929 ที่ Alexander Framing นักชีววิทยาและนักเภสัชวิทยาชาวสกอตแลนด์ ได้ค้นพบสารปฏิชีวนะเพนนิซิลลินจากรา *Penicillium* ซึ่งได้นำมาสกัดเป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) ในปี ค.ศ. 1939 Rene Dubos นักจุลชีววิทยาชาวอเมริกันได้แยกเชื้อ *Bacillus brevis* จากดิน และพบว่าเชื้อนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Pneumococcus* ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคปอดบวม และสามารถสังเคราะห์สารแกรมมิซิดินและไทโรซิดิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่า

แบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดอีกด้วย (Dubos, 1993) ต่อมาในปี 1977 Tronsmo และ Dennis ได้ริเริ่มใช้วิธีทางชีวภาพในการควบคุมโรคเน่าในสตรอเบอรี่หลังการเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุจากรา *Botrytis* โดยใช้เชื้อ *Trichoderma* ได้เป็นผลสำเร็จ (Droby และคณะ, 2009) จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจและพัฒนาวิธีทางชีวภาพในการควบคุมโรคพืชนับตั้งแต่บัดนั้น เป็นต้นมา โดยเริ่มทดสอบและคัดเลือกเชื้อหลายชนิดหลายสายพันธุ์มาใช้ให้เหมาะสมกับเชื้อโรคพืช ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Wilson และ Pusey (1985) ที่ทดลองใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าในต้นท้อที่มีสาเหตุจากรา *Monilinia fructicola* และได้ผลที่ดี ในปีต่อมา Wilson และคณะ (1986) ได้คัดเลือก *Enterobacter cloacae* มายับยั้งโรคเน่าของผลท้อที่เกิดจาก *Rhizopus stolonifer* ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวทำให้นักวิจัยของเขานำมาใช้เป็นพื้นฐานในการควบคุมและป้องกันโรคพืชจนถึงปัจจุบัน (Droby และคณะ, 2009)

จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 2.3 แสดงกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถสังเคราะห์สารต้านจุลชีพได้ โดยแบคทีเรียพวก *Actinomycetes* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้จำนวนชนิดมากที่สุด รองลงมาคือสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากรา ส่วนกลุ่มของแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Actinomycetes* นั้น ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียพวก *Bacillus* ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพดีในแง่การนำมาใช้เพื่อยับยั้งและป้องกันการเกิดโรค (Li และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.3 แสดงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะ

กลุ่มของจุลินทรีย์	จำนวนของสารปฏิชีวนะ
<i>Actinomycetes</i>	4600
แบคทีเรียที่นอกเหนือจาก <i>Actinomycetes</i>	950
รา	1600

ที่มา : Berdy, 1985; อ้างถึงใน ดุษณี ณะบริพัฒน์, 2546

Bacillus

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* พบได้ทั่วไปในดิน ลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อน และเจริญได้ดีในอากาศ รดน้ำเชื้อเหลว และที่สำคัญสามารถป้องกันการเกิดโรคพืชได้หลายชนิด (Li และคณะ, 2009) เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการพัฒนาของระบบหลั่งสารที่ดี จึงหลั่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น บาซิลโลมายซิน อีทูริน ไมโคสับทิลิน และเพนไจมายซิน ซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชหลายชนิด (Delcambe และคณะ 1977; Peypoux และคณะ 1980; Peypoux และคณะ 1986; Vanittanakom และคณะ, 1986) และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรเป็นหลัก (Shoda, 2000)

งานวิจัยมากมายได้รายงานถึงความสามารถของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการผลิตสารที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชชนิดต่างๆได้ ตัวอย่างเช่น Bais และคณะ (2004) พบแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas syringae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ Mari และคณะ (1996) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ 5PVB ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่หลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของ *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศสดหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ Raj และคณะ (2003) พบแบคทีเรีย *Bacillus* บริเวณรากพืช ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตโคโตซาน ออกมากระตุ้นการเจริญของพืชและสามารถต้านทานการเกิดโรคในพืชตระกูลหญ้า อันมีสาเหตุจากราตระกูล *Peronosporaceae* ได้ โดยทดลองคลุกกับเมล็ดพืชพบว่าสามารถกระตุ้นการงอกของพืชได้อย่างรวดเร็วและลดการเกิดโรคจากราดังกล่าวได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งโรคหลังการเก็บเกี่ยว อันเกิดจากรา *Penicillium expansum* *Botrytis cinerea* และ *Pezizula malicorticis* ในผลแอปเปิ้ล ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์นี้ประกอบด้วย *B. subtilis* *Aureobasidium pullulans* และ *Rhodotorula glutinis* โดยพบว่าหลังจากที่เก็บเกี่ยวแล้ว นำผลแอปเปิ้ลที่มีกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวไปเก็บไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าสามารถลดปริมาณขนาดแผลของผลแอปเปิ้ลอันเกิดจากราเห ล่านี้ได้ (Leibinger และคณะ, 1997)

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

จากงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการควบคุมและยับยั้งการเกิดโรคพืชได้ โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผลิตเอ็นไซม์หรือโปรตีน ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช ตัวอย่างเช่น จากการรายงานของ Swain และคณะ (2008) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ CM1 ที่คัดแยกได้จากมูลสัตว์มีผลต่อการเจริญของเส้นใยรา *F. oxysporum* และ *Botryodiplodia theobromae* ซึ่งก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมันเทศ จากการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์ของ *Bacillus* สัมผัสกับเซลล์ของราโรคพืชแล้ว แบคทีเรียจะหลั่งเอ็นไซม์ไคตินเนสออกมาช่วยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยของราทำให้เกิดการแตกหักของเส้นใยหลังจาก 36 ชั่วโมง นอกจากนี้ Arrebola และคณะ (2009) ได้พบว่าโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะนาวที่มีสาเหตุจากรา *Alternaria citri* และ *Botryospheria* sp. มีปริมาณลดลง เมื่อทดสอบกับโปรตีนอิพิทรีน เอ ซึ่งผลิตจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* โดยโปรตีนดังกล่าวส่งผลต่อการงอกของสปอร์ของราจึงทำให้ราไม่สามารถก่อโรคได้

2. สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) หรือสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactant) จึงทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเข้าไปในพืชได้ ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ 20B ซึ่งคัดแยกได้จากอาหารหมักดองสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *F. oxysporum*, *A. burnsii*, *Cryosporium indicum* และ *R. bataticola* ดังนั้นราดังกล่าวจึงขาดความสามารถในการก่อโรคในพืช (Joshi และคณะ, 2008)

3. กระตุ้นความต้านทานโรคให้กับพืช (Induced Systemic Resistance, ISR) ตัวอย่างเช่น กลุ่มแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycooides* และ *B. sphaericus* สามารถลดความรุนแรงของโรคพืชอันเกิดจากราแบคทีเรียและไวรัสในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก พริกป่น แตงไทย แตงโม ยาสูบ ได้ โดยกลุ่มแบคทีเรียพวก *Bacillus* เหล่านี้จะกระตุ้นยีนในพืชที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเช่น NPR1 ยีน หรือกระตุ้นให้พืชสร้างกรดซาลิไซลิกหรือกรดจาสโมนิกเพื่อกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคในระหว่างที่เชื้อโรคบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ เป็นต้น (Klopper และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *Bacillus* หรือสารสกัดจากแบคทีเรียนี้สามารถกระตุ้นการป้องกันตัวเองของพืชจากโรคพืชได้ ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาด้านชีววิทยาของเซลล์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* IN937a และ *B. pumilus* IN937b โดย Jetiyanon (2007) พบว่าแบคทีเรียผสมสามารถกระตุ้นการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและเพอร์ออกซิเดสในพืช ซึ่งมีผลต่อการป้องกันโรคที่เกิดจากรา *Sclerotium rolfsii*, *Ralstonia solanacearum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคแอนแทรคโนสและโรคเหี่ยวเหลืองในพริกและมะเขือเทศได้

4. ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth-promoting) ตัวอย่างเช่น จากการรายงานของ Jetiyanon และคณะ (2008) พบว่าเมื่อนำเซลล์หรือเอนโดสปอร์ของ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 มาเคลือบกับเมล็ดพืช แล้วนำไปปลูก พบว่า แบคทีเรียเจริญและหลั่งกรดอินโดลแอซิก (indoleacetic acid, IAA) ออกมา ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เป็นต้น

สารต้านราที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารต้านราได้หลายชนิด และ มีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างสารต้านราที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

สารต้านรา	สายพันธุ์ <i>Bacillus</i>	องค์ประกอบหรือโครงสร้าง	เอกสารอ้างอิง
Aminoglycoside	<i>B. circulans</i> S-11	1-deamino-1-hydroxyxylostasin	Fujiwara และคณะ, 1980
Bacillomycin D	<i>B. subtilis</i> AU195	Cyclic lipopeptide	Moyne และคณะ, 2004
Bacisubin	<i>B. subtilis</i> B-916	Linear peptide	Liu และคณะ, 2007
Catalase	<i>Bacillus</i> sp. F26	protoheme IX group	Zhang และคณะ, 2005
Cerexin A	<i>B. cereus</i>	Amino acid และ fatty acid	Shoji และ Hinoo, 1975
Chitinase	<i>B. licheniformis</i>	Linear peptide	Waldeck และคณะ, 2006
Fengycin	<i>B. subtilis</i> F-29-3	Linear lipopeptide	Vanittanakom และคณะ, 1986
Iturin A	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Cyclic lipopeptide	Arrebola และคณะ, 2009
Mycobacillin	<i>B. subtilis</i> B3	Polypeptide	Bhattacharyya และ Bose, 1967
Rhizoctin A	<i>B. subtilis</i> 6633	Amino acids และ Oligopeptides	Kugler และคณะ, 1990
Subtilin	<i>B. subtilis</i> 6633	Cyclic peptide	Chan และคณะ, 1993
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	Cyclic lipopeptide	Sandrin และคณะ, 1990

ตัวอย่างสมบัติและการออกฤทธิ์ของสารต้านราที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

Arrebola และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจาก *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ PPCB004 ซึ่งประกอบด้วย fengycin, iturin และ surfactin และพบว่าสารประกอบดังกล่าว

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและมีผลทำให้สปอร์ของรา *Alternaria citri*, *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusicoccum aromaticum* เกิดการพองบวมและไม่สามารถก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะนาวได้

เอนไซม์แคทาเลส เป็นโปรตีนที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ นอกจากนี้จะพบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* แล้ว ยังสามารถพบได้ในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็น aerobic bacteria ทุกชนิด ส่วนแบคทีเรียพวก obligate anaerobes ทุกชนิดไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลสได้ (Archibald และ Fridovich, 1981) เอนไซม์แคทาเลส ทำงานโดยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ให้เป็นน้ำและออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์แคทาเลสจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Bagyan และคณะ, 1998) การออกฤทธิ์ต้านราโรคพืชนั้น Hou และคณะ (2006) พบว่าสารสกัดโปรตีนที่มีเอนไซม์แคทาเลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ LEV-006 มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae* และ *Leptosphaeria maculans* ที่ก่อให้เกิดโรค ลำต้นเน่า และ รากเน่า ของต้นคาโนลา ทำให้เชื่อได้ว่ากล่าวมาไม่สามารถก่อโรคในพืชได้อีก สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ต่อราโรคพืชของเอนไซม์แคทาเลสนั้นยังไม่มีผู้ใดศึกษาหรือรายงานจึงยังไม่ทราบแน่ชัด

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก *Bacillus* มาใช้เพื่อควบคุมหรือป้องกันการเกิดโรคพืชอีกด้วย ตัวอย่างเช่น Kim และ Chung (2004) ได้คัดเลือกเชื้อ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ MET0908 จากดิน และนำมาศึกษาผลในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสของแตงโมที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum lagenarium* โดยทำบริสุทธิ์สารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30% ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้ววิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าสารที่ทำบริสุทธิ์ได้คือ β -1,3-กลูคาเนสซึ่งมีฤทธิ์ต้านรา *C. lagenarium* โดยมีผลต่อเส้นใยทำให้มีการเจริญที่ผิดปกติเกิดการโป่งพอง และถูกย่อยสลายภายใน 5 วัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสารชนิดนี้สามารถทำลายผนังเซลล์ของราได้ Jung และ Kim (2005) พบว่า *B. megaterium* KL39 ที่คัดแยกจากดินสามารถผลิตสารต้านรา *Phytophthora* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพริกแดง (red pepper) ได้ โดยทำบริสุทธิ์สารด้วยการสกัดด้วย n-บิวทานอล แล้วทำบริสุทธิ์ต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี และเจลเซฟาเด็กซ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่าสารดังกล่าวมีสมบัติคล้ายกับอิพิวรีน เมื่อทดสอบกับราโรคพืชหลายชนิดเช่น *Alternaria kikuchaiana* *Pyricularia oryzae* *Fusarium solani* และ *Phytophthora capsici* พบว่าสารนี้มีผลต่อการเจริญของเส้นใยทำให้เกิด

การป้องกันและยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของราเหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ Leelasuphakul และคณะ (2006) พบว่า β -1-3-กลูคาเนส จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Pyricularia grisea* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ดีอีกด้วย

การสกัดแยกสารปฏิชีวนะ

จากรายงานการสกัดแยกสารปฏิชีวนะพบว่ามียeastด้วยกันหลายวิธี (Del Rio และคณะ, 1972) ซึ่งหากแบ่งตามลักษณะวิธีการสามารถแบ่งได้ 3 วิธีคือ

1. การตกตะกอน (precipitation)

การตกตะกอนด้วยการใช้สารเคมี จัดเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตกตะกอนสารปฏิชีวนะประเภทโปรตีน ซึ่งการจะใช้สารเคมีชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับโปรตีนนั้นๆ เช่น ตกตะกอนโปรตีนโคติเนสจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ LYG 0704 โดยใช้ไอโซโพรพานอล (Lee และคณะ, 2009) และตกตะกอนโปรตีนอินูลินเนสจากรา *Aspergillus ficuum* สายพันธุ์ JNSP5-06 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Chen และคณะ, 2009) เป็นต้น ในการทำบริสุทธิ์ โดยทั่วไปนิยมใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเนื่องจากโปรตีนที่ถูกตกตะกอนลงมากจะไม่เสียสภาพหรือถูกทำลายด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สลายโปรตีน เช่น โปรตีเอส นอกจากนี้ยังช่วยรักษาเอกทิวติของโปรตีนได้เป็นอย่างดีหลังจากนำตะกอนไปละลายกลับอีกด้วย

การตกตะกอนโปรตีนเพื่อให้บริสุทธิ์นั้นส่วนใหญ่เริ่มจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตกตะกอนของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตก่อน โดยตกตะกอนโปรตีนภายใต้อุณหภูมิ 0 - 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสียสภาพและสูญเสียเอกทิวติ สิ่งที่ต้องระวังมากที่สุดคือ ความเข้มข้นของเกลือในสารละลายต้องเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอโดยไม่มีตำแหน่งใดของสารละลายมีความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าตำแหน่งอื่น หากในสารละลายนั้นเกิดความไม่สม่ำเสมอของความเข้มข้นของเกลือจะทำให้โปรตีนที่ไม่ต้องการศึกษาตกตะกอนออกมาได้ ดังนั้นจึงต้องกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยๆ เพื่อให้เกิดความเข้มข้นที่สม่ำเสมอทุกตำแหน่ง หลังจากเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในแต่ละครั้งต้องรอให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายให้หมดเพื่อจะได้กระจายตัวในสารละลายอย่างสม่ำเสมอแล้วจึงเติมครั้งต่อไป เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว ต้องบ่มสารละลายโปรตีน

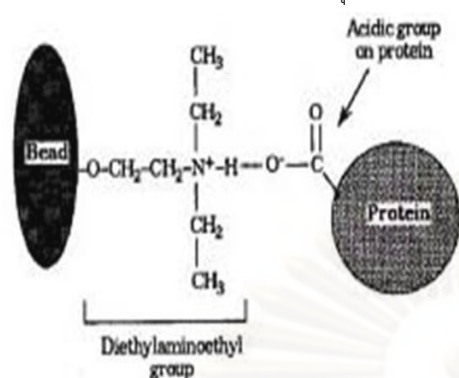
ต่อไปที่อุณหภูมิ 0 - 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อรอให้โปรตีนตกตะกอนออกมาอย่างสมบูรณ์ และเก็บตะกอนของโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยง ดังนั้นความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายจึงเพิ่มขึ้นเป็นขั้นๆ และควรปั่นแยกเก็บโปรตีนในแต่ละช่วงความเข้มข้น จากนั้นละลายตะกอนของโปรตีนในแต่ละช่วงความเข้มข้นในสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ และนำไปวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด รวมทั้งตรวจ จดติดตามเอกทิวิตีของเอนไซม์ที่สนใจด้วย (Doonon และ Cutler, 2004)

หลักการของการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีนี้ คือโปรตีนที่ถูกละลายจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของประจุ (ionic strength) และความเข้มข้นของเกลือในสารละลาย โดยการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเพิ่มการละลายด้วยเกลือปริมาณน้อย (salting-in) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของประจุหรือเพิ่มความเข้มข้นของเกลือขึ้น การละลายของโปรตีนจะเริ่มลดลง และที่ความเข้มข้นของประจุสูงๆ การละลายของโปรตีนจะลดลงจนถึงจุดที่โปรตีนตกตะกอนเกือบสมบูรณ์ในสารละลาย ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การตกตะกอนด้วยความเข้มข้นของเกลือที่ใส่ลงไปในสารละลาย (salting-out) โปรตีนกับไอออนของเกลือเข้าแย่งจับโมเลกุลอิสระของน้ำที่ความเข้มข้นของเกลือสูงๆ พันธะโมเลกุลของน้ำจะถูกจับด้วยไอออนของเกลือเป็นส่วนใหญ่ พันธะโมเลกุลของน้ำจึงไม่เพียงพอที่จะจับกับโปรตีน ทำให้โปรตีนจับกันเองมากกว่าจับกับโมเลกุลของน้ำ และตกตะกอนในสารละลาย (Roe, 2001)

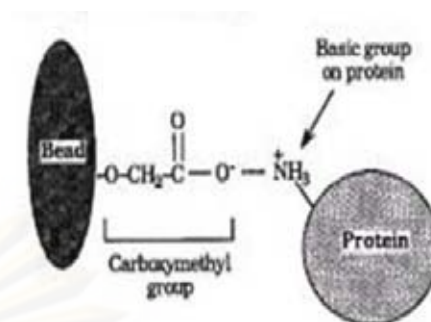
2. การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกสาร เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และ กรดนิวคลีอิก โดยอาศัยหลักการแยกสารด้วยความแตกต่างของประจุสุทธิ ซึ่งสารจะถูกดึงไว้โดยแรงดึงดูดระหว่างหมู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งมีประจุตรงข้ามกับสารที่ต้องการแยก คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุมี 2 แบบคือ แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion-exchange) และแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange) ซึ่งเรียกตามประจุของสาร แต่ต่างกันตรงคอลัมน์จะบรรจุด้วยเฟสคงที่ที่มีประจุตรงข้าม (Doonon และ Cutler, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ



โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก



รูปที่ 2.5 แสดงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (ซ้าย) และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (ขวา) (ดัดแปลงจาก Amersham Pharmacia Biotech, 1999)

การชะโปรตีนทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงประจุของทั้งหมู่ที่อยู่บนโมเลกุลของสารและบนเฟสคงที่ โดยการปรับ pH หรือเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์เช่น NaCl ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่ง Na^+ จะไปแย่งโปรตีนเพื่อจับกับหมู่ที่มีประจุลบของตัวแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchanger) ทำให้โปรตีนอีกชนิดที่เหลือถูกชะออกจากคอลัมน์ สำหรับวิธีการกำจัดเกลือนั้นทำได้หลายวิธี เช่น ใช้ถุงไดอะไลซิส ที่มี cut off ต่ำกว่าขนาดของโปรตีนที่สนใจ เช่น ที่มี cut off ประมาณ 3,500 ซึ่งเกลือที่มีขนาดเล็กกว่า 3,500 ดาลตัน จะผ่านถุงไดอะไลซิสออกไป นอกจากนี้ก็ยังมีวิธีอัลตราฟิลเทรชัน การใช้คอลัมน์ขจัดเกลือ (desalting column) หรือการทำเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) เป็นต้น (Roe, 2001)

ข้อควรพิจารณาในการสกัดแยกสารปฏิชีวนะด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

คู่มือการทำบริสุทธิ์โปรตีน (Amersham Pharmacia Biotech, 1999) ได้สรุปถึงข้อควรพิจารณาในการสกัดแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุว่า ประกอบด้วย การเลือกตัวค้ำจุน (matrix), การเลือกหมู่ฟังก์ชัน (functional groups), การเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ และการเลือกตัวทำละลาย (solvent)

สำหรับการเลือกตัวค้ำจุนนั้น ควรเลือกตามความเหมาะสมของ ชนิดตัวค้ำจุน ขนาดของ ตัวค้ำจุน ช่วง pH ในการทำงาน และ อัตราการไหล เป็นต้น ตัวอย่างของตัวค้ำจุน ได้แก่ เรซิน สังกะเรอะ หรือ เซลลูโลส เป็นต้น

ส่วนการเลือกหมู่ฟังก์ชันนั้น หมู่ฟังก์ชันที่เลือกใช้ต้องสอดคล้องตามประจักษ์ของโปรตีน ที่ต้องการแยก โดยหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนผิวของสารตัวกลาง จะทำให้เกิดความแรงในการจับและ แลกเปลี่ยนประจุ มากน้อยต่างกันตามชนิดของหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประจุ คือ ตัว แลกเปลี่ยนประจุอย่างแรง (strong ion exchanger) ซึ่งมีช่วง pH 2-12 ได้แก่ Q (anion exchange), S และ SP (cation exchange) เป็นต้น และตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างอ่อน (weak ion exchanger) ได้แก่ DEAE (anion exchange) ซึ่งมีช่วง pH 2-9 และ CM (cation exchange) ซึ่งมีช่วง pH 6-10 เป็นต้น ตัวอย่างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุเหล่านี้แสดงดังใน ตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 หมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Amersham Pharmacia Biotech, 1999

ตัวแลกเปลี่ยนประจุมักทำจากเรซินซึ่งพบในธรรมชาติ เช่น เซลลูโลสซึ่งใช้เป็นตัวกลาง แลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ หรือไคโตซานที่สกัดแยกได้จากเปลือกกุ้งและหอยซึ่งเป็นตัว แลกเปลี่ยนประจุลบ (Nakano และคณะ, 2004) หรือสังเคราะห์ขึ้นทางเคมีและเรียกชื่อตาม สาร ตัวกลาง เช่นใช้ตัวกลางเป็น เซลลูโลส เรียกว่า Diethylaminoethyl (DEAE) เซลลูโลส , Triethylaminoethyl (TEAE) เซลลูโลส ซึ่งทั้งสองชนิดสามารถใช้ในการแยกสารที่มีองค์ประกอบ ของไขมันปนอยู่ด้วย (Akoh และคณะ, 2008) สารตัวกลางที่เป็น เซฟาเดกซ์ เช่น SP เซฟาเดกซ์ C-25 CM เซฟาเดกซ์ C-25 แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่ทนต่อภาวะที่เป็นกรด (GE Healthcare, 2009) สารตัวกลางที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งก็คือ ไบโอ-เจล เอ และ ไบโอ -เจล พี ซึ่งทั้งสองชนิดแตกต่างกัน

ตรงองค์ประกอบ คือ ประกอบด้วย เม็ดอะกาไรส และพอลิอะคริลาไมด์ ตามลำดับ มีสมบัติเป็น สารประกอบที่ชอบน้ำมาก (extremely hydrophilic) จึงมีความคงตัวในน้ำสูง สามารถแยกสารที่ไม่บริสุทธิ์ออกจากโปรตีนที่สนใจได้ และมีประสิทธิภาพสูงในการคัดแยกสารโดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลออกจากกันได้ดี จึงทำให้คัดเลือกโปรตีนที่ต้องการได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถทนได้ในภาวะที่เป็นกรดและเบสอ่อนๆ มีความเสถียรในสารเจือจางของ dithiothreitol, mercaptoethano, สารลดแรงตึงผิว และสารฟอกหนัง เช่น SDS, CHAPS และ Triton® X-100 เป็นต้น (Bio-Rad, 2009)

สำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องให้ค่า pH ที่ทำให้โปรตีนที่ต้องการแยก มีความเสถียรและไม่เกิดการรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุ นอกจากนี้ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ยังมีผลต่อการเกิดประจุสุทธิของโปรตีนด้วย ถ้าโปรตีนอยู่ในสารละลายที่มี pH สูงกว่าค่า pI ประจุสุทธิจะเป็นลบ และจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ แต่ถ้าสารละลายมี pH ต่ำกว่า pI ประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นบวกและจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (Amersham Pharmacia Biotech, 1999) ตัวอย่างของสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และประจุบวก แสดงในตารางที่ 2.6 และ 2.7 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ

Substance	Conc. (mM)dT	dpKa/ (°C)	Counter-ion	Comments
N-methyl piperazine	20	-0.015	Cl ⁻	
Piperazine	20	-0.015	Cl ⁻ /HCOO ⁻	
L-histidine	20	-0.017	Cl ⁻	
bis-Tris	20	-0.017	Cl ⁻	
bis-Tris propane	20	-0.017	Cl ⁻	
Triethanolamine	20	-0.020	Cl ⁻ /CH ₃ COO ⁻	
Tris	20	-0.028	Cl ⁻	Often needs purification before use and especially sensitive to temperature change.
N-methyl-diethanolamine	50	-0.028	SO ₂ ⁻ /Cl ⁻ /CH ₃ COO ⁻	
Diethanolamine	20 at pH 8.4 50 at pH 8.8	-0.025	Cl ⁻	
1,3-diamino-propane	20	-0.031	Cl ⁻	
Ethanolamine	20	-0.029	Cl ⁻	
Piperazine	20	-0.026	Cl ⁻	
1,3-diamino-propane	20	-0.026	Cl ⁻	
Piperadine	20	-0.031	Cl ⁻	
Phosphate	20	-0.026	Cl ⁻	

ที่มา: Amersham Pharmacia Biotech, 1999

ตารางที่ 2.7 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก

Substance	Conc. (mM)dT	dpKa/ (°C)	Counter-ion	Comments
Maleic acid	20		Na ⁺	Dicarboxylic acid
Malonic acid	20		Na ⁺ /Li ⁺	Dicarboxylic acid
Citric acid	20	-0.0024	Na ⁺	Dicarboxylic acid
Lactic acid	50		Na ⁺	
Formic acid	50	+0.0002	Na ⁺ /Li ⁺	
Butanedioic acid	50	-0.0018	Na ⁺	
Acetic acid	50	+0.0002	Na ⁺ /Li ⁺	
Malonic acid	50		Na ⁺ /Li ⁺	Dicarboxylic acid
Phosphate	50	-0.0028	Na ⁺	Often needs purification before use
HEPES	50	-0.0140	Na ⁺ /Li ⁺	Zwitterionic
BICINE	50	-0.0180	Na ⁺	Zwitterionic

ที่มา: Amersham Pharmacia Biotech, 1999

3. การตกตะกอนด้วยตัวทำละลาย

การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายจำเป็น ต้องใช้ในบางกรณี โดยอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และเนื่องจากสารแต่ละชนิดมีสมบัติในการละลายในตัวทำละลายได้ต่างกัน ดังนั้นการเลือกสารที่เป็นตัวทำละลายจึงต้องคำนึงว่า 1) ตัวทำละลายต้องสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี และไม่ละลายสารอื่นที่ไม่ต้องการ รอกมาด้วย 2) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่สกัด 3) สามารถแยกออกจากสารที่สกัดแล้วได้ง่าย 4) ไม่เป็นพิษ และ 5) มีราคาถูก ตัวอย่างของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารปฏิชีวนะ ได้แก่ การสกัดสารต้านราและต้านแบคทีเรียจาก *B. megaterium* โดยใช้ บิวทานอล และ เมทานอล (Jung และ Kim, 2005) และไดคลอโรมีเทน อะซีโตน-เฮกเซน และอะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน ในการสกัดยารักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและยีสต์ (Boonnak และคณะ, 2009) เป็นต้น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและการหาลักษณะสมบัติของโปรตีน

เมื่อสกัดสารบริสุทธิ์ชนิดที่เป็นโปรตีนได้แล้ว จำเป็นต้องตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้ วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์นี้มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบโดยวิธีไซโตเดียมไดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), การตรวจสอบ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโปรตีนไม่เสียสภาพ (native gel electrophoresis), การตรวจสอบโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบให้กระแสไฟฟ้าสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis), การตรวจสอบโดยเน้นประจุที่เป็นกลางใน

สนามไฟฟ้า (isoelectric focusing), และการตรวจสอบโดยการติ ดคลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioimmunoassay) เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของโปรตีนสามารถปฏิบัติได้หลายวิธีเช่นกัน ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นการหาน้ำหนักของโปรตีน ลำดับกรดอะมิโน รูปแบบของกรดอะมิโนเมื่อตัดด้วย เอนไซม์ที่เฉพาะ เป็นต้น ตัวอย่างของวิธีเหล่านี้ ได้แก่ การจำแนกโดย Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, การจำแนกโดยการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย N-terminal amino acid analysis, การจำแนกโดยการทำให้เปปไทด์ (peptide mapping), การจำแนกโดย Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), และการจำแนกโดย Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB-MS) เป็นต้น

แบคทีเรีย M10

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) พบว่าแบคทีเรีย M10 ซึ่งแยกได้จากดินในจังหวัดกาญจนบุรีนั้น นอกจากจะยับยั้งและควบคุม การเจริญเติบโตของรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ได้ผลดีแล้ว เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *C. capsici* และการเน่าของผลที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. กับผลมะเขือเทศ แล้ว พบว่าแบคทีเรีย M10 ช่วยลดอาการของโรคได้โดยพบว่าขนาดของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำวิจัยต่อ โดยนำแบคทีเรีย M10 มาแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา โดยมีการหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อผลิตสารนี้ และหาภาวะที่เหมาะสมในการทำสารให้บริสุทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยสารที่แยกได้ โดยหาค่า IC_{50} ของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งราเป้าหมายได้ ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารต่อราเป้าหมาย (*in vitro*) และทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันและยับยั้งราเป้าหมายบนผลของมะเขือเทศ (*in vivo*) รวมทั้งศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล และจำแนกชนิดของโปรตีน รวมถึงพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M10 ด้วย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
4. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น G27
6. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
7. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบใช้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
8. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ss-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงรีfrigeraเตน (refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของบริษัท Beckman
12. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
14. เครื่องวัดความเป็นกรด -เบส (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
16. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan

17. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
18. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
19. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
20. ถังไดอะไลซิส ขนาดรู 3500 MWCO รุ่น JE 123986 บริษัท SnakeSkin[®], USA
21. ผ้าขาวบางปลอดเชื้อ
22. ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
23. อุปกรณ์นับเซลล์ (hemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany
24. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
25. ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ภาชนะเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
26. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN II และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ารุ่น PAC 300 ของบริษัท บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
27. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
28. Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร
29. Sonicator รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท สยามแอนด์ไกร, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH₃COOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France
4. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
5. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
6. ผงสกัดจากมันฝรั่ง (potato dextrose) ของบริษัท HiMedia Laboratories, USA
7. คอปเปอร์ซัลเฟต (CUSO₄) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
8. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany

10. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
13. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของบริษัท Bio-Rad, USA
14. แบคโตเปปโทน (Bacto peptone broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
15. ผงวุ้น (agar)
16. ผงปลาโนส ของบริษัท Bronson and Jacobs International, ประเทศไทย
17. ทู-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) ของบริษัท Sigma, USA
18. สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนต์ ของบริษัท Merck, Germany
19. สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka, Switzerland
20. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Germany แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของบริษัท BDH, England
21. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-Rad, USA
22. เอทานอล ของบริษัท J.T. Baker, USA.
23. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA
24. ไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ของบริษัท Clorox SDN.BHD, Malaysia
25. Acrylamide ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
26. Bis- Acrylamide ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
27. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Sibsenzyme, Russia
28. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid), ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma, USA
29. Taq DNA polymerase ของบริษัท BioExcellence, Thailand
30. TEMED (N,N,N', N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
31. Trizma base (Tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ของบริษัท Sigma, USA
32. 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
33. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
34. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง ของบริษัท Fermentas, USA

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย M10 ซึ่งแยกได้จากดิน (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม , 2549) เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งโรคแอนแทรกซินของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากรา *C. capsici* และโรคผลเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากรา *Fusarium sp.* ได้ดี แบคทีเรียไอโซเลต M10 มีรูปร่างเป็นท่อนแกรมบวก เจริญได้ดีในอากาศ ไม่เจริญในที่ไม่มีอากาศ สร้างเอนโดสปอร์ ให้ผลบวกกับการทดสอบแคทาเลส (catalase test) (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549)

3.3.2 ราโรคพืช

รา *C. capsici* และ *Fusarium sp.* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. เลขา มาโนช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นราซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศที่เป็นโรคแอนแทรกซินและโรคเน่า ตามลำดับ

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเหลว Nutrient Broth (NB) อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1 และ 2 ตามลำดับ)

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรา ได้แก่ อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3 และ 4 ตามลำดับ)

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งเอียง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเก็บรักษา

เลี้ยงรบบอาหารแข็งเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การทดสอบความสามารถของเซลล์แบคทีเรียและส่วนน้ำใส (supernatant) ในการยับยั้งราโรคพืช

3.6.1 การเตรียมแบคทีเรีย M10

เลี้ยงแบคทีเรีย M10 ในหลอดอาหารแข็งเอียง NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม.

3.6.2 การเตรียมสปอร์ราโรคพืชเพื่อใช้ศึกษาการยับยั้งรบบอาหารแข็ง

ปลูกเชื้อ *C. capsici* และ *Fusarium sp.* ในอาหารแข็งเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นสารแขวนลอย กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าขาวบางปลอดเชื้อ แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยสปอร์แขวนลอยของราแต่ละชนิดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้ทั่วจานอาหาร PDA แล้วปล่อยให้แห้งเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ศึกษาการยับยั้งรบบอาหารแข็งต่อไป

3.6.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้งรบบอาหารแข็ง

ใช้ดูปเชื้อแบคทีเรีย M10 จากข้อ 3.6.1 มาขีดลงบนจานอาหาร PDA ที่มีราเป้าหมาย (ข้อ 3.6.2) แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขอบเขตของบริเวณยับยั้ง

3.6.4 การเตรียมส่วนน้ำใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10

เลี้ยงแบคทีเรีย M10 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสเหนือตะกอนเซลล์มากรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 μm เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งโรคต่อไป

3.6.5 การทดสอบความสามารถของส่วนน้ำใส (supernatant) ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรากของน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี well-in agar (Natarajan และคณะ, 2007) โดยเตรียมจานอาหารที่มีสปอร์ของราตามวิธีข้อ 3.6.2 แล้วใช้ cork borer ปลอดภัยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะรูออก จำนวน 5 หลุม จากนั้นนำสารละลายของน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมที่เจาะไว้ จำนวน 3 หลุม ส่วนอีก 2 หลุมใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เพื่อเป็นชุดควบคุม นำจานอาหารไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขอบเขตของบริเวณยับยั้ง

3.6.6 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

นำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10 ที่เตรียมตามวิธีข้อ 3.6.4 มาทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2 และ 3 ตามลำดับ) ลงไปในปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรากตามวิธีข้อ 3.6.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

3.7 การแยกและการทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย M10

เชื้อเชื้อ 1 ลูกของแบคทีเรีย M10 ที่เจริญบนอาหารแข็งแข็ง NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.500 เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7.2 การหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.7.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 75 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 หลอด ทุกๆ 1 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 0 ถึง 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร แยกเซลล์แบคทีเรียออกตามวิธี ข้อ 3.6.4 แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราตามวิธีข้อ 3.6.5

3.7.3 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรค

เลี้ยงแบคทีเรีย M10 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ให้แยกทีวดีการยับยั้งรามากที่สุดที่ได้จากข้อ 3.7.2 แยกตะกอนเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อในช่วง 0-40%, 40-60% และ 60-80% โดยในระหว่างการตกตะกอนมีการกวนเบาๆ ตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง โดยปฏิบัติที่ 4 องศาเซลเซียส นำไปแยกตะกอนและส่วนน้ำ ใสออกจากกัน โดยการหมุนเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้จากแต่ละช่วงด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) โดยใช้ ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด นำไปลดปริมาตรน้ำโดยใช้ผงบลานอสเพื่อทำให้ สารละลายเข้มข้นขึ้น นำไปขจัดเกลือออกด้วยถุงไดอะไลซิสขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง เป็นระยะเวลาข้ามคืน และในการขจัดเกลือ อครั้งสุดท้าย ไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 30% กลีเซอรอลผสมอยู่ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) เป็นระยะเวลา

4-6 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 3.7.4 และทดสอบแอกทิวิตีตามวิธีข้อ 3.7.5 เลือกลำดับช่วงการตกตะกอนโปรตีนที่ให้แอกทิวิตีมากที่สุดมาทำบริสุทธิ์ต่อไป

3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนปฏิบัติตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.7.5 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน

การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีนปฏิบัติตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Mataragas และคณะ (2003) ดังนี้ วัดปริมาณโปรตีนและปรับความเข้มข้นโปรตีนที่จะทดสอบให้เท่ากัน จากนั้นเจือจางโปรตีนแบบลำดับส่วนทีละสองเท่า แล้วนำมาทดสอบแอกทิวิตีตาม วิธีข้อ 3.6.5 วัดผลเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) คือ ส่วนกลับของความเจือจางที่สูงที่สุดที่สามารถให้ขอบเขตการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบได้ แล้วรายงานค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีนเป็น AU/มิลลิกรัมของโปรตีน (Mataragas และคณะ, 2003; Barefoot และ Klaenhammer, 1983)

ตัวอย่างเช่น สารละลายโปรตีนจากการตกตะกอนโปรตีนนั้น มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งราโรคพืชได้ เมื่อเจือจางลง 1/32 เท่า ปริมาณสารที่หยอดลงหลุมเป็น 100 ไมโครลิตร ดังนั้น สารละลายโปรตีนนี้จึงมีแอกทิวิตีก่อนเจือจางเท่ากับ 32 AU/0.1 มิลลิลิตร หรือเท่ากับ 320 AU/มิลลิลิตร ถ้าปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนก่อนเจือจางเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัม /มิลลิลิตร ดังนั้นแอกทิวิตีจำเพาะของสารละลายโปรตีน 320/1.5 จึงเท่ากับ 213.33 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน

3.7.6 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)

ขยายขนาดการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณมากขึ้น โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยงที่ได้จากข้อ 3.7.2 และการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวซึ่งให้แยกทิวติมากที่สุดที่ได้จากข้อ 3.7.3 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร ดังนี้ ล้างสารแขวนลอย ดีอีเออี ไบโอ- เจล เอ ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เม็ดเจลค่อยๆ ตกตะกอนเอง เทส่วนน้ำใสกับเจลละเอียด (fine particles) ที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้ง ทำเช่นนี้หลายครั้งจนไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์และเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ บรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 15 มิลลิลิตร ตั้งไว้ข้ามคืน แล้วนำสารละลายที่จะใช้ในการทำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 1 โมลาร์ NaCl และสารละลายสำหรับล้างเจลหรือคอลัมน์ คือ 0.25 โมลาร์ NaOH (ภาคผนวก ข หมายเลข 8 และ 9 ตามลำดับ) และน้ำกลั่น นำไปกำจัดฟองอากาศออกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ภายใต้สุญญากาศ เป็นเวลา ประมาณ 1 ชั่วโมง นำเจลที่บรรจุลงในคอลัมน์ตั้งไว้ข้ามคืนมาผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ เติมสารละลายโปรตีนลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่จับกับ ดีอีเออี ไบโอ- เจล เอ ออกด้วยบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้เกรเดียนต์ของ 1 โมลาร์ NaCl ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วนๆ ละ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และจากนั้นรวบรวมลำดับส่วนในแต่ละช่วงของโปรตีนไปขจัดเกลือออกด้วยถุงไดอะไลซิสขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง เป็นระยะเวลาข้ามคืน และในการขจัดเกลือครั้งสุดท้ายจะไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 30% กลีเซอรอล ผสมอยู่ด้วย เป็นระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 3.7.4 ทดสอบแยกทิวติ ตามวิธีข้อ 3.7.5 และนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนต่อไป

3.7.7 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยวิธี โสเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ดังนี้ นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.7.6 และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน น้ำหนักโมเลกุลสูง (Fermentas, USA) สองชนิด (Cat. No. SM1849 และ SM0431) มาทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอเล็กโทรโฟเรซิส ดังนี้ ประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.3x10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3x10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, USA) เทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมตามวิธีดังนี้

- เตรียม separating gel ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายต่างๆดังนี้

40% Acrylamide	2.912	มิลลิลิตร
2% Bis- Acrylamide	1.608	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 10)	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 11)	0.10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.83	มิลลิลิตร

เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน แล้วรีบเทสารผสม ลงในช่องระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตรทันทีเนื่องจาก TEMED และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ทำให้เจลแข็งตัวเร็ว หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที ชับน้ำออก เทสารละลายผสมสแต็กกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเตรียมตามวิธีดังนี้

- เตรียม stacking gel ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายต่างๆดังนี้

40% Acrylamide	0.48	มิลลิลิตร
2% Bis- Acrylamide	0.26	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 13)	1.26	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.92	มิลลิลิตร

เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 25 ไมโครลิตร ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันแล้วรีบเทสารผสม ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือ วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงตั้งแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 5 ไมโครกรัมและผสมกับ 2X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยอดตัวอย่าง 45 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง และหยอดโปรตีนมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซีบลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน โดยในระหว่างการย้อมและการล้างสีมีการเขย่าเบาๆตลอดเวลาด้วย ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบกับเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของราด้วยโปรตีนที่แยกได้กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีดา พันธุ์ท้อ และพันธุ์ราชินี

3.8.1 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งการเกิดโรค (inhibition)

เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ของรา *C. capsici* และ *Fusarium sp.* ตามวิธีข้อ 3.6.2 และเตรียมผลของมะเขือเทศที่ต้องการทดสอบ ตามวิธีของ Munoz และคณะ (2009) โดยการล้างน้ำ แล้วทำความสะอาดด้วย 10% NaOCl ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งการเกิดโรค ตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Touré และคณะ (2003) โดยทำให้มะเขือเทศเกิดแผลโดยใช้เข็มหมุดปลอดเชื้อ แล้วใส่สารแขวนลอยของสปอร์ของราโรคพืช ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนแผลที่ทำไว้ บ่มไว้ในภาชนะที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แปรผันความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.7.6 ให้ได้เท่ากับ 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หยดโปรตีนปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงตรงบริเวณที่เป็นแผลไว้ สำหรับชุดควบคุมผลบใช้ น้ำกลั่นแทน บ่มต่อไปเป็นระยะเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคและความสามารถของโปรตีนในการยับยั้งการเกิดโรค รวมทั้งความ

เข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ นำผลที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำไปวิเคราะห์หาค่าทางสถิติโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Rang Test) โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการป้องกัน (prevention) การเกิดโรค

เตรียมผลของมะเขือเทศที่ต้องการทดสอบ โดยการล้างน้ำ แล้วทำความสะอาดด้วย 10% NaOCl ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้ง เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการป้องกันการเกิดโรค ตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Touré และคณะ (2003) โดยทำให้มะเขือเทศเกิดแผลโดยใช้เข็มหมุดปลอดเชื้อ ใส่โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยแปรผันความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงตรงบริเวณที่ทำเป็นแผลไว้ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ บ่มไว้ในภาชนะที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่สารแขวนลอยของสปอร์ของรา *C. capsici* และ *Fusarium sp.* ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนแผลที่ทำไว้ บ่มต่อไปเป็นระยะเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคและความสามารถของโปรตีนในการป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนที่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ นำผลที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำไปวิเคราะห์หาค่าทางสถิติโดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.8.3 การหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory Concentration 50%, IC₅₀)

หาค่า IC₅₀ ของโปรตีนที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชได้ตาม วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Chang และคณะ (2008) โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ของรา *C. capsici* และ *Fusarium sp.* ตามข้อ 3.6.2 ถ่ายลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 100 มิลลิลิตรจำนวน 30 ขวด นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.7.6 มาแปรผันความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วใส่ลงในอาหารเหลวนี้ สำหรับชุดควบคุมไม่ใส่โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ นำไปบ่มที่เครื่อง เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนสปอร์ที่งอกในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยใช้ hemacytometer รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [1 - (\text{จำนวนสปอร์ที่งอกในชุดทดลอง} / \text{จำนวนสปอร์ที่งอกในชุดควบคุม})] \times 100$$

จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยสมการการถดถอย (regression) เพื่อหาค่า IC_{50} แล้วนำผลที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.8.4 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต่อรา *C. capsici*

ตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนที่แยกได้จากต่อราโรคพืชโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Rajesh และ Sharma (2002) โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ของรา *C. capsici* ตามข้อ 3.6.2 ถ่ายลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.7.6 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงในอาหารเหลวนี้ สำหรับชุดควบคุมไม่ได้โปรตีน จากนั้นนำไปปั่นที่เครื่อง เซย่าที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการงอกของสปอร์รา *C. capsici* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

นำตัวอย่างโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาแยกโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีข้อ 3.7.7 จากนั้นตัดชิ้นส่วนอะครีลาไมด์เจลบริเวณที่เกิดแถบโปรตีนใสในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล และรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ภายหลังการย่อยด้วยทริปซิน (peptide mass fingerprint) โดยเทคนิค MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) โดยใช้บริการของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนโดยนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Mascot (www.matrixscience.com)

3.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.9.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย M10 ตามวิธีข้อ 3.6.1 จากนั้นฉีดลงบนจานอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง เชียโคโลนีเดี่ยวมาครั้งโคโลนีใสในหลอดไมโครพิพจที่มีน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที บั่นเหียงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอในส่วนน้ำใส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณบางส่วนของบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ BAK11W และ BAK2 (Bosshard และคณะ, 2003) ต่อไป

3.9.2 การเตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส มีดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.0	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	2.5	ไมโครลิตร
สารละลายผสมของ dNTPs (10 mM) (ภาคผนวก ข หมายเลข 18)	0.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ BAK11W (50 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ BAK2 (50 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5หน่วย/ไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	19.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	25.0	ไมโครลิตร

สำหรับชุดควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ไมโครลิตร แทนสารละลายของดีเอ็นเอแม่แบบ สารที่ผสมแล้วต้องอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำหลอดไปทำปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ DNA thermal cycler ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนดให้ในข้อ 3.9.3

3.9.3 การทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส

ตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ดังต่อไปนี้

initial denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5	นาที	} 40 รอบ
denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1	นาที	
annealing	ที่ 48 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1	นาที	
extention	ที่ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1	นาที	
final extention	ที่ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10	นาที	

ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอ บางส่วนของบริเวณ 16S rDNA สายใหม่ขึ้น เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ บางส่วนของบริเวณ 16S rDNA ที่ต้องการเป็นจำนวนมาก จากนั้นนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์จาก ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ตามวิธีในข้อ 3.9.4

3.9.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์จาก ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ในข้อ 3.9.3 และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (BioExcellence, Thailand) มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจล โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ซึ่งหลอมละลายอยู่ใน 1X TAE บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้จนอะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เท 1X TAE บัฟเฟอร์ ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) หยอดสารละลายดีเอ็นเอและสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Mupid-2 Advance, Japan) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของอะกาโรสเจล นำเจลออกจากแชมเบอร์ และย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 21) เป็นระยะเวลา 5-10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

เมื่อได้ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแล้วนำมาทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสซ้ำอีกครั้ง ตามวิธีข้อ 3.9.2 เพื่อเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสมา

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีข้อ 3.9.4 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีในข้อ 3.9.5 ต่อไป

3.9.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์

ตัดอะกาโรสเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาสกัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอออกจาก อะกาโรสเจล ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข หมายเลข 22) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำชิ้นอะกาโรสเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่หลอดไมโครพิพพ์ จากนั้นเติม บัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่ง อะกาโรสเจลละลายหมด แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดสารละลายที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพพ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บรักษาสารละลายของดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.9.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 3.9.5 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base (ประเทศมาเลเซีย) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีดังต่อไปนี้

3.10.1 สถิติพรรณนา (Descriptive statistics) ตัวอย่างเช่น การคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.10.2 สถิติวิเคราะห์ (Analysis statistics) ตัวอย่างเช่น การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพื่อนำค่ามาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา แล้วหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีน ที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ของราที่ 50 เปอร์เซ็นต์

3.10.3 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Covarience) ตัวอย่างเช่น ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT (Duncan's New Multiple Rang Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS (ภาคผนวก จ หมายเลข 1-12)

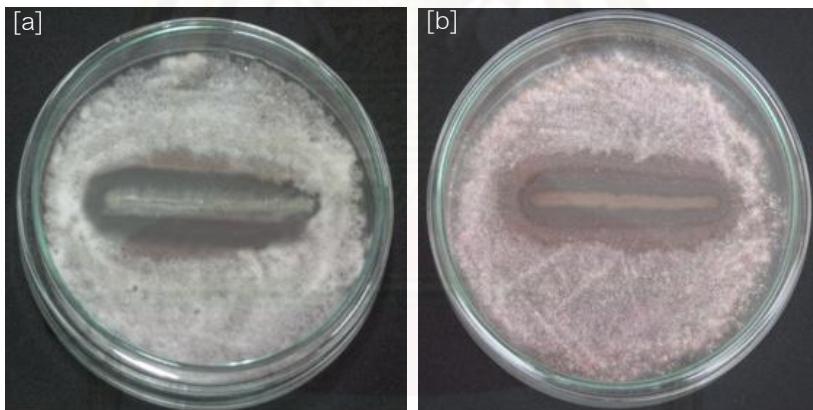
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียและส่วนน้ำใส (supernatant) ในการยับยั้งราโรคพืช

4.1.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้งการเจริญของราบนอาหารแข็ง

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 โดยซีดลงบนจานอาหารแข็งที่มีราโรคพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันนั้น พบว่าแบคทีเรีย M10 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ได้มากกว่า *Fusarium* sp. โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งประมาณ 8.0 มิลลิเมตร และ 4.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1

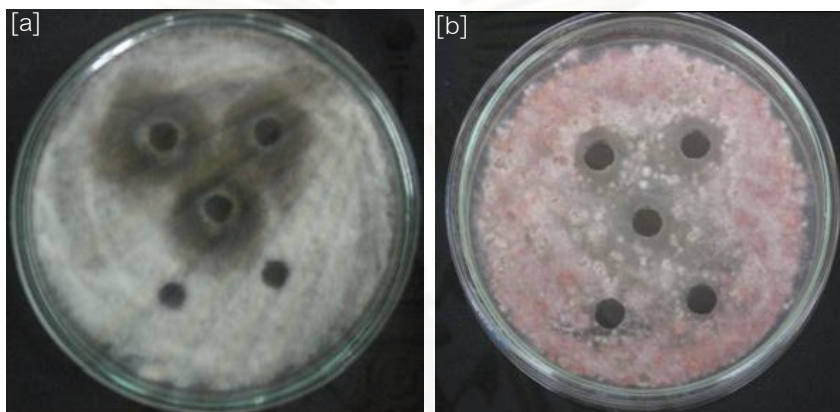


รูปที่ 4.1 แสดงบริเวณยับยั้งของแบคทีเรีย M10 ในการยับยั้ง *C. capsici* [a] และ *Fusarium* sp. [b] ที่ระยะเวลา 7 วัน

4.1.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในส่วนน้ำใส (supernatant) ต่อการยับยั้งราก่อโรค

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย M10 ในส่วนน้ำใสโดยวิธี well-in agar โดยเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญอยู่ออก แล้วหยดสารละลายน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง

ด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นชุดควบคุม แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันนั้น พบว่าสารละลายน้ำใสสามารถยับยั้งการเจริญของ ราได้โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งต่อ *C. capsici* มากกว่า *Fusarium* sp. โดยมีความกว้าง ของบริเวณยับยั้งประมาณ 6.5 มิลลิเมตร และ 3.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

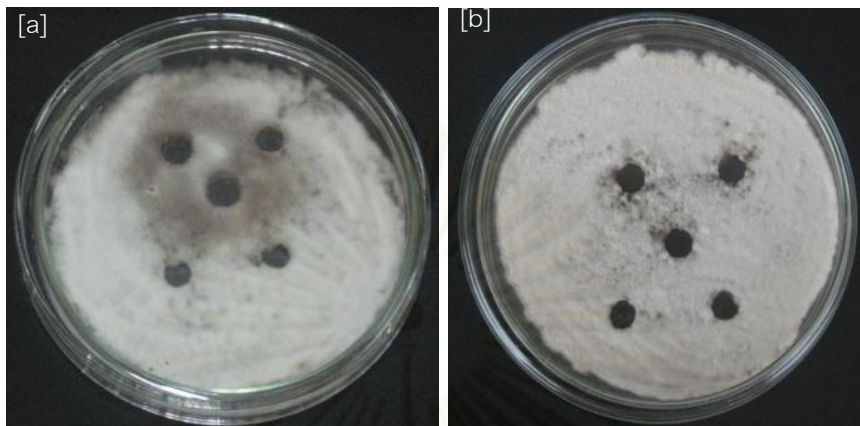


รูปที่ 4.2 แสดงบริเวณยับยั้งโดยส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10 ต่อการยับยั้ง *C. capsici* [a] และ *Fusarium* sp. [b] ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุม ด้านบนคือชุดทดลองที่มีส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB)

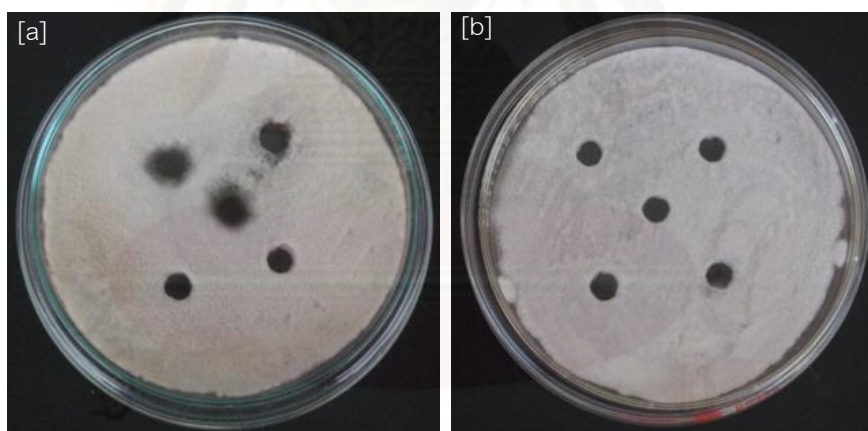
4.1.3 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราว่าเป็นโปรตีนหรือไม่

หลังจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย M10 มาทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ลงไปในปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร พบว่าเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราโดยวิธี well-in agar ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 4.3- 4.6 ซึ่งเกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

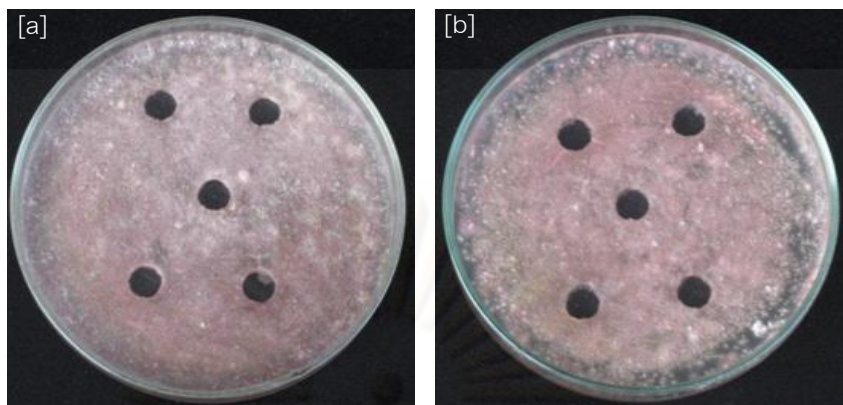


รูปที่ 4.3 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียสภาพจากการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 ไมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาตร 100 ไมโครลิตร [b] กับ *C. capsici* ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม)

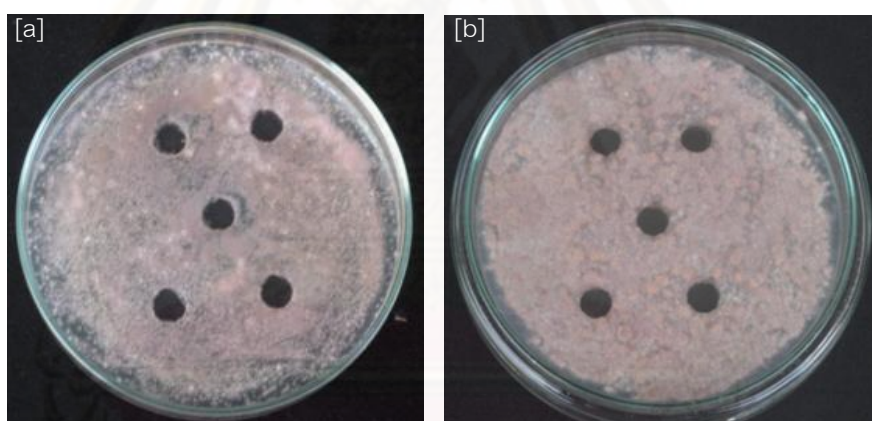


รูปที่ 4.4 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียสภาพจากการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 ไมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาตร 100 ไมโครลิตร [b] กับ *C. capsici* ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาตร 100 ไมโครลิตร [b] กับ *Fusarium* sp. ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม)



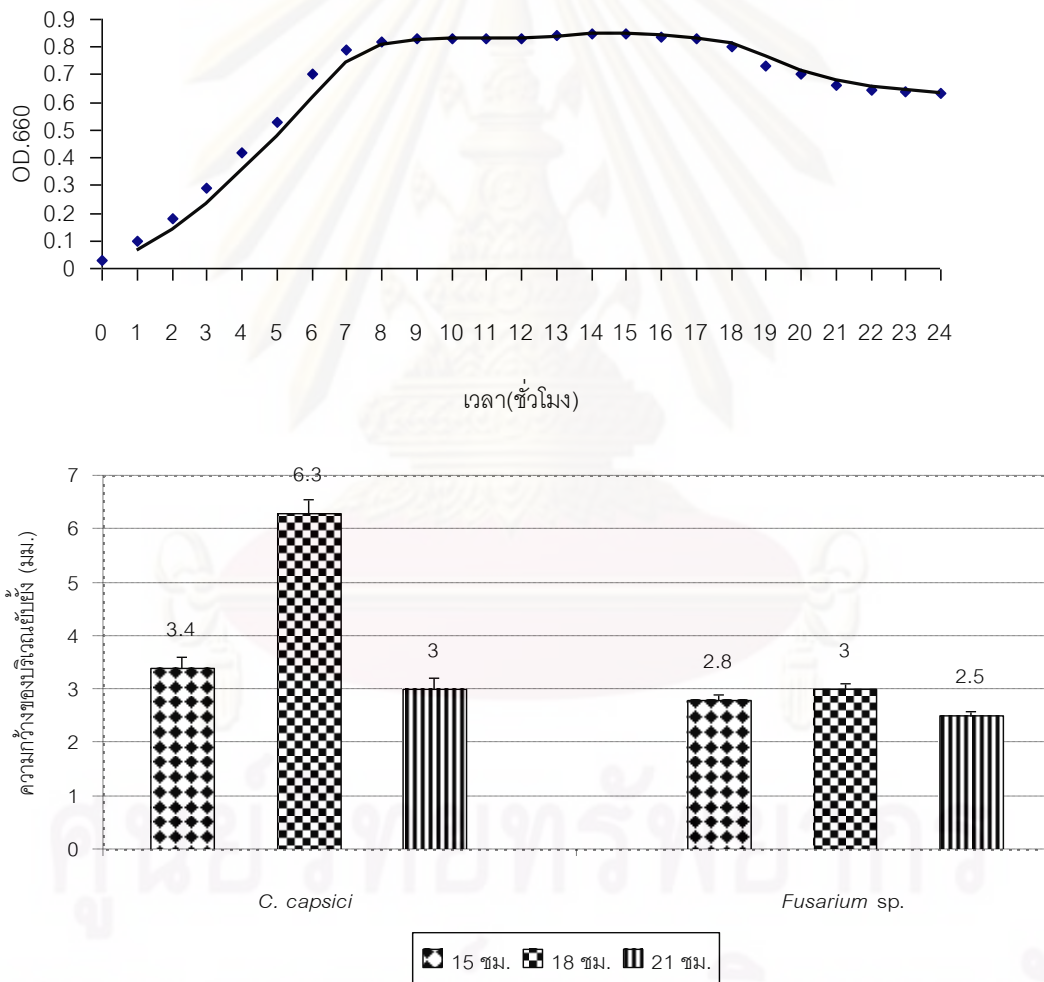
รูปที่ 4.6 แสดงการทดสอบโปรตีนที่เสียหายจากการเติม ไฮเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร [a] และปริมาตร 100 ไมโครลิตร [b] กับ *Fusarium* sp. ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม)

4.2 การแยกและการทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp.

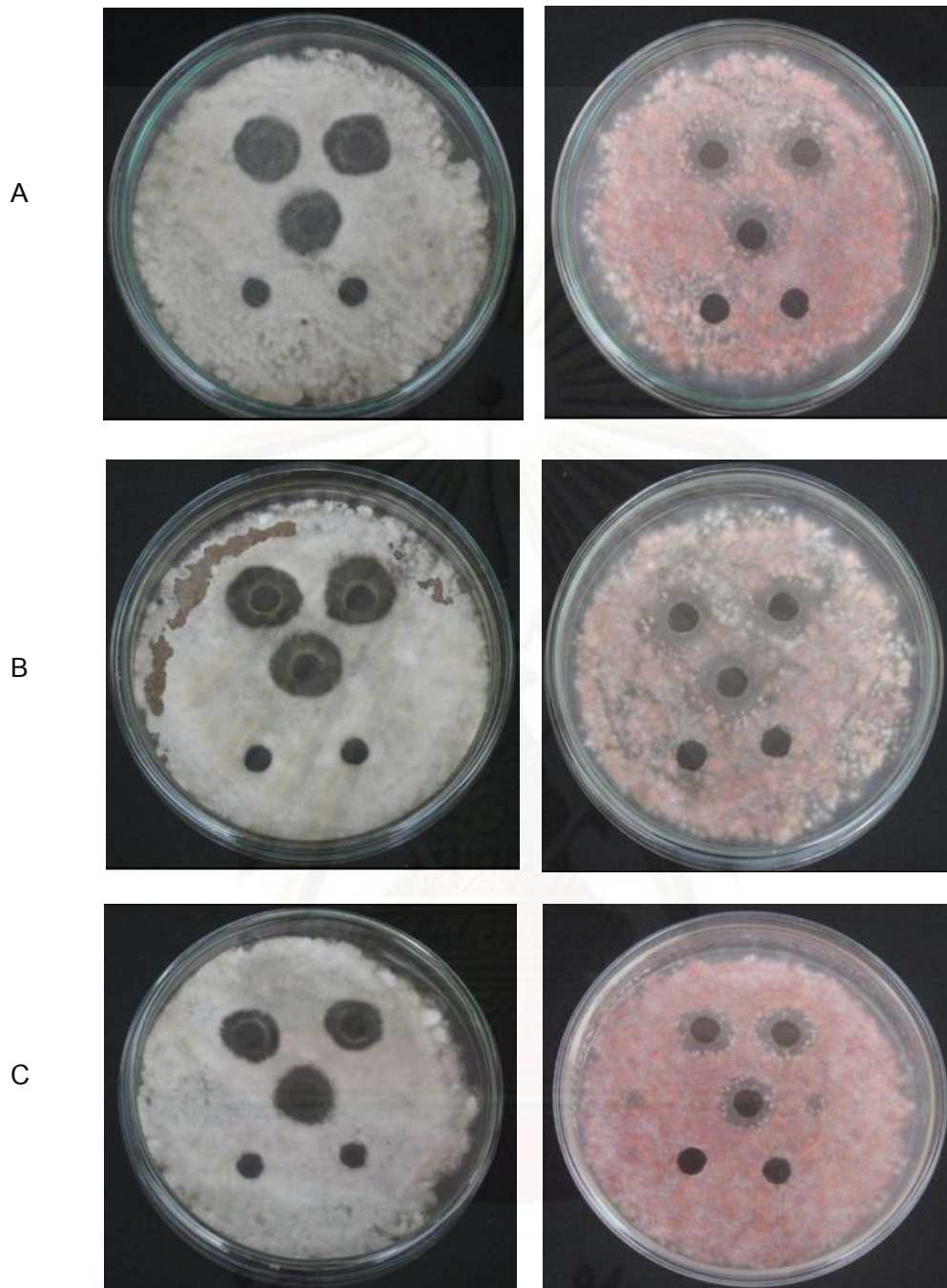
4.2.1 การหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์

จากผลการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อครั้งละ 3 หลอด ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา พบว่าแบคทีเรีย M10 สร้างสาร

ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราโรคพืชได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 จนถึงชั่วโมงที่ 21 โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งได้มากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 18 ซึ่งแสดงถึงการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชได้ดีที่สุดที่เวลานี้ โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟการเจริญของแบคทีเรียแล้ว การสร้างสารออกฤทธิ์นี้มีการสร้างในช่วง late stationary phase ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ความกว้างของบริเวณยับยั้งต่อรา *C. capsici* ในช่วงชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 มีขนาด 3.4, 6.3 มม. และ 3.0 มม. ตามลำดับ และต่อรา *Fusarium* sp. ช่วงชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 มีขนาด 2.8 มม., 3.0 มม., และ 2.5 มม. ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) และแสดงให้เห็นได้เด่นชัดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ว่าสารออกฤทธิ์นี้มีประสิทธิภาพใน



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. capsici* และรา *Fusarium* sp. โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย M10 ในช่วงชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. capsici* [ซ้าย] และ *Fusarium* sp. [ขวา] โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย M10 ในชั่วโมงที่ 15, 18 และ 21 [A, B และ C ตามลำดับ] ที่ระยะเวลา 7 วัน (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม (อาหารเหลว NB))

4.2.2 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย M10 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 18 ชั่วโมง ซึ่งมีแอกทิวิตี มากที่สุด แล้วแยกตะกอนเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยง ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแอกทิวิตีที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 0-40%, 40-60% และ 60-80% จากนั้นนำตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วงละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วนำไปขจัดเกลือออกโดยการไดอะไลซิส

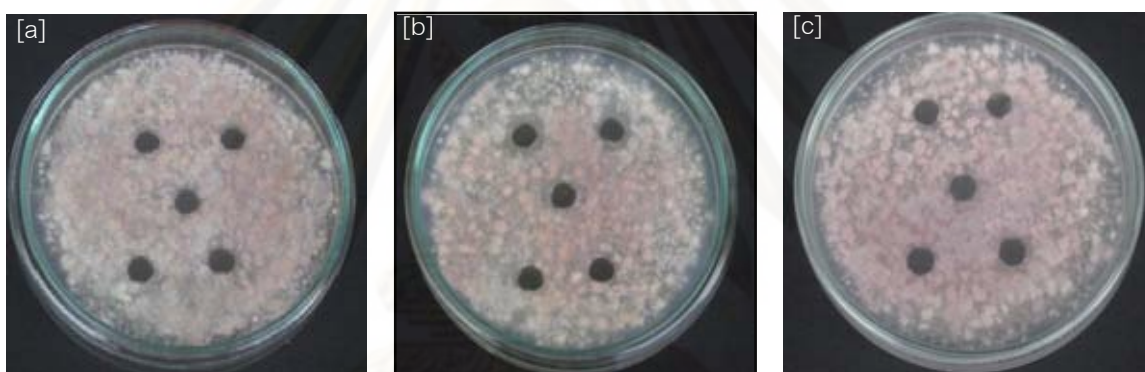
เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ได้ในแต่ละช่วงมาทดสอบแอกทิวิตีต่อการยับยั้งราก่อโรค ทั้งสองชนิด พบว่าสำหรับรา *C. capsici* นั้น โปรตีนทุกช่วงยังคงมีแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของรา ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.10 โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งมากที่สุดจากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนในช่วง 40-60% ในขณะที่สำหรับรา *Fusarium* sp. พบแอกทิวิตีในการยับยั้งรานี้ได้จากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนในช่วง 40-60% เท่านั้น ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.11 ดังนั้นจึงเลือกช่วงการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-60% เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไป และเนื่องจากโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วง 40-60% นี้สามารถยับยั้งรา *Fusarium* sp. ได้น้อยกว่ารา *C. capsici* ดังนั้นในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่อไปจึงเลือกทดสอบกับรา *C. capsici* เพียงชนิดเดียวก่อน

ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของราจากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40%, 40-60% และ 60-80%

แอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง ในการยับยั้งราก่อโรคในพีช (มิลลิเมตร)	
	<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Fusarium</i> sp.
0-40	3.1	-
40-60	8.3	2.4
60-80	6.2	-



รูปที่ 4.10 การยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% [a] ช่วง 40-60% [b] และช่วง 60-80% [c] (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม (50 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์))



รูปที่ 4.11 การยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-40% [a] ช่วง 40-60% [b] และช่วง 60-80% [c] (หมายเหตุ: บริเวณ 3 หลุมด้านบนคือ ชุดทดลอง และ 2 หลุมด้านล่างคือ ชุดควบคุม (50 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์))

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้ง รา *C. capsici* จากส่วนน้ำใสตั้งก่อนการตกตะกอนโปรตีนและหลังการตกตะกอนโปรตีนในช่วงที่ 0-40%, 40-60% และ 60-80% ได้ปริมาณโปรตีน 2.436, 0.435, 2.512 และ 8.200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1,205.82, 4.35, 25.12 และ 82.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ และตรวจพบว่าการตกตะกอนโปรตีนในช่วงที่ 40-60% ให้แอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะมากที่สุด คือ 320 AU/มิลลิลิตร และ 127.39 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ แอกทิวิตีรวมก่อนการตกตะกอนมี

โปรตีน 19,800 AU และมีแอกทิวิตีรวมลดลงหลังการตกตะกอนโปรตีน เป็น 400, 3,200 และ 1,600 AU ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici*

ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น	495	2.436	1,205.82	40	16.42	19,800	1
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40%	10	0.435	4.35	40	91.95	400	5.59
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60%	10	2.512	25.12	320	127.39	3,200	7.76
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80%	10	8.200	82	160	19.51	1,600	1.18

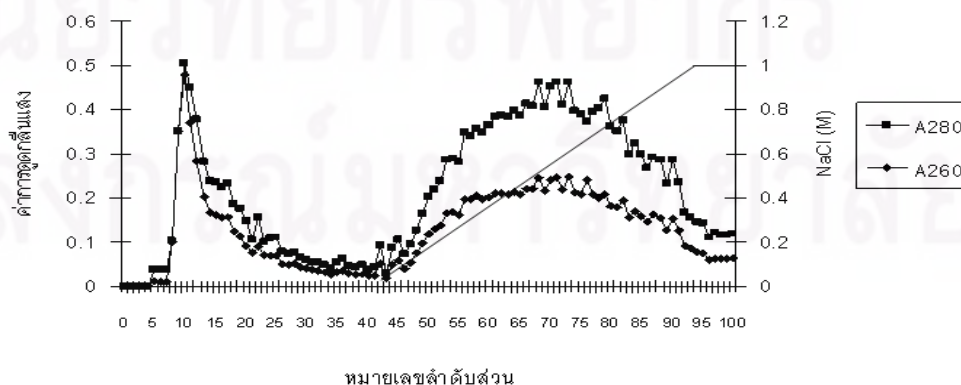
4.2.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ขยายขนาดการเลี้ยงแบคทีเรีย M10 เป็น 1 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 18 ชั่วโมง ซึ่งให้แอกทิวิตีมากที่สุด จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงตกตะกอน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. capsici* จากส่วนน้ำใสที่แยกได้ พบว่าได้แอกทิวิตีรวมทั้งหมด 80,000 AU คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 4,681 มิลลิกรัม และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 17.09 AU/มิลลิกรัมของโปรตีน เมื่อนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-60% ซึ่งให้แอกทิวิตีมากที่สุดดังกล่าวมาแล้ว พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 7.49 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับแอกทิวิตี

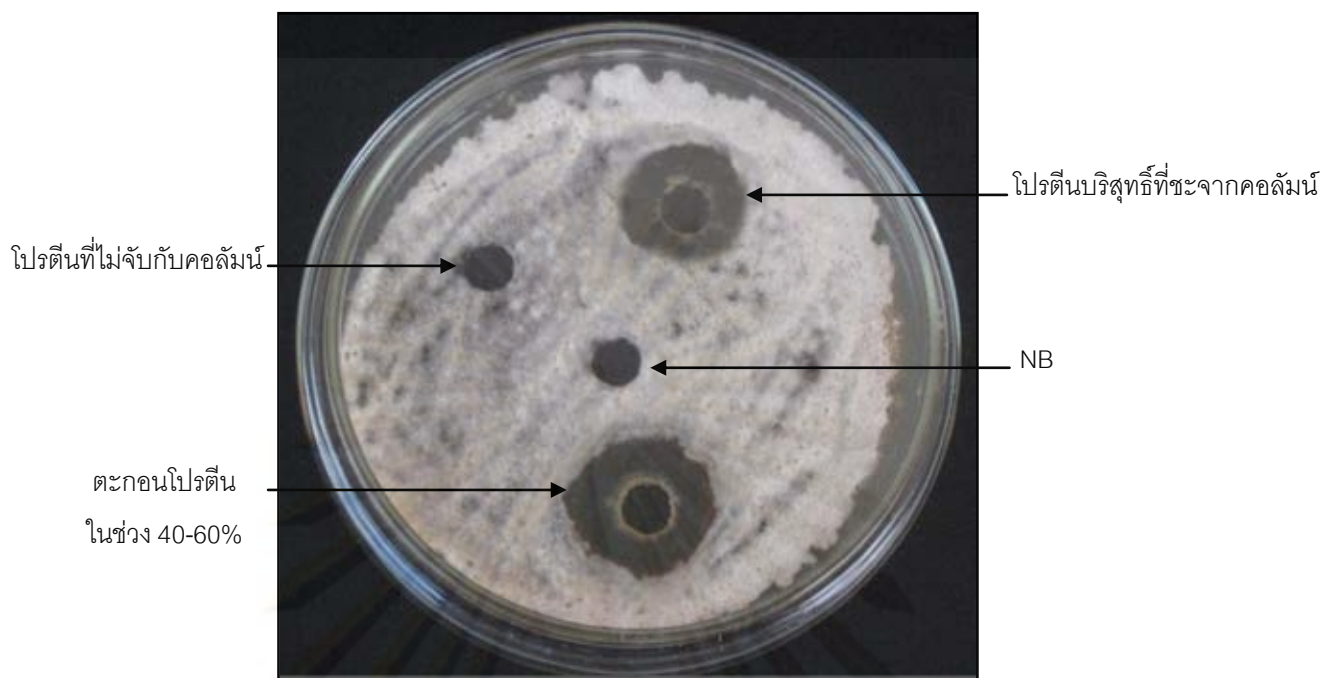
จำเพาะของสารสกัดโปรตีนเริ่มต้น และมีแอกทิวิตี 1,920 AU/มิลลิลิตร และพร้อมนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.2.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)

นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-60% โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 และผ่านการไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ที่มี 30% กลีเซอรอล แล้ว มาทำให้บริสุทธิ์โดย วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion exchanger) ตามวิธีในข้อ 3.7.6 จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเก็บลำดับส่วนๆ ละ 1 มล. แล้วติดตามโปรตีนโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เมื่อปริมาณโปรตีนลดลงเกือบเป็นศูนย์จึงชะด้วยเกรเดียนต์ของ 1 โมลาร์ NaCl ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วติดตามโปรตีนต่อ ผลการทดลองการติดตามปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการชะด้วยเกรเดียนต์ของ NaCl ปรากฏพีก (peak) ของโปรตีน 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (unbound protein) ที่ออกมาก่อนการชะด้วยเกรเดียนต์ของ NaCl และช่วงที่สองเป็นโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ และถูกชะออกมาระหว่างการชะด้วยเกรเดียนต์ของ NaCl ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.12 เมื่อนำโปรตีนในลำดับส่วนที่ 7-20 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และลำดับส่วนที่ 45-90 ซึ่งเป็นช่วงหลังการชะด้วยเกรเดียนต์ของ NaCl ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Fusarium* sp. พบว่าโปรตีนทั้งสองช่วงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Fusarium* sp. เมื่อนำโปรตีนทั้งสองช่วงไปทดสอบกับ *C. capsici* พบว่าโปรตีนช่วงที่เกิดหลังการชะด้วยเกรเดียนต์ของ NaCl เท่านั้น (ลำดับส่วนที่ 45-90) ที่มีแอกทิวิตีในการยับยั้งรา ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.13 ขั้นตอนและผลการทำโปรตีนจากแบคทีเรีย M10 ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.12 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ



รูปที่ 4.13 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* โดยโปรตีนที่ไม่จับกับคอแลคมีน และโปรตีนบริสุทธิ์ที่ชะจากคอแลคมีน ดิอีเออี ไบโอ- เจล เอ เปรียบเทียบกับสารละลาย โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนในช่วง 40-60% และ อาหารเลี้ยงเชื้อ (NB)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. capsici* จากส่วนน้ำใสทั้งหมดก่อนการตกตะกอนโปรตีน หลังการตกตะกอนโปรตีนในช่วงที่ 40-60% และ จากการผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดย ดิอีเออี ไบโอ- เจล เอ ในช่วงที่หนึ่งและสอง ได้ปริมาณโปรตีน 4.681, 5.0, 2.398 และ 0.211 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 4,681, 15.00, 3.59 และ 1.266 มิลลิกรัม ตามลำดับ และตรวจพบว่าโปรตีนในช่วงที่สองให้แอกทิวิตีจำเพาะมากที่สุดและมีความจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 11.10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอกทิวิตีจำเพาะของสารสกัดโปรตีนเริ่มต้น คิดเป็นแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 240 AU ส่วนโปรตีนในช่วงที่หนึ่งตรวจไม่พบแอกทิวิตี ดังแสดงในตารางที่ 4.3

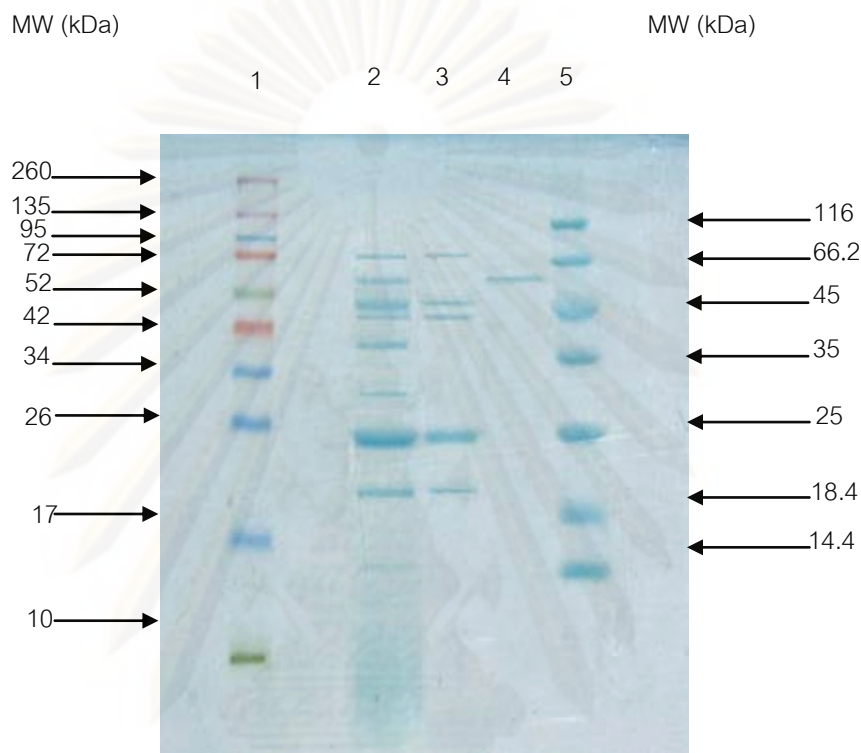
ตารางที่ 4.3 ขั้นตอนการทำโปรตีนจากแบคทีเรีย M10 ให้บริสุทธิ์

ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร)	แอกทิวิตี จำเพาะ (AU/มิลลิกรัม ของโปรตีน)	แอกทิวิตี ดีรวม (AU)	ความ บริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดโปรตีน เริ่มต้น	1,000	4.681	4,681	80	17.09	80,000	1.00
ตะกอน แอม โมเนียม ซัลเฟต 40-60%	3	5.0	15.00	640	128	1,920	7.49
โปรตีนที่ไม่จับกับ คอลัมน์	1.5	2.398	3.59	0	0	0	0.00
โปรตีนบริสุทธิ์จาก การชะด้วย NaCl	6	0.211	1.266	40	189.57	240	11.10

4.2.5 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำ บริสุทธิ์ได้ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทร โฟริซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

จากการนำโปรตีนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และโปรตีนช่วงที่ 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และช่วงที่ 2 ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากการผ่าน คอลัมน์โครมาโทกราฟีบน ดีอีเออี ไบโอ- เจล เอ มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยการทำ SDS-PAGE โดยใช้โปรตีนตัวอย่างละ 5 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.14 โดยพบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนจาก แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราเกิดแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก และเมื่อนำมาทำบริสุทธิ์ต่อพบว่าโปรตีนช่วงที่ 1 ที่ได้มีจำนวนของแถบโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ โปรตีนที่ตกตะกอนจากแอมโมเนียมซัลเฟต

สำหรับโปรตีนช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรานั้น ให้โปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน ช่วงที่ 2 บน SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55.35 kDa



รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

- | | |
|--------------|--|
| ช่องที่ 1, 5 | โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง |
| ช่องที่ 2 | โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-60% |
| ช่องที่ 3 | โปรตีนช่วงที่ 1 (โปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ) |
| ช่องที่ 4 | โปรตีนช่วงที่ 2 (โปรตีนบริสุทธิ์ที่ชะจากคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ) |

4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศ พันธุ์ สีดา พันธุ์ท้อ และพันธุ์ราชินี ด้วยโปรตีนที่แยกได้

4.3.1 ผลของรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคของมะเขือเทศพันธุ์สีดา และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

เบื้องต้นได้ทดสอบรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดาโดยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผลของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่าราทำให้เกิดอาการแอนแทรคโนสกับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะเป็นแผลวงสีดำอันเนื่องมาจากสปอร์ ของรา ดังรูปที่ 4.15 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลลบ ซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.15 [b])

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา โดยหยดสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.15 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.15 แสดงการเกิดโรคของรา *C. capsici* (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศสีดา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *C. capsici* กับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการ ยับยั้งการเกิดโรคของราบนผลของมะเขือเทศนั้น ได้ทำให้มะเขือเทศเกิดโรคโดยการใส่สารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนผลของมะเขือเทศแล้วบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงหยดโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคนั้น ได้หยดโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆลงบนผลของมะเขือเทศก่อน บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ราก่อโรค

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 2.4, 1.17, 0.51 และ 0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนั้นเมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนผลของมะเขือเทศก่อนใส่รา *C. capsici* นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้ ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น โดยวัดความกว้างได้ 0.49 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.4

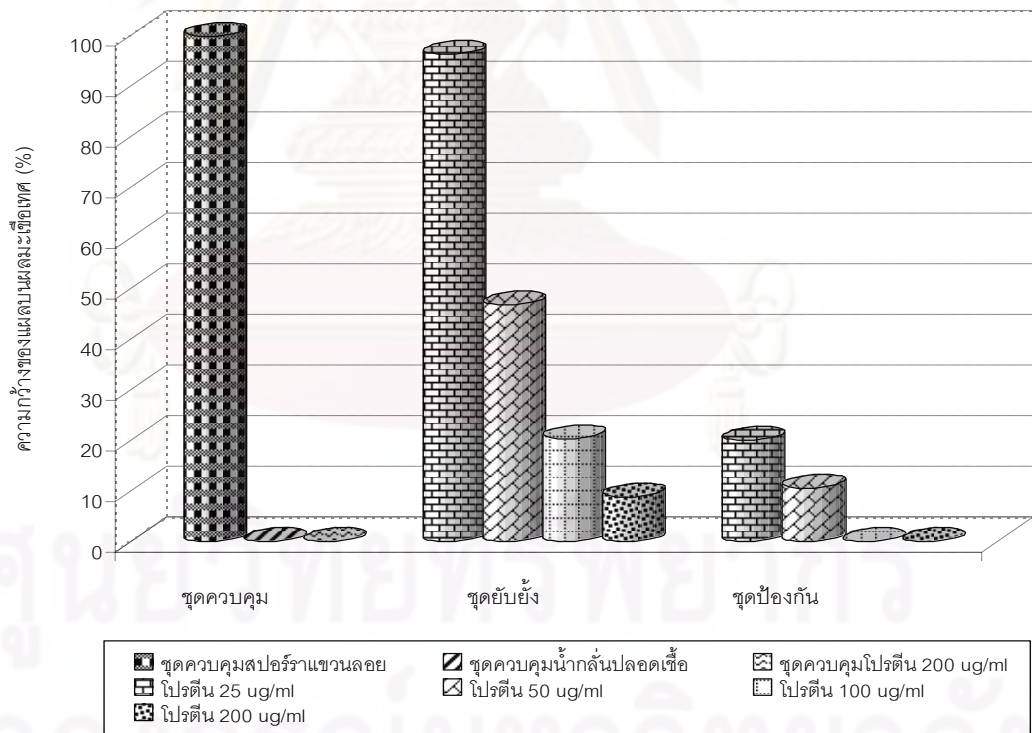
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา

C. capsici บนผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา

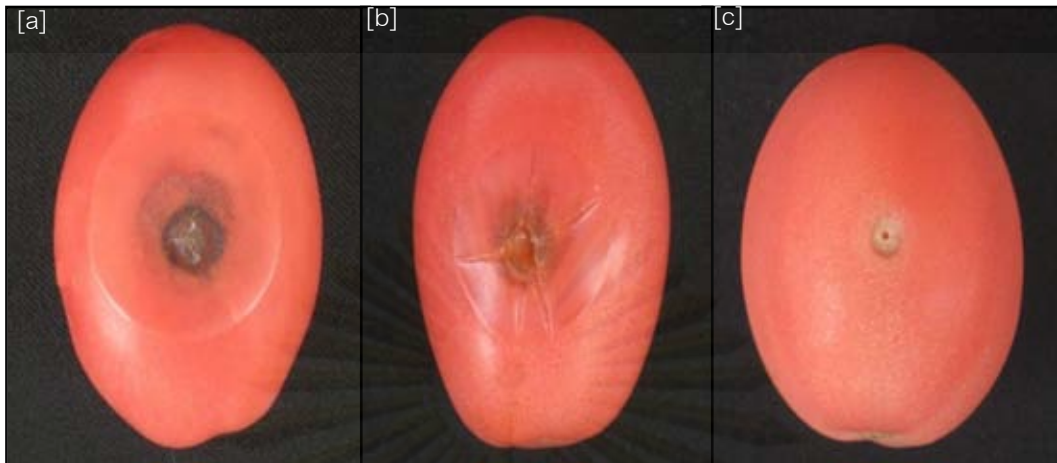
การทดลอง	ความกว้างของแผล (เซนติเมตร) ที่ความเข้มข้นโปรตีนต่างๆ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	2.49 \pm 0.017 ^a	2.40 \pm 0.01 ^b	1.17 \pm 0.057 ^c	0.51 \pm 0.025 ^d	0.22 \pm 0.01 ^e
ป้องกัน	2.49 \pm 0.017 ^a	0.49 \pm 0.0057 ^b	0.26 \pm 0.0115 ^c	0.00 \pm 0.00 ^d	0.00 \pm 0.00 ^d

หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

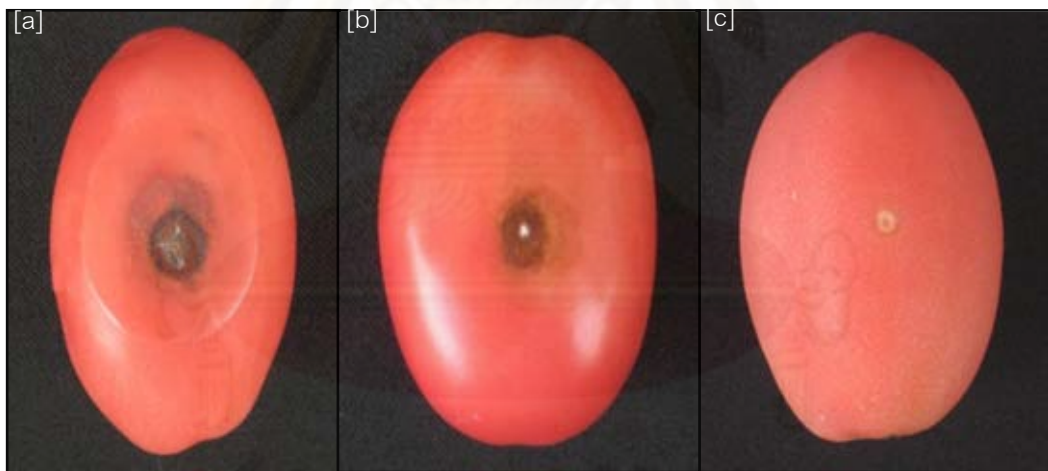
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.16 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศ โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้ง คือ 96.38%, 46.85%, 20.35% และ 8.84% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลที่ความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น คือ 19.96%, และ 10.57% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้น และจากรูปที่ 4.17- 4.20 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ทดสอบผลการยับยั้งและการป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จากความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *C. capsici* ของผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



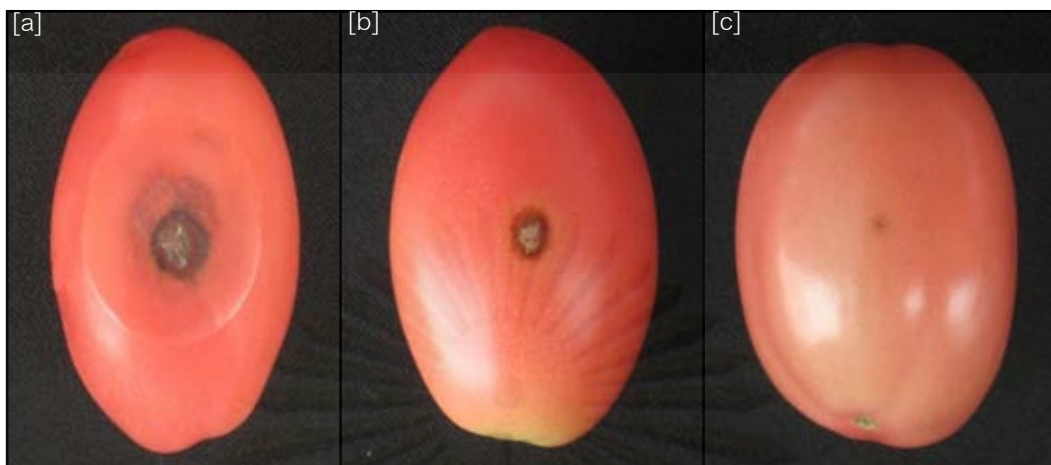
รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *C. capsici* โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์สีดาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



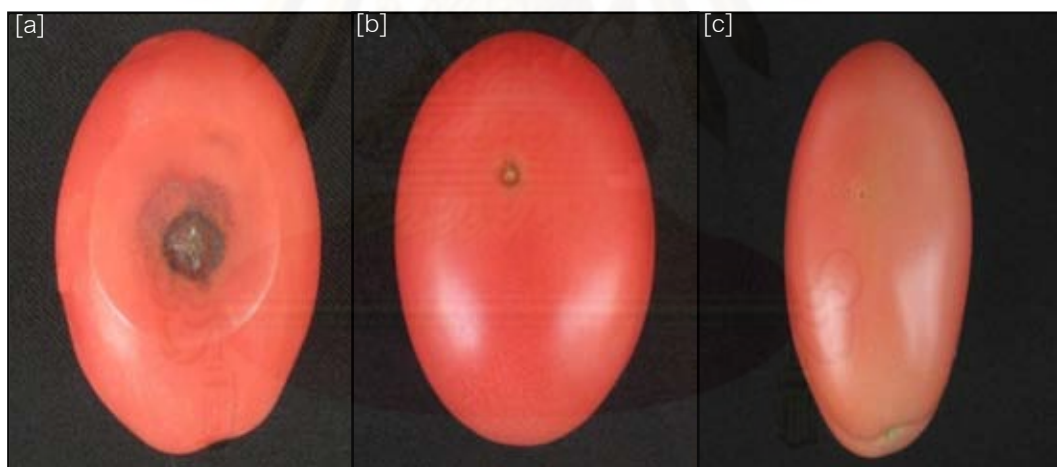
รูปที่ 4.17 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.18 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.19 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

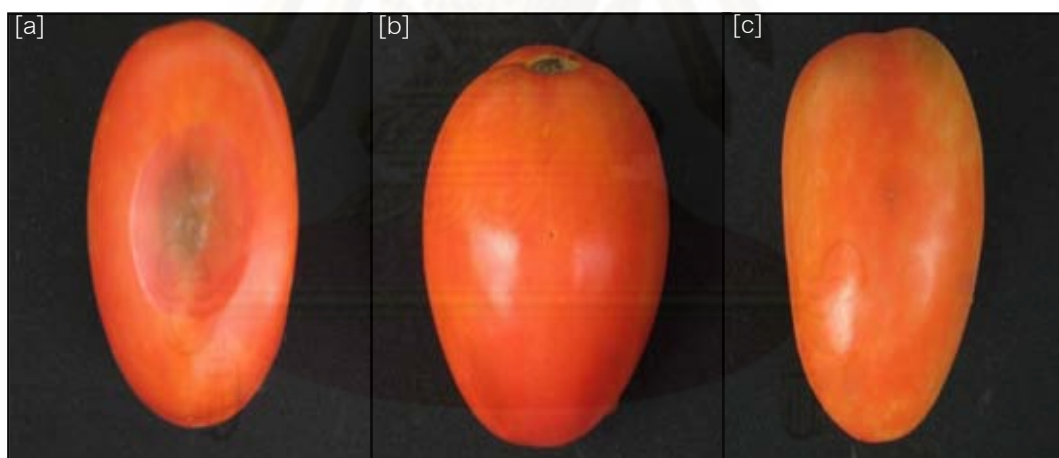


รูปที่ 4.20 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจาก รา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

4.3.3 ผลของรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคกับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

ในการทดสอบรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อโดยการหดยีสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผลของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่าราทำให้เกิดอาการแอนแทรกคโนสกับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะเป็นแผลเน่าซ้ำ เป็นวงกว้างสีน้ำตาลเข้มบริเวณแผล ดังรูปที่ 4.21 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.21 [b])

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ โดยหดยีสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.21 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.21 แสดงการเกิดโรคของรา *C. capsici* (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.4 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *C. capsici* กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 1.20 0.43 0.21 และ 0.12 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรค เมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของมะเขือเทศท้อ นใส่รา *C. capsici* นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น โดยวัดความกว้างได้ 0.34 และ 0.27 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.5

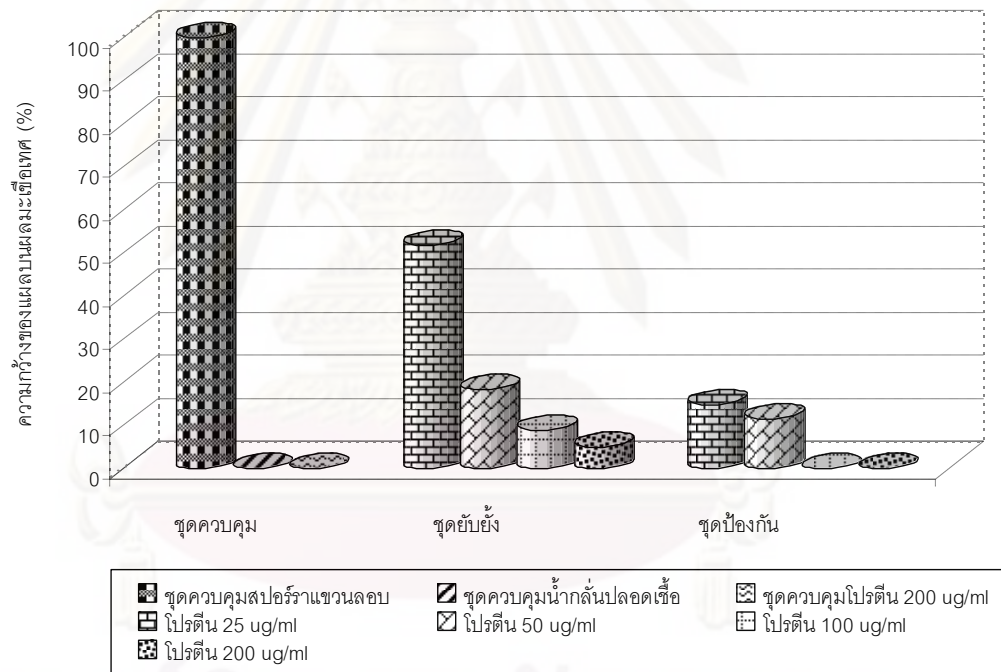
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* บนผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ

การทดลอง	ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	2.31 \pm 0.015 ^a	1.20 \pm 0.015 ^b	0.43 \pm 0.021 ^c	0.21 \pm 0.040 ^d	0.12 \pm 0.012 ^e
ป้องกัน	2.31 \pm 0.015 ^a	0.34 \pm 0.021 ^b	0.27 \pm 0.035 ^c	0.00 \pm 0.00 ^d	0.00 \pm 0.00 ^d

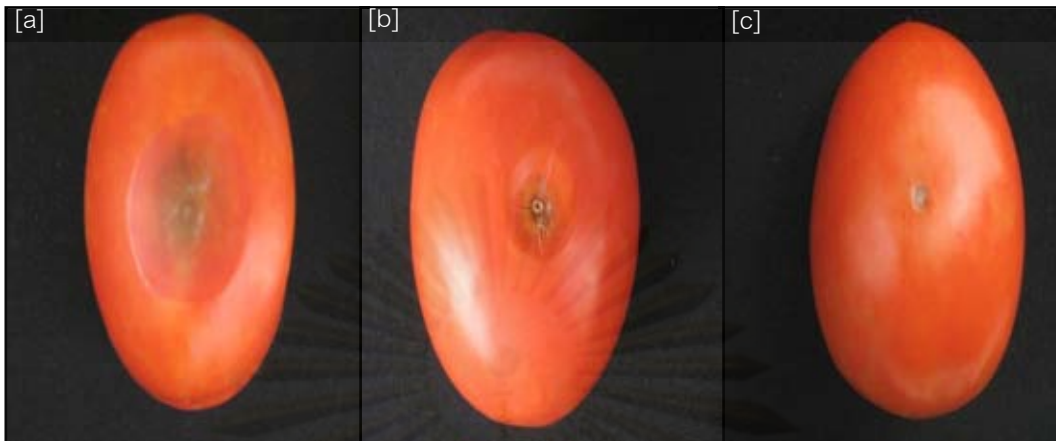
หมายเหตุ: * แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.22 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศ โดยที่ความ

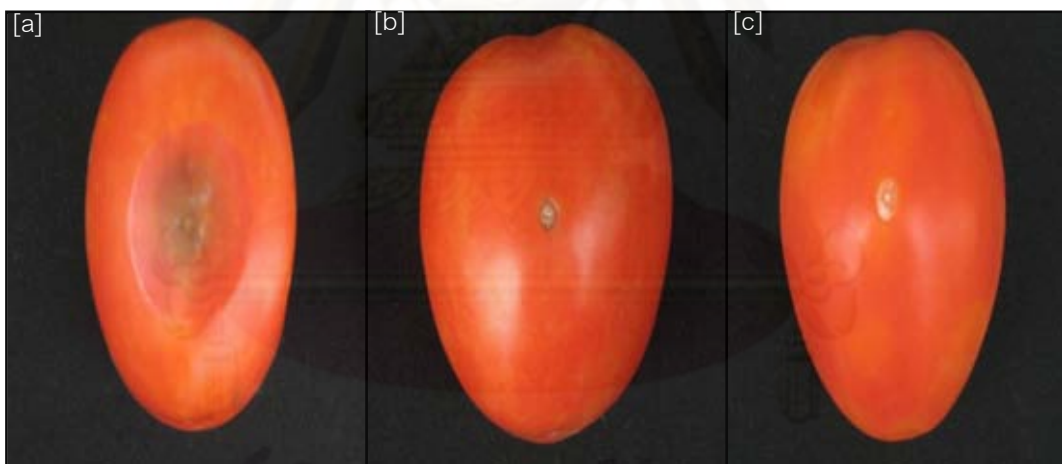
เข้มข้นโปรตีน 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้ง คือ 51.88%, 18.32%, 8.95% และ 5.05% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลที่ความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น คือ 14.86%, และ 11.55% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเกิดแผลเกิดขึ้น และจากรูปที่ 4.23- 4.26 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อที่ทดสอบผลการยับยั้งและการป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จากความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *C. capsici* ของผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



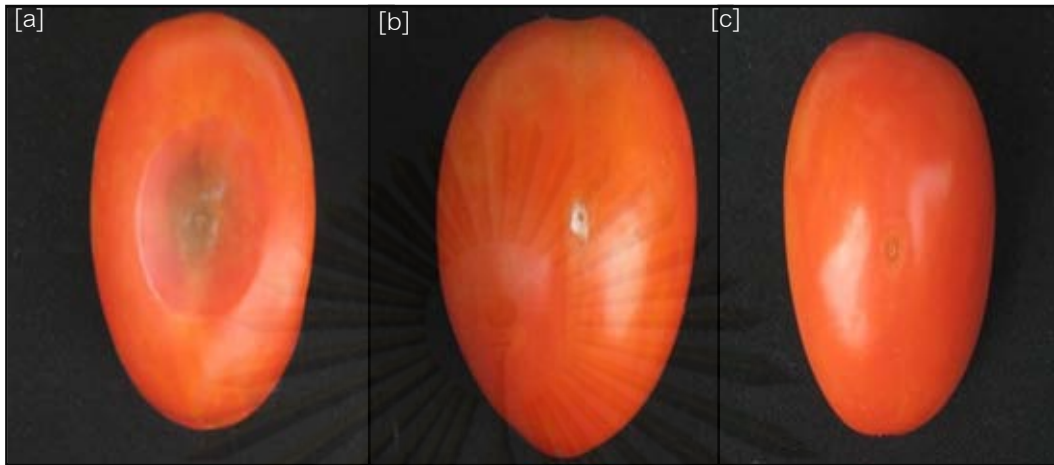
รูปที่ 4.22 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *C. capsici* โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



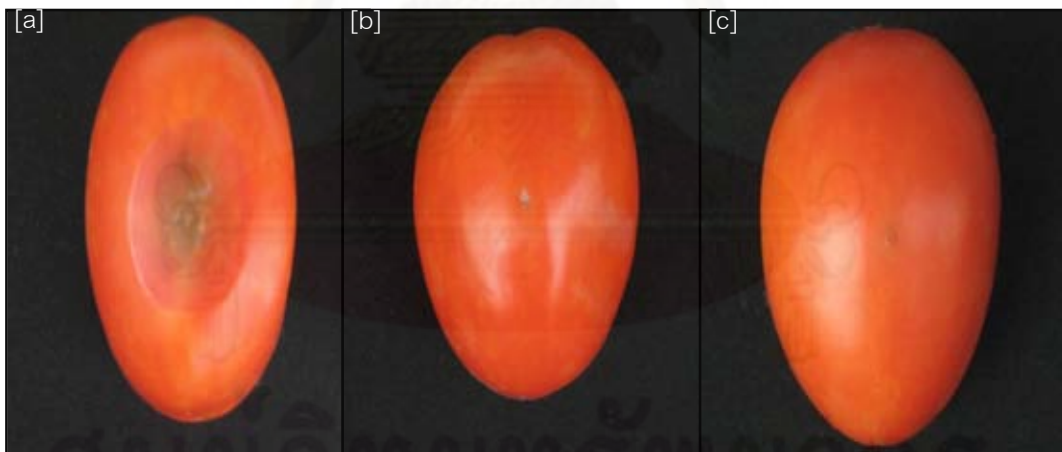
รูปที่ 4.23 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.24 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.25 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

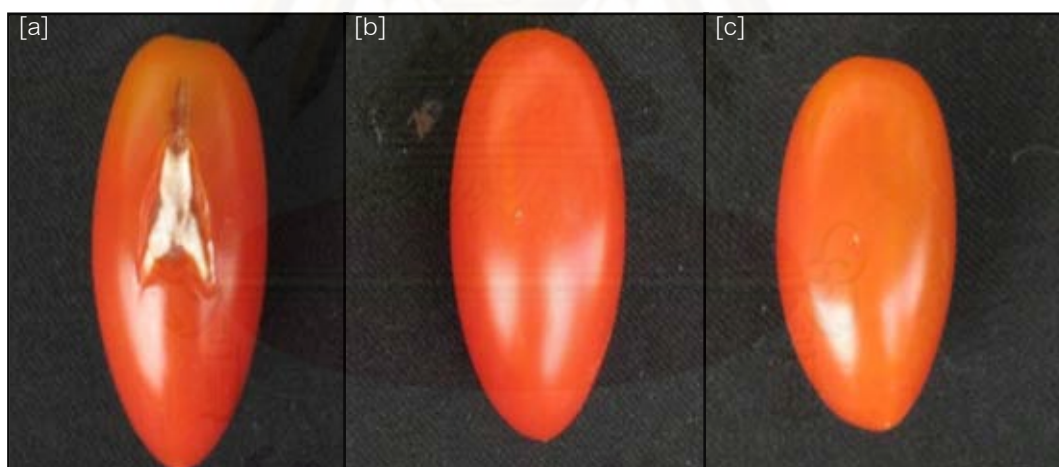


รูปที่ 4.26 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

4.3.5 ผลของรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

เมื่อทดสอบรา *C. capsici* ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินีโดยการหดยดสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผล ของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วันพบว่าราทำให้เกิดอาการแอนแทรคโนสกับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะผลเน่าและ ซ้ำ และพบเส้นใยราบริเวณแผล ดังรูปที่ 4.27 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.27 [b])

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี โดยหดยดสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.27 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.27 แสดงการเกิดโรคของรา *C. capsici* (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.6 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *C. capsici* กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 1.10 0.73 0.41 และ 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนั้นเมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของมะเขือเทศก่อนใส่รา *C. capsici* นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น โดยวัดความกว้างได้ 0.49 และ 0.21 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.6 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.6

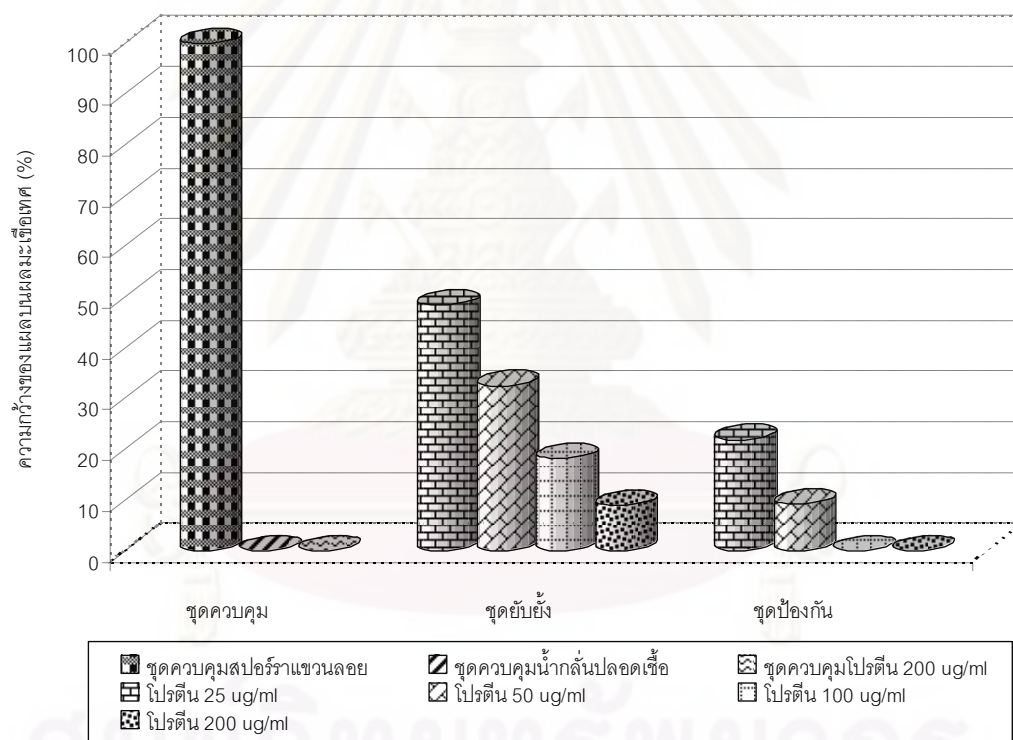
ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* บนผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี

การทดลอง	ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	2.25 \pm 0.026 ^a	1.10 \pm 0.079 ^b	0.73 \pm 0.152 ^c	0.41 \pm 0.010 ^d	0.20 \pm 0.010 ^e
ป้องกัน	2.25 \pm 0.026 ^a	0.49 \pm 0.011 ^b	0.21 \pm 0.021 ^c	0.00 \pm 0.00 ^d	0.00 \pm 0.00 ^d

หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.28 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศที่ความเข้มข้น

โปรตีน 25, 50 ,100 และ 200 ไมโครกรัม/ml พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้ง คือ 48.44%, 32.59%, 18.28% และ 8.89% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลที่ความเข้มข้นของโปรตีน 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร เท่านั้น คือ 21.92%, และ 9.18% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ไม่พบการเกิดแผลเกิดขึ้น และจากรูปที่ 4.29- 4.32 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินีที่ทดสอบผลการยับยั้งและการป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จากความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *C. capsici* ของผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



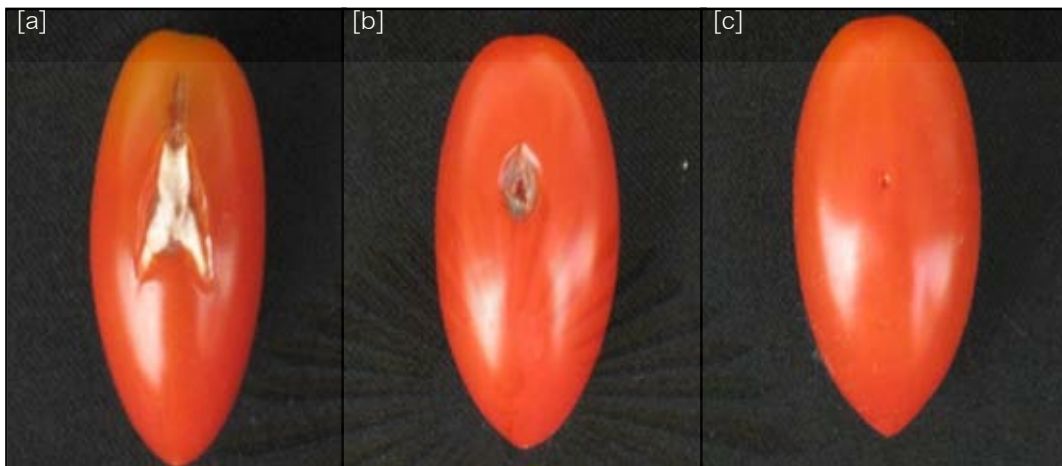
รูปที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *C. capsici* โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



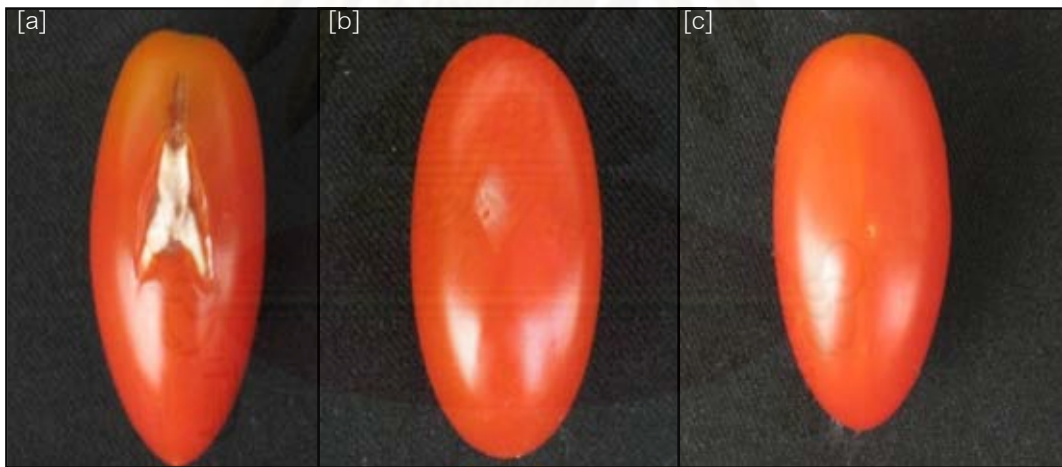
รูปที่ 4.29 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.30 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.31 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง และป้องกันการเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

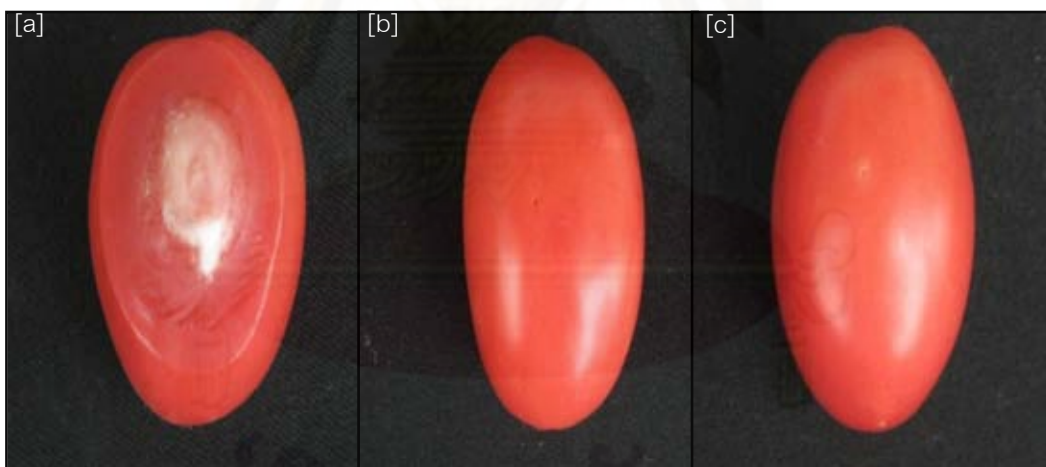


รูปที่ 4.32 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันกา รเกิดโรคจากรา *C. capsici* ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

4.3.7 ผลของรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

เมื่อทดสอบรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดาโดยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผลของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่าราทำให้เกิดอาการของโรคผลเน่ากับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะผลเน่าและเป็นบริเวณกว้าง พบเมือกเหนียวและเส้นใยราบริเวณแผล ดังรูปที่ 4.33 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆ เกิดขึ้น (รูปที่ 4.33 [b])

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา โดยหยดสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆ เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.33 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.33 แสดงการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศสีดา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *Fusarium* sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 2.50 2.10 0.51 และ 0.29 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนั้นเมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของมะเขือเทศก่อนใส่รา *Fusarium* sp. นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 0.50 0.31 0.27 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.7

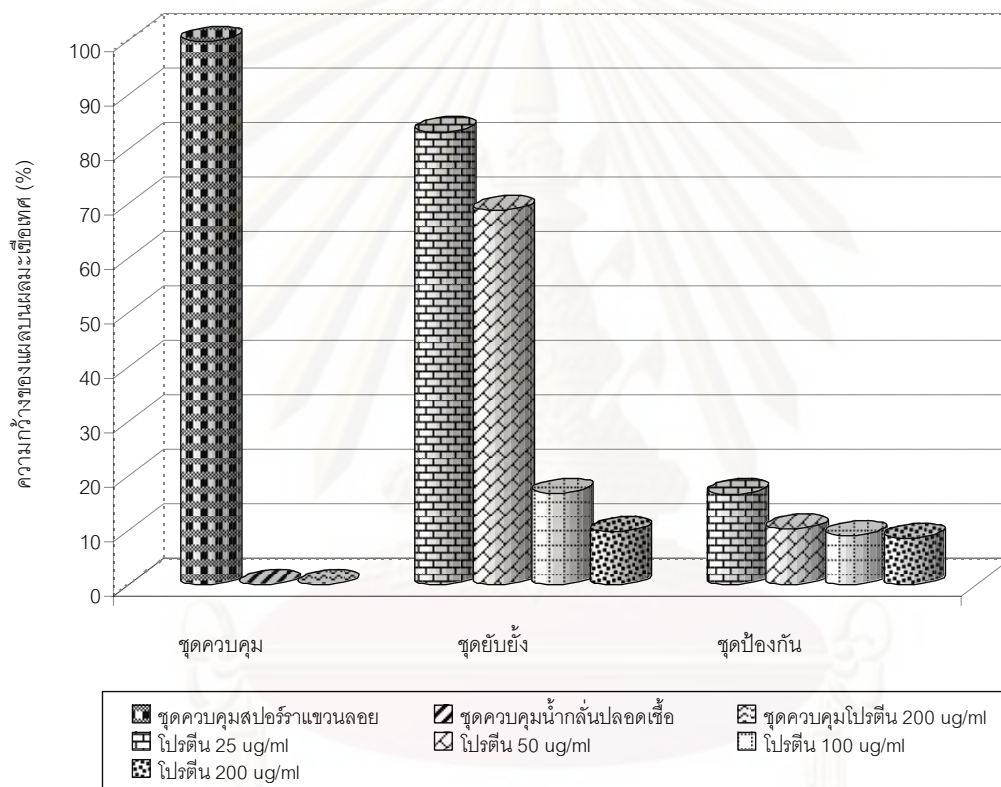
ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา

การทดลอง	ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	3.00 \pm 0.200 ^a	2.50 \pm 0.100 ^b	2.10 \pm 0.252 ^c	0.51 \pm 0.042 ^d	0.29 \pm 0.026 ^e
ป้องกัน	3.00 \pm 0.200 ^a	0.5 \pm 0.100 ^b	0.31 \pm 0.012 ^c	0.27 \pm 0.012 ^c	0.26 \pm 0.031 ^c

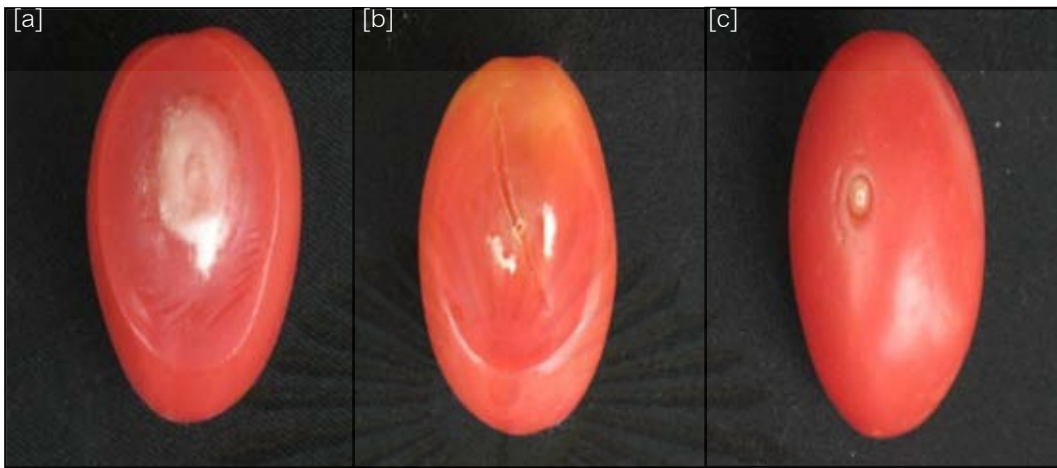
หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.34 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศที่ความเข้มข้นโปรตีน 25, 50 ,100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้งคือ 83.33%, 68.89%, 16.89% และ 9.78% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความ

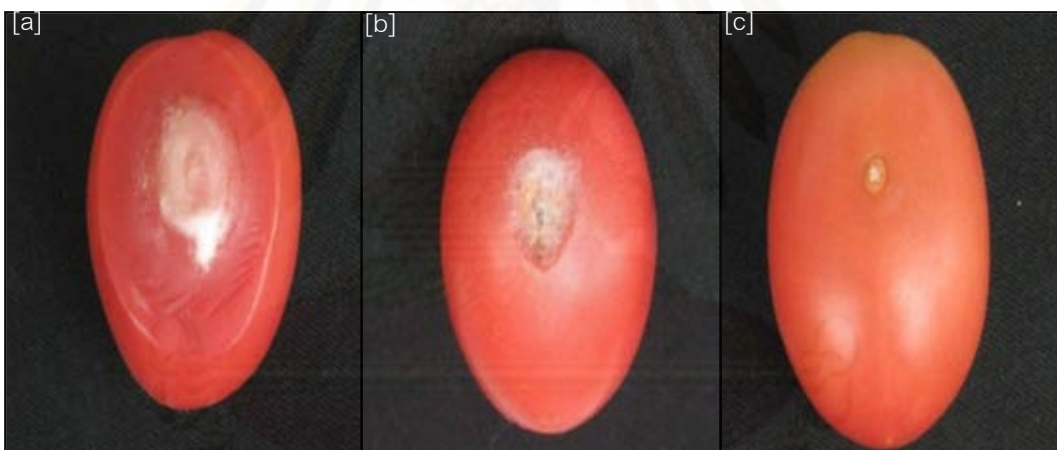
กว้างของแผลเท่ากับ 16.67%, 10.22%, 9.11%, และ 8.56% ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.35-4.38 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ทดสอบผลการยับยั้งและการป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จากความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *Fusarium sp.* ของผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



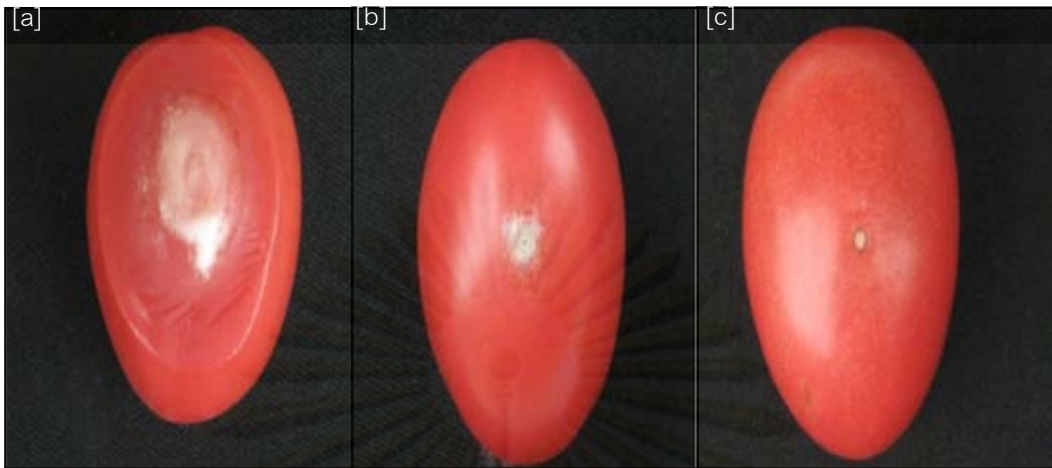
รูปที่ 4.34 เปรียบเทียบการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *Fusarium sp.* โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของ มะเขือเทศ พันธุ์สีดา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



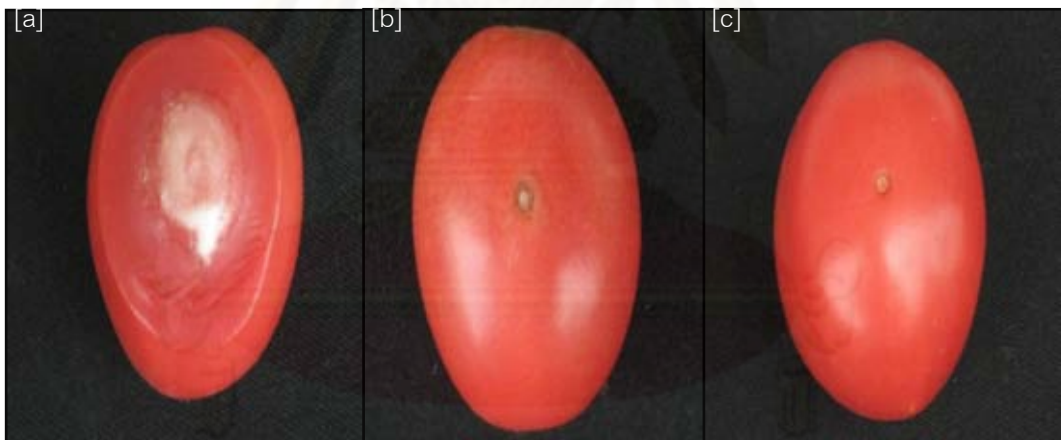
รูปที่ 4.35 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.36 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.37 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

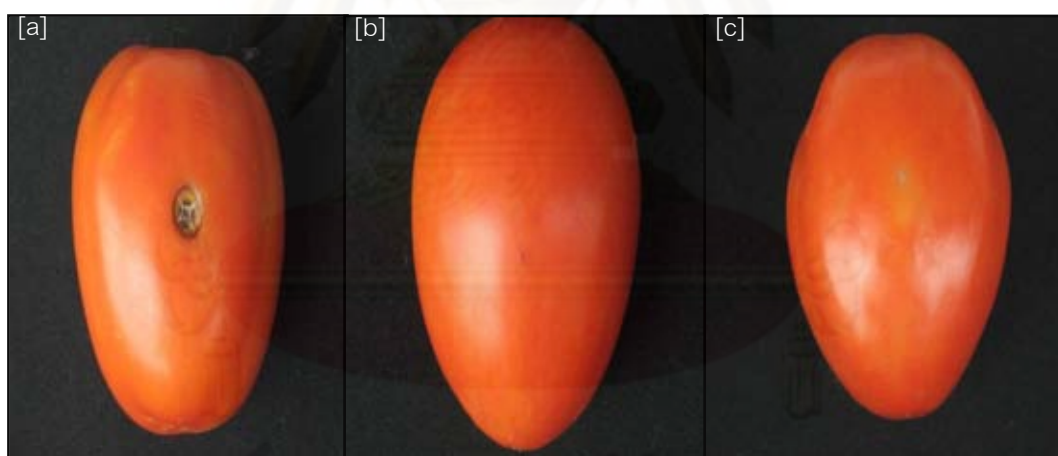


รูปที่ 4.38 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์สีดา (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

4.3.9 ผลของรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

เมื่อทดสอบรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อโดยการหดยีสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผลของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่าราทำให้เกิดอาการของโรคผลเน่ากับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะผลเน่าสีน้ำตาลเข้มบริเวณแผลอันเกิดจากสปอร์ของรา ดังรูปที่ 4.39 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.39 [b])

นอกจากนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ โดยหดยีสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.39 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.39 แสดงการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.10 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *Fusarium* sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 0.79 0.57 0.33 และ 0.23 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนั้นเมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของมะเขือเทศก่อนใส่รา *Fusarium* sp. นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 0.34 0.25 0.23 และ 0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.8

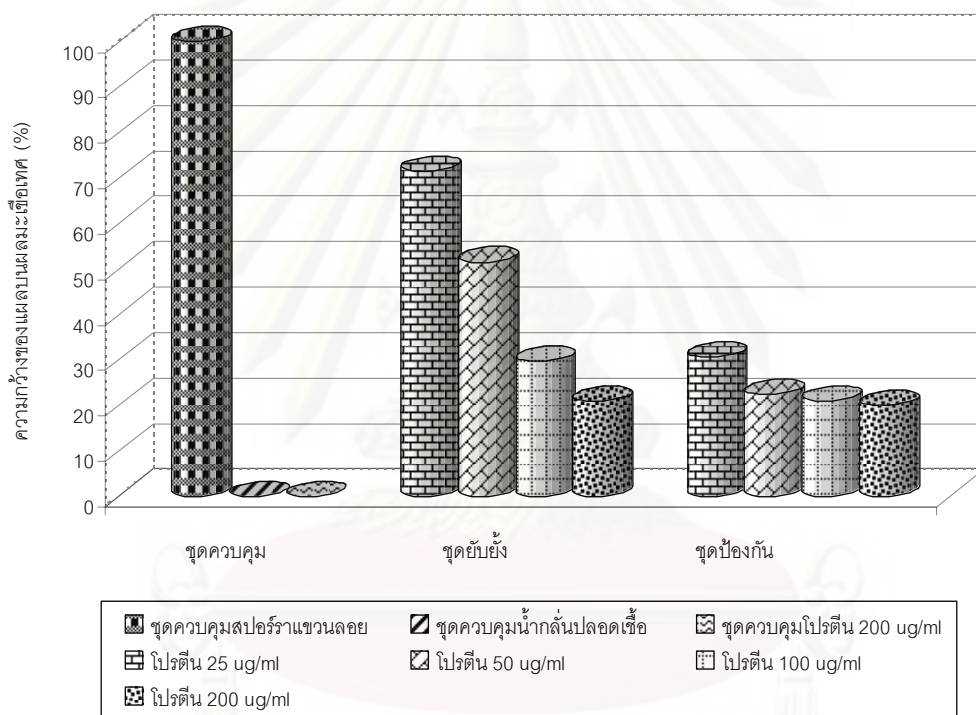
ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ

การทดลอง	ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	1.10 \pm 0.252 ^a	0.79 \pm 0.32 ^b	0.57 \pm 0.029 ^c	0.33 \pm 0.021 ^d	0.23 \pm 0.017 ^e
ป้องกัน	1.10 \pm 0.100 ^a	0.34 \pm 0.026 ^b	0.25 \pm 0.026 ^c	0.23 \pm 0.026 ^c	0.22 \pm 0.02 ^c

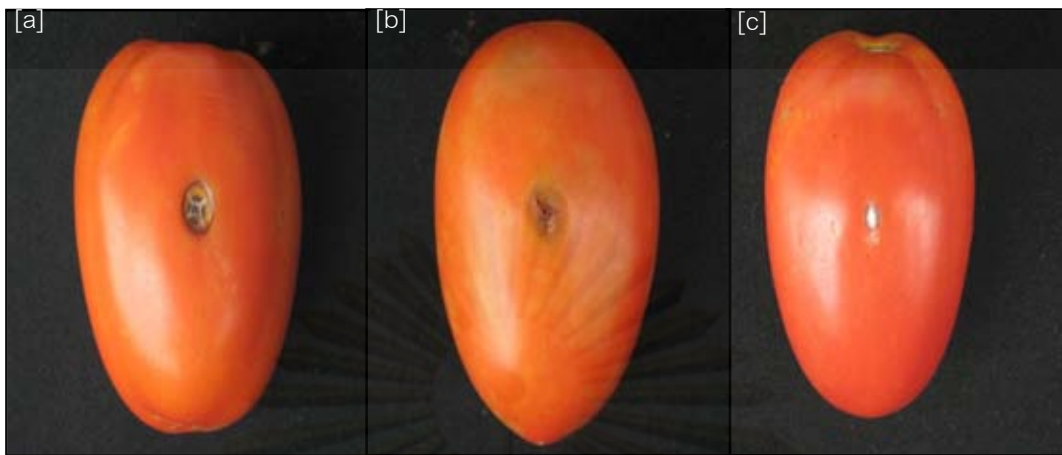
หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.40 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศที่ความเข้มข้นโปรตีน 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้ง

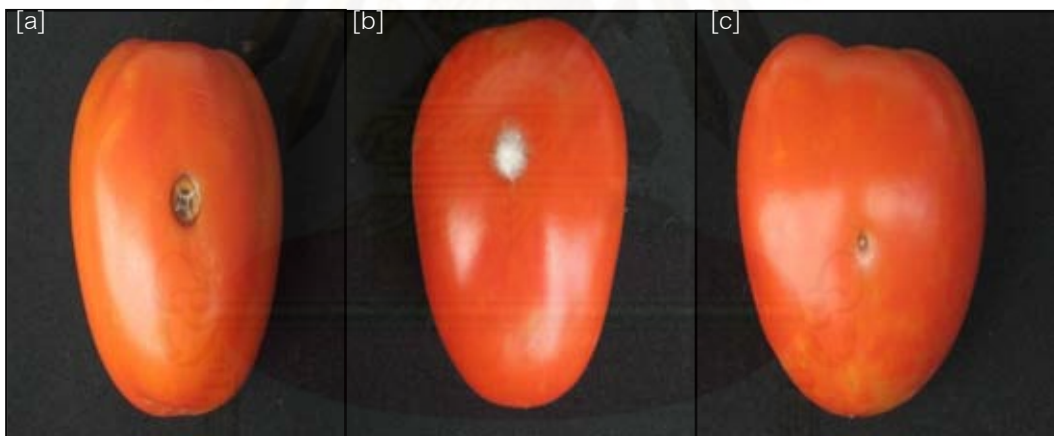
คือ 71.52%, 51.52%, 29.71% และ 20.91% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลเท่ากับ 30.61%, 22.43%, 20.92%, และ 20.00% ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.41-4.44 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อที่ทดสอบผลการยับยั้งและการป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จากความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *Fusarium* sp. ของผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



รูปที่ 4.40 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแชนดรอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



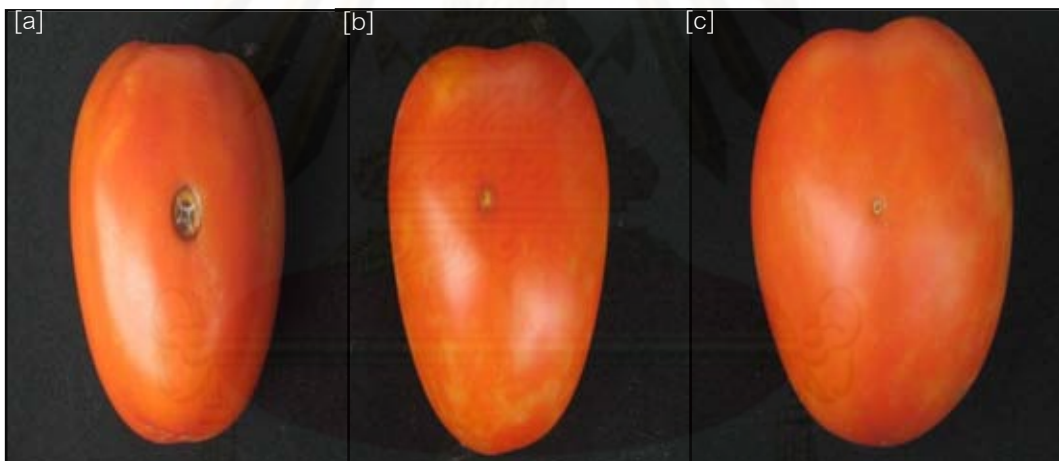
รูปที่ 4.41 แสดงผลทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.42 แสดงผลทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.43 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

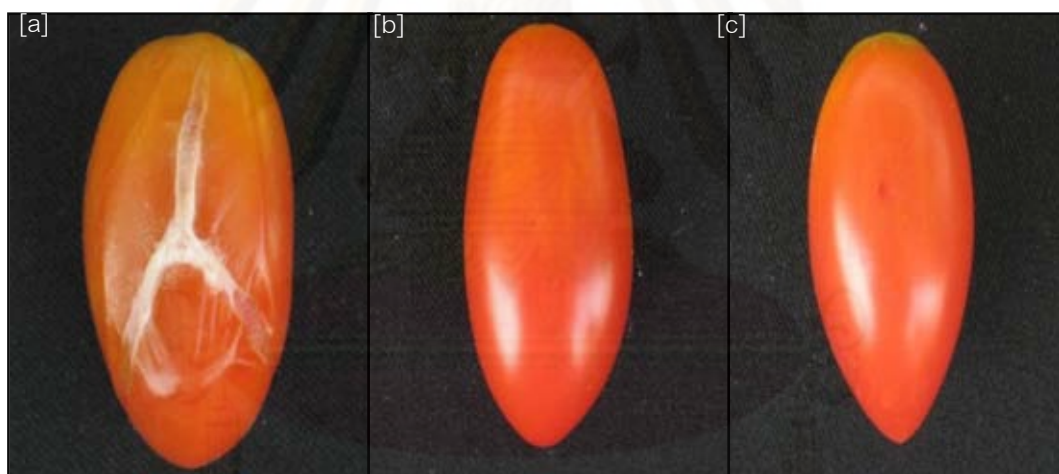


รูปที่ 4.44 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ท้อ (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

4.3.11 ผลของรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อมะเขือเทศ

เมื่อทดสอบรา *Fusarium* sp. ต่อการเกิดโรคกับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินีโดยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ของราลงบนแผลของมะเขือเทศ แล้วบ่มในสภาพที่มีความชื้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่าราทำให้เกิดอาการของโรคผลเน่ากับผลมะเขือเทศโดยพบว่าบริเวณที่มีอาการของโรคมีลักษณะผลเน่าและและซ้ำเป็นบริเวณกว้าง และพบเส้นใยราบริเวณแผล ดังรูปที่ 4.45 [a] ในขณะที่ชุดควบคุมผลบซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารแขวนลอยสปอร์ ไม่พบว่ามีอาการใดๆเกิดขึ้น (รูปที่ 4.45 [b])

นอกจากนี้ ได้ทดสอบผลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี โดยหยดสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของผลมะเขือเทศ พบว่าไม่มีอาการใดๆเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.45 [c] ซึ่งแสดงว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไม่ส่งผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์นี้



รูปที่ 4.45 แสดงการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. (สารแขวนลอยสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) [a]; ผลมะเขือเทศราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบ (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ) [b] และผลของโปรตีนบริสุทธิ์ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [c]

4.3.12 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยรา *Fusarium* sp. กับผลของมะเขือเทศพันธุ์ราชินี

จากการทดลองด้านการยับยั้งการเจริญของราด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นั้น พบว่าวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้ เท่ากับ 2.58 2.40 1.37 และ 0.29 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์นั้นแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนั้นเมื่อใส่สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผลของมะเขือเทศก่อนใส่รา *Fusarium* sp. นั้น พบว่ามะเขือเทศเกิดโรคและวัดความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศได้เท่ากับ 1.2 0.71 0.30 และ 0.28 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.9

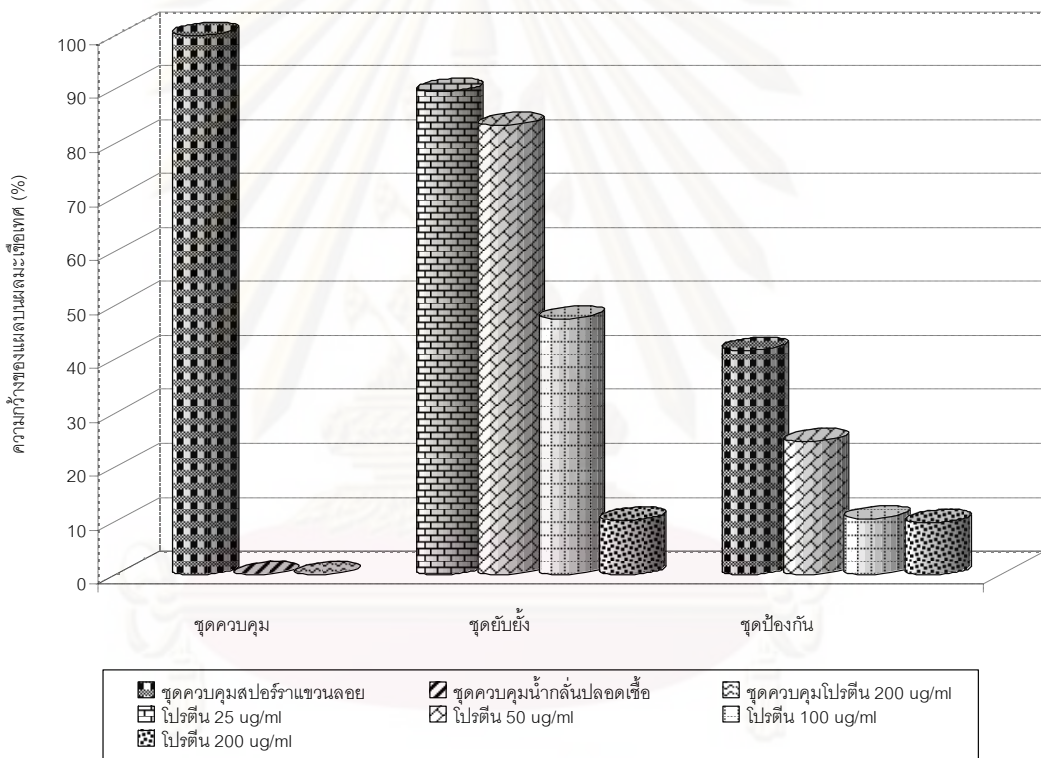
ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแผล (เซนติเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี

การทดลอง	ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
ยับยั้ง	2.88 \pm 0.061 ^a	2.58 \pm 0.026 ^b	2.40 \pm 0.006 ^c	1.37 \pm 0.153 ^d	0.29 \pm 0.010 ^e
ป้องกัน	2.88 \pm 0.061 ^a	1.2 \pm 0.100 ^b	0.71 \pm 0.017 ^c	0.30 \pm 0.010 ^d	0.28 \pm 0.036 ^d

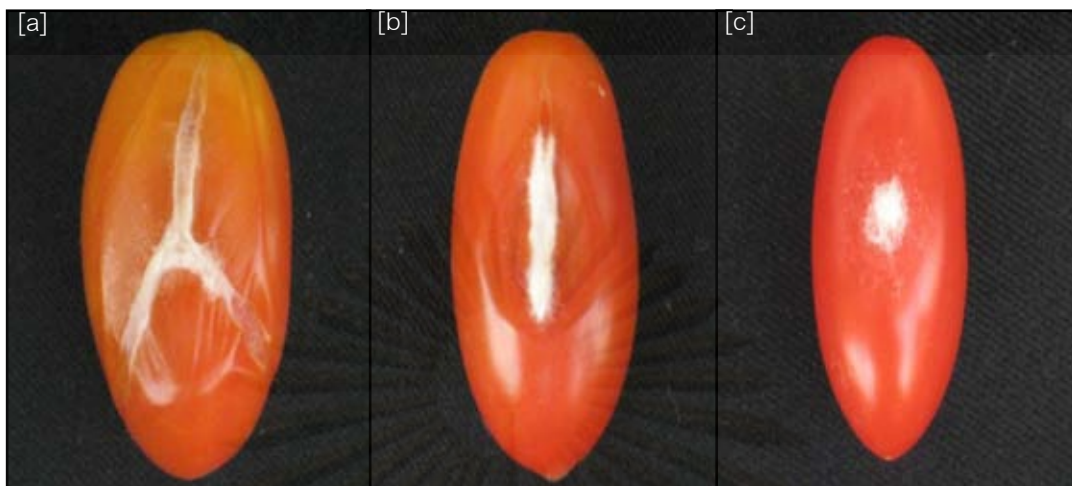
หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ค่าความกว้างเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากการทดลองด้านการยับยั้งและการป้องกันมาวาดเป็นกราฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สารแขวนลอยสปอร์, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และโปรตีนบริสุทธิ์) จะเห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธิ์ได้เด่นชัดขึ้น ดังรูปที่ 4.46 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศที่ความเข้มข้นโปรตีน 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลในชุดยับยั้ง

คือ 89.58%, 83.22%, 47.46% และ 10.08% ตามลำดับ และในชุดป้องกันพบเปอร์เซ็นต์ความกว้างของแผลเท่ากับ 41.66%, 24.65%, 10.43%, และ 9.71% ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.47-4.50 ซึ่งแสดงรูปผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินีที่ทดสอบผลการยับยั้งและ การป้องกันของโปรตีนบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งและป้องกันก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะสังเกตได้จาก ความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ และในการทดสอบยับยั้งและป้องกันรา *Fusarium* sp. ของผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เท่ากัน สามารถให้ผลในการป้องกันได้ดีกว่าการยับยั้ง



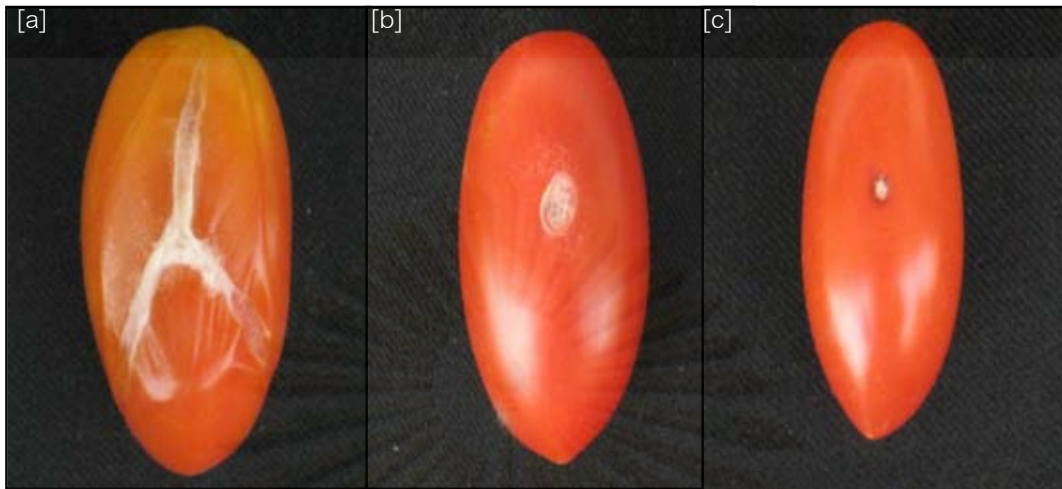
รูปที่ 4.46 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและการป้องกันการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. โดยโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับผลของมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารแขวนลอยสปอร์ ชุดควบคุมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมโปรตีนบริสุทธิ์



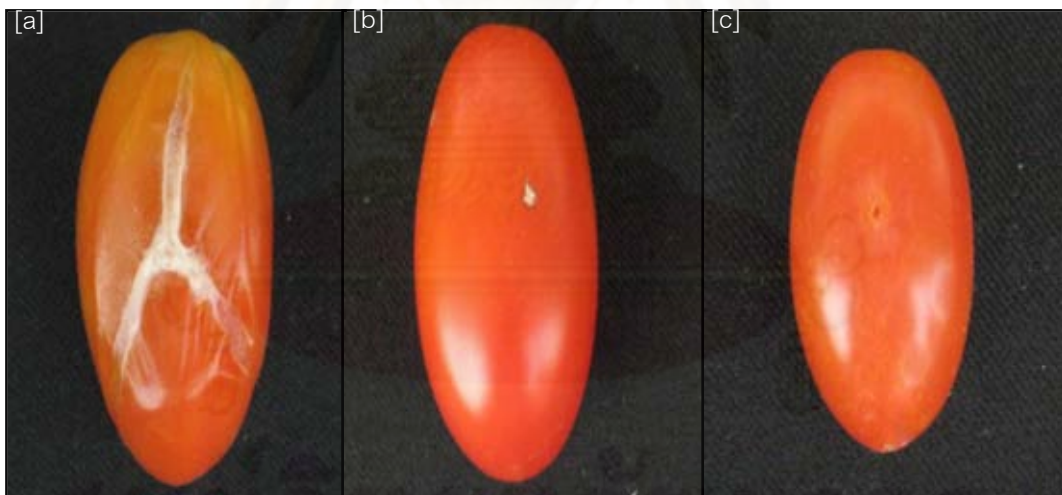
รูปที่ 4.47 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.48 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.49 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])



รูปที่ 4.50 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคจากรา *Fusarium* sp. ของโปรตีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม กับผลมะเขือเทศพันธุ์ราชินี (ชุดควบคุม สารแขวนลอยสปอร์) [a]; ชุดทดลองยับยั้ง [b] และ ชุดทดลองป้องกัน [c])

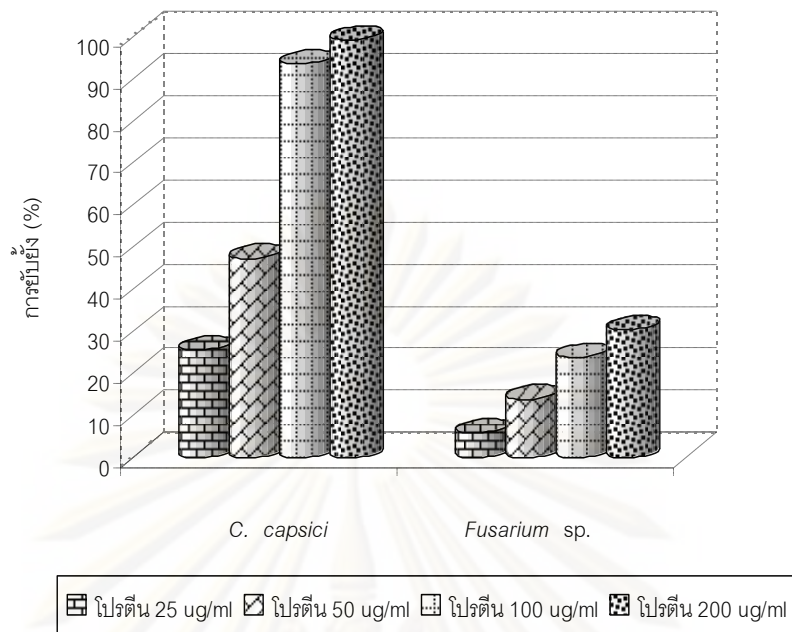
4.4 ความเข้มข้นที่ ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory concentration 50%, IC₅₀)

เมื่อผสมสารแขวนลอยสปอร์ของรากับโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนการงอกของสปอร์ พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. capsici* ได้ 25.60, 47.33, 93.60 และ 99.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Fusarium* sp. ได้ 6.10, 13.73, 24.0 และ 30.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และเมื่อวาดกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์กับค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อรา *C. capsici* และรา *Fusarium* sp. ดังรูปที่ 4.51 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย M10 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา *C. capsici* ได้ดีกว่ารา *Fusarium* sp. 3.81 เท่า

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืช ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

รา	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ที่โปรตีนความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)				
	0	25	50	100	200
<i>C. capsici</i>	0.00±0.00 ^a	25.6±2.31 ^b	47.33±1 ^c	93.6±0.2 ^d	99.31±0.02 ^e
<i>Fusarium</i> sp.	0.00±0.00 ^a	6.1±1.47 ^b	13.73±1.22 ^c	24±1.6 ^d	30.4±1.63 ^e

หมายเหตุ: ^x แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT



รูปที่ 4.51 การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืช โดยไพรอติ่นที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การหาค่า IC_{50} ของรานั้น หาค่าโดยการแทนค่า y ในสมการการถดถอย (regression) ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ราที่ 50 ($y = 50$) ก็จะได้ค่าความเข้มข้นของไพรอติ่นที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ($IC_{50} = x$)

สำหรับรา *C. capsici* นั้น มีสมการการถดถอยเป็น $y = 0.9425x$ ดังแสดงในกราฟภาคผนวก ค หมายเลข 3 ดังนั้นค่า IC_{50} จึงเท่ากับ 53.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 0.999 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient Determination) ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 0.9981 ดังแสดงในตารางที่ 4.11

สำหรับรา *Fusarium sp.* มีสมการการถดถอยเป็น $y = 0.2476x$ ดังแสดงในกราฟภาคผนวก ค หมายเลข 4 ดังนั้นค่า IC_{50} จึงเท่ากับ 201.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 0.990 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 0.9801 ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนที่ทำ
บริสุทธิ์ได้ พร้อมกับค่าสมการการถดถอย

รา	สมการ regression ⁽¹⁾	IC ₅₀ ⁽²⁾	r ⁽³⁾	r ² ⁽⁴⁾
<i>C. capsici</i>	y = 0.9425x	53.05	0.999	0.9981
<i>Fusarium</i> sp.	y = 0.2476x	201.9	0.990	0.9801

หมายเหตุ : ⁽¹⁾สมการการถดถอยสำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์

X = เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของโปรตีน

Y = เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

⁽²⁾IC₅₀ = Inhibitory concentration 50%

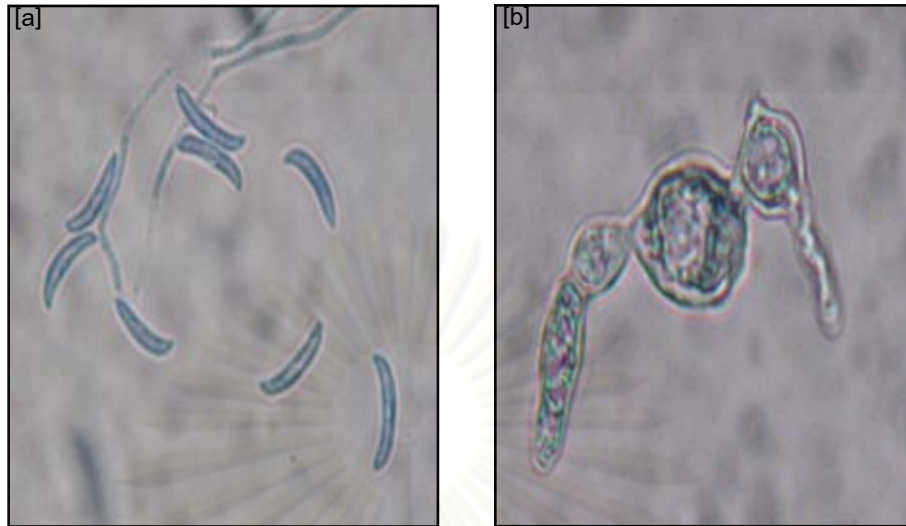
⁽³⁾r = ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

⁽⁴⁾r² = ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient Determination) ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

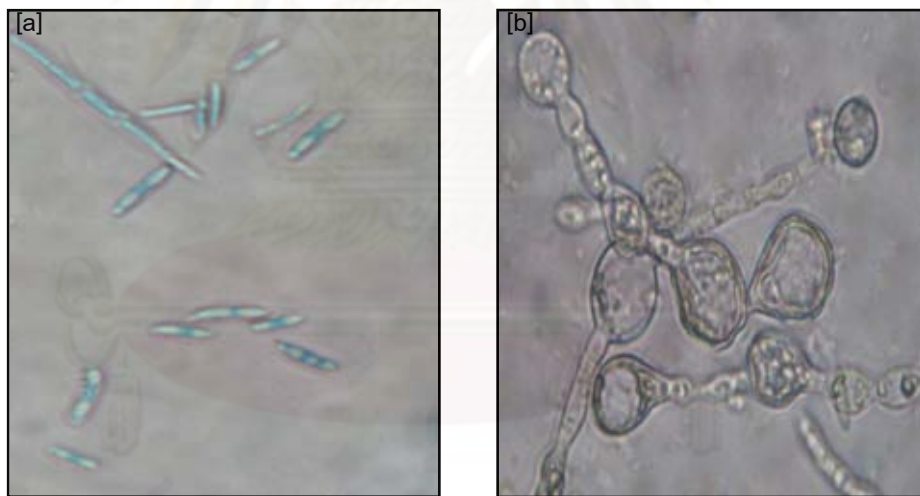
4.5 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อการงอกของสปอร์และการเจริญของราโรคพืช

เมื่อนำสปอร์ของราผสมกับโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าในชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่โปรตีนบริสุทธิ์นั้น มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราที่ปกติ โดยสปอร์ของ *C. capsici* มีรูปร่างเหมือนพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ไม่มีผนังกันเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4.52 [a] และสปอร์ของ *Fusarium* sp. พบว่ามีลักษณะยาวค่อนข้างมนคล้ายสปอร์รูปไข่มีผนังกันซึ่งเป็นลักษณะของ microconidia ดังแสดงในรูปที่ 4.53 [a]

ส่วนในชุดทดสอบที่ใส่โปรตีนบริสุทธิ์ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเหลวที่มีร่าอยู่นั้น พบว่าสปอร์ของรา *C. capsici* และ รา *Fusarium* sp. เกิดการบวม และเส้นใยที่งอกออกมาเกิดการบวมและมีการโป่งพองที่บริเวณปลายของเส้นใย ดังแสดงในรูปที่ 4.52 [b] และ 4.53 [b] ตามลำดับ

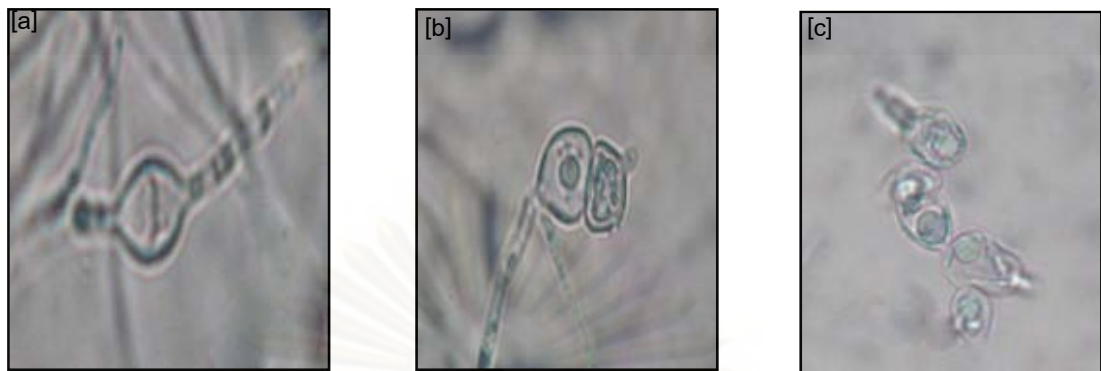


รูปที่ 4.52 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *C. capsici* ในชุดควบคุม [a] และ ในชุดทดสอบที่มีโปรตีน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [b] บ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 4.53 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *Fusarium* sp. ในชุดควบคุม [a] และ ในชุดทดสอบที่มีโปรตีน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [b] บ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

เมื่อทดลองตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของสปอร์รา *C. capsici* ตั้งแต่เริ่มใส่โปรตีนลงไปพบว่าสปอร์ราเริ่มมีการบวมขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และบวมมากขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.54



รูปที่ 4.54 แสดงลักษณะสปอร์ของรา *C. capsici* ในวันที่ 1 [a] วันที่ 2 [b] และวันที่ 3 [c] ภายหลังบ่มกับโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิที่ กำลังขยาย 400 เท่า

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา *C. capsici* ภายใต้อุณหภูมิที่ กำลังขยายแบบส่องกราด (SEM) พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีโปรตีนนั้น มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราที่ปกติ ส่วนในชุดทดสอบที่ใส่โปรตีน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่านอกจากจะพบการ บวมของสปอร์แล้วยังพบว่าการแตกและยุบตัวของสปอร์ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.55



รูปที่ 4.55 แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของรา *C. capsici* ในชุดควบคุม [a] และชุด ทดสอบ [b] ภายหลังบ่มกับโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิที่ กำลังขยาย 2,500 เท่า

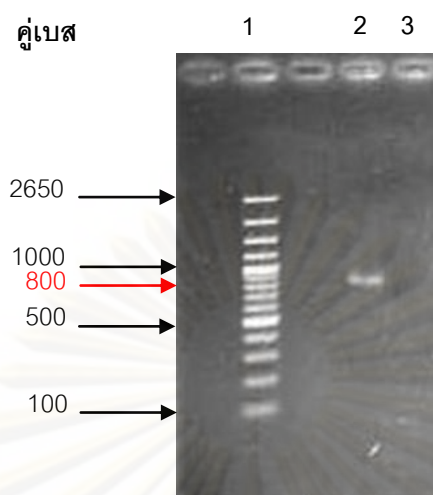
4.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

จากการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยเทคนิค MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) โดยใช้บริการของ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้ผลของรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ ภายหลังจากย่อยด้วยทริปซิน ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.1 เมื่อนำข้อมูลรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ที่ย่อยด้วยทริปซิน ไปเปรียบเทียบกับรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ที่ย่อยด้วยทริปซินของ โปรตีนชนิดต่างๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Mascot (www.matrixscience.com) พบว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มีความเหมือนกับโปรตีน KatA (เอนไซม์ แคทาเลส) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 มากที่สุด โดยมี คะแนน Mowse เท่ากับ 357 ($p < 0.05$) และอันดับรองลงมามีความเหมือนกัน vegetative catalase 1 ของ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 โดยมีคะแนน Mowse เท่ากับ 147 ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.2 ผลของการเปรียบเทียบรูปแบบของ น้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ภายหลังจากย่อยด้วยทริปซินของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับ KatA (gi|154685344) ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.3 ซึ่งความเหมือนกันนี้มีค่า Expect เท่ากับ $1.6e-29$ ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้กับ KatA แสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1.4 ซึ่งจากผลเหล่านี้มีความเป็นไปได้สูงมากที่โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จะเป็นเอนไซม์แคทาเลส

4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย M10

4.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณบางส่วนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย M10 ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ BAK11W และ BAK2 แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.56 ซึ่งจากรูปพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด ประมาณ 800 คู่เบส (ช่องที่ 2) ในขณะที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR จากชุดควบคุมผลลบ (ช่องที่ 3)



รูปที่ 4.56 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาปลูกไข่พอลิเมอไรส

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมอดีเอ็นเอของแบคทีเรีย M10 เป็นแม่แบบ

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้น้ำปลออดประจุปลออดเชื้อแทนดีเอ็นเอ

(ชุดควบคุมผลลบ)

4.7.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรีย M10

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าแบคทีเรีย M10 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. CBMB205 96% ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาคผนวก ง หมายเลข 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรีย M10 น่าจะเป็น *Bacillus* sp. CBMB205 เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียนี้ถึง 96% แบคทีเรียพวก *Bacillus* sp. มีรายงานว่า ส่วนใหญ่ใช้เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonists) ในการควบคุมราโรคพืช เนื่องจากสามารถผลิตสารต้านราได้หลายชนิดดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ทั่วไปในดิน เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ร้อนจัดได้โดยการสร้างสปอร์ (Shoda และคณะ, 2000)

เมื่อทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ของ *Bacillus* sp. M10 พบว่าแอกทิวิตีในการยับยั้งราทั้งสองชนิดอยู่ใน ส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งแสดงว่า สารออกฤทธิ์นี้ผลิตโดยแบคทีเรียแล้วหลั่งออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำปฏิกิริยากับ กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ พบว่าสารออกฤทธิ์นี้สูญเสียแอกทิวิตี จึงเสนอแนะได้ว่าสารออกฤทธิ์นี้เป็นสารประเภทโปรตีน และเกิดการเสียสภาพ เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรดหรือเบสมากเกินไป

เมื่อติดตามแอกทิวิตีในการยับยั้งราในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียพบว่า การสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรานี้มีลักษณะเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สร้างขึ้นในระยะ late stationary phase โดยให้ฤทธิ์ในการยับยั้งรามากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และหลังจากนั้นลดลงพร้อมกับการเกิดระยะ decline phase ของการเจริญ

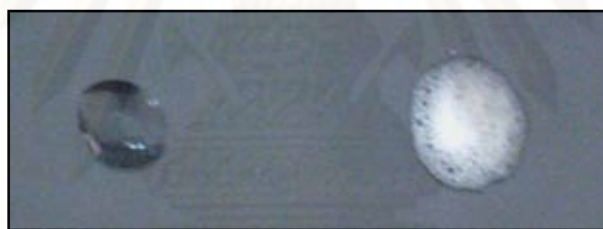
เพื่อทำโปรตีนดังกล่าวให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนแรกได้เลี้ยงแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสร้างโปรตีนได้ในปริมาณมากที่สุด จากนั้นนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ช่วงการตกตะกอน 0-40%, 40-60% และ 60-80% ผลการทดลองพบว่าทุกช่วงของการตกตะกอนพบแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. capsici* โดยพบว่าในช่วงการตกตะกอนโปรตีนที่ 40-60% เป็นช่วงที่ดีที่สุดเนื่องจากให้บริเวณยับยั้งกว้างมากที่สุด โดยมากกว่าช่วง 0-40% และ 60-80% เท่ากับ 8 และ 2 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้มีรายงานว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้มากกว่า 24 ชนิด โดยมีลักษณะโครงสร้างและสมบัติที่แตกต่างกันไป (Stein, 2005) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในภาวะการ

เลี้ยงเชื้อนี้ *Bacillus* sp. M10 ผลิตโปรตีนได้มากกว่า 1 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici* ได้ โดยแต่ละชนิดซึ่งตกตะกอนในช่วง 0-40% หรือ 60-80% มีปริมาณและประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *C. capsici* ได้แตกต่างกันไป ทั้งนี้โปรตีนที่ตกตะกอนได้ในช่วง 0-40% และ 60-80% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเฉพาะรา *C. capsici* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Fusarium* sp. (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสำหรับ *Fusarium* sp. นั้นพบว่าถูกยับยั้งได้จากโปรตีนที่ตกตะกอนได้ในช่วง 40-60% เท่านั้น เมื่อขยายขนาดการผลิตโปรตีนโดยเริ่มต้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าได้โปรตีนกึ่งบริสุทธิ์จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60% มีแอกทิวิตี 1,920 AU/มิลลิลิตร และมีแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 7.49 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอกทิวิตีจำเพาะของสารสกัดโปรตีนเริ่มต้น

ในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน ดีอีเออี ไบโอ เจล - เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบอย่างอ่อนนั้น หลังการชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ และ Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่มีเกรเดียนต์ของ NaCl ที่ pH 7.5 พบว่าโปรตีนที่ถูกชะออกมามีสองช่วง (รูปที่ 4.12) โดยช่วงแรกถูกชะออกมาพร้อมกับ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ที่ไม่มี NaCl เมื่อนำโปรตีนในช่วงนี้มา ตรวจสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งราทั้งสองชนิดพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราจากโปรตีนช่วงที่ 1 นี้ ส่วนโปรตีนในช่วงที่สองที่ถูกชะออกมาในระหว่างการชะด้วยเกรเดียนต์ ของ NaCl ตั้งแต่ 0-1 M (ลำดับส่วนที่ 45-90) มีแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. capsici* ได้เพียงชนิดเดียว เมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุแล้วพบว่า โปรตีนที่ได้ มีแอกทิวิตีรวม 240 AU มีแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 189 AU/มิลลิกรัมโปรตีน

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *Bacillus* sp. M10 ด้วยการทำให้ SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าได้แถบของโปรตีนเพียงหนึ่งแถบ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์และมีเพียงหนึ่งชนิด ซึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55.35 kDa ผลการวิเคราะห์ ลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดย เทคนิค MALDI-TOF MS พบว่ารูปแบบของเพปไทด์ของโปรตีนบริสุทธิ์นี้มีความใกล้เคียงกับโปรตีน KatA (gil154685344) ของ *B. amyloliquefaciens* โดยมีค่า Probability Based Mowse Score เท่ากับ 357 ($p < 0.05$) และค่า Expect เท่ากับ $1.26e-29$ ซึ่งเป็นค่าที่ให้ความเชื่อมั่นได้สูงมาก ว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้น่าจะเป็นโปรตีนประเภทเดียวกันกับ KatA KatA ของ *B. amyloliquefaciens* เป็น เอนไซม์แคทาเลส (Catalase A) มีน้ำหนักโมเลกุล 54.5 kDa ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* (Ni และคณะ, 2001) และส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50-60 kDa ตัวอย่างเช่น คาตาเลสจาก *Bacillus* spp. มีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa (Hou และคณะ, 2006)

คาตะเลสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N2a มีน้ำหนักโมเลกุล 56 kDa (Wang และคณะ, 2008) และคาตะเลสจาก *B. subtilis* มีน้ำหนักโมเลกุล 59.5 kDa (Hartford และ Dowds, 1994) เป็นต้น นอกจากนี้ Naclerio และคณะ (1995) ได้รายงานว่ *B. subtilis* มีเอนไซม์ KatA ที่ประมวลรหัสให้เอนไซม์แคทาเลส โดยมีการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase และจะมีปริมาณมากที่สุดในระยะ late stationary phase จากผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ในงานวิจัยนี้ทั้งในส่วนของ รูปแบบของเปปไทด์ที่เหมือนกับเอนไซม์แคทาเลส KatA ของ *B. amyloliquefaciens*, ระยะที่แบคทีเรียสร้างโปรตีน ซึ่งสร้างในระยะ late stationary phase, ขนาดของโปรตีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 55.35 kDa รวมทั้งค่าทางสถิติต่างๆ จึงสนับสนุนได้ว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นี้จะเป็นเอนไซม์แคทาเลส เนื่องจากแคทาเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดสอบเพิ่มเติมโดยการนำโปรตีนบริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่าเกิดฟองฟูของออกซิเจนเกิดขึ้น ดังรูปที่ 5.1 ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลเพิ่มเติมที่ช่วยยืนยันว่าโปรตีนดังกล่าวนี้เป็นเอนไซม์แคทาเลส



รูปที่ 5.1 แสดงปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ โปรตีนเนสแคกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ซ้าย) และปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *Bacillus* sp. M10 กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ขวา)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคของรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกได้กับ ผลของมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีดา พันธุ์ท้อ และพันธุ์ราชินี พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคได้แตกต่างกัน โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคนั้น จะ ใส่สารแขวนลอยของ สปอร์ลงบนแผลที่ทำไว้ และบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเพื่อให้อาหารเจริญ แล้วจึงใส่โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ ลงบนแผลที่ทำไว้ ถ้าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้จะพบความกว้างของแผลบนผลมะเขือเทศมีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่โปรตีน สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรค ทดสอบโดยใส่โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ลงบนแผลก่อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่ สาร

แขวนลอยของสปอร์ลงไป ถ้าโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาได้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคจะไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้น จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคโดยรา *C. capsici* บนผลมะเขือเทศทุกสายพันธุ์ พบว่าในชุดควบคุมที่ใส่เพียงสารแขวนลอยของสปอร์ลงบนผลมะเขือเทศนั้นพบอาการของโรคแอนแทรคโนสเกิดขึ้นคือ มีลักษณะเน่าช้ำและละ มีลักษณะของสปอร์สีน้ำตาลถึงสีดำเกิดขึ้นบริเวณแผล ทั้งนี้เป็นผลมาจากเมื่อ *C. capsici* มีการเจริญของเส้นใยจะหลั่งสารพวกแอมโมเนียออกมา และสารดังกล่าวมีสมบัติเป็นเบส ทำให้ผลมะเขือเทศเกิดการเน่าและเริ่มแสดง อาการของโรคออกมาได้ชัดเจนขึ้น (Alkan และคณะ, 2008) สำหรับในชุดทดสอบ พบว่าอาการของโรคถูกยับยั้งโดยมีความกว้างของแผลลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนที่ทดสอบ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีโปรตีนถึง 11-19 เท่า สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนในด้านการป้องกันการเกิดโรคพบว่าโปรตีนที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามพบอาการของโรคเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสามารถลดขนาดความกว้างของแผลลงได้ 4-6 เท่า ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 8-10 เท่า ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบอาการของโรคเกิดขึ้นซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคของรา *Fusarium* sp. ด้วยโปรตีนที่แยกได้จากผลของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ แต่ไม่สามารถป้องกันโรคได้อย่างสมบูรณ์ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคโดยรา *Fusarium* sp. ได้ประมาณ 4% สำหรับมะเขือเทศพันธุ์ท้อ และ 10% สำหรับมะเขือเทศพันธุ์สีดาและราชินี

การหาความเข้มข้น ของโปรตีน ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 53.05 และ 201.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ตามลำดับ และให้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.999 และ 0.990 ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาได้มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. capsici* ได้ดีกว่ารา *Fusarium* sp. และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าโปรตีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ได้แก่ 0, 25, 50, 100 และ 200 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีความแตกต่างกันในการยับยั้งรา *C. capsici* และรา *Fusarium* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนที่แยกได้ต่อสปอร์ของรา *C. capsici* ที่ระยะเวลา 3 วัน โดยกล้องจุลทรรศน์และ กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าในชุดควบคุมมีการเจริญของสปอร์และเส้นใยราที่ปกติ ส่วนในชุดทดลองที่มีโปรตีนพบว่าโปรตีนมีผลทำให้สปอร์และเส้นใยของราไปงพองบวมและเกิดการแตกหัก (รูปที่ 4.54 และ 4.55) ซึ่งมีผลทำให้ราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และยับยั้งการก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศในที่สุด

แคทาเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งรวมถึง แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ด้วย โดยทั่วไปแล้วหน้าที่ของแคทาเลสคือ เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน สำหรับในสิ่งมีชีวิตนั้นเอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH⁻) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (Shi และคณะ, 2008) มีรายงานว่าแคทาเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร, สีย้อม, และกระดาษ รวมทั้งใช้ในการบำบัดน้ำเสีย และการรักษาเซลล์มะเร็ง (Ni และคณะ, 2001; Shi และคณะ, 2008) สำหรับการนำ แคทาเลสไปประยุกต์ใช้เพื่อการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคกับพืชที่มีสาเหตุมาจากรานั้น มีรายงานของ Hou และคณะ (2006) ที่แยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จากสเคลอโรเตียมของ *Sclerotinia sclerotiorum* และพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ LEV-006 สามารถผลิตโปรตีนได้ 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae* และ *Leptosphaeria maculans* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืช จากการวิเคราะห์รูปแบบของเพปไทด์ของโปรตีนหนึ่งในจำนวนนี้พบว่ามี ความเหมือนกับ KatA ของ *B. subtilis* อย่างไรก็ตามเมื่อโคลนยีน KatA และแสดงออกโปรตีนในรูปที่เชื่อมกับฮิสติดีนแท็กใน *E. coli* จากนั้นนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา พบว่าแม้ว่าโปรตีนนี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วให้ฟองฟู่ก็ตาม แต่กลับไม่มีแอกทิวิตีในการยับยั้ง รา Hou และคณะเสนอแนะว่าที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะฮิสติดีนที่เชื่อมเข้ากับโปรตีนอาจมีผลต่อแอกทิวิตีในการยับยั้งราโดยไม่มีผลต่อแอกทิวิตีของแคทาเลส หรืออาจเป็นเพราะแอกทิวิตีในการยับยั้งราของโปรตีนนี้จำเป็นต้องได้รับการดัดแปลงโปรตีนที่เกิดขึ้นภายใน *Bacillus* ซึ่งสำหรับการทดสอบสมมติฐานเหล่านี้สามารถทำได้โดยการโคลนยีนซึ่งผลิตแคทาเลสจาก *Bacillus* sp.M10 โดยเชื่อมกับแท็กชนิดอื่น เช่น GST และทดลองแสดงออกโคลนที่ได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งเป็นงานวิจัยที่คาดว่าจะนำไปปฏิบัติต่อไป นอกจากนี้ก็มีรายงานการนำแคทาเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* ไปแสดงออกในพืชคาโนลา พบว่าการเจริญของราก่อโรคและการเกิดโรคถูกยับยั้งอย่างเด่นชัดในพืชทรานสเจนิกที่มีการแสดงออกแคทาเลส (El-Awady และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามไม่ได้มีการศึกษาว่าแคทาเลสมีผลโดยตรงอย่างไรต่อเชื้อก่อโรค ในงานวิจัยนี้ซึ่งใช้ แคทาเลสจาก *Bacillus* sp.M10 ทดสอบโดยตรงกับ

สปอร์ของรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. พบว่าสปอร์ของราเกิดการบวมพองและแตก ไม่สามารถงอกได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ไม่สามารถก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการทำงานต่อไป เช่น การโคลนยีนซึ่งประมวลรหัสให้แคทาเลสแล้วเชื่อมกับโปรตีนติดตาม เช่น GFP เพื่อที่จะสามารถระบุตำแหน่งที่แคทาเลสเข้าไปมีผลต่อสปอร์ของราได้เป็นต้น

ดังนั้นจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้จึง เป็นไปได้ที่จะ นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *Bacillus* sp. M10 ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งและป้องกันโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากรา *C. capsici* และ *Fusarium* sp. ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสและผลเน่าในผลมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ยัง อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงทดลองและแปลงเพาะปลูกของเกษตรกรได้อีกด้วย และเพื่อให้เกิดการพัฒนาศักยภาพของ *Bacillus* sp. M10 และโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จึงควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านรารวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างพืช รา โรคพืช แบคทีเรีย และพืชวิทยาต่อสิ่งมีชีวิต เพื่อให้เกิดความเข้าใจและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงมากยิ่งขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมส่งเสริมการเกษตร . มะเขือเทศ (Tomato). (online). <http://contact.doae.go.th/cts/resultDtl.jsp?id=521>. 26 มิถุนายน 2551.
- กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร . มะเขือเทศ (Tomato). (online). <http://plantpro.doae.go.th/diseasegroup/tomato/tomato.htm>. 26 มิถุนายน 2551.
- เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ, มโนธรรม สัจจถาวร, อดุลย์ พงศ์สุวรรณ, บรรณ บุญณะ, และ ลิขิต เอียดแก้ว. 2531. มะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สมมิตร ออฟเซ็ท.
- คงยุทธ เลิศมงคลธรรม. 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดุชนี ธนะบริพัฒน์ . 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม . พิมพ์ครั้งที่ 3. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ตลาดกลางสินค้า เกษตร แห่งประเทศไทย . มะเขือเทศ . (online). <http://www.talaadthai.com/web/resource/detail.asp?groupid=12&subjectid=81>. 26 มิถุนายน 2551.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ . 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิพนธ์ ไชยมงคล. มะเขือเทศ. (online). http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/tomato.pdf. 8 กรกฎาคม 2552.
- วรรณรีย์ คนขยัน . 2551. คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร : มะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร.
- วิโรจน์ สุนทรภัก และ เจริญ จินเจียม . มะเขือเทศ . (online). <http://agriqua.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/tomato/index.html>. 24 มิถุนายน 2551.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Agrios, G.N. 1997. Plant Disease Caused by Fungi. In Plant Pathology. 3rd edition. California, Academic Press.
- Akoh, C.C. and Min, D.B. 2008. Extraction and analysis of lipids. Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology. 3rd edition., CRC Press.
- Alkan, N., Fluhr, R., Sherman, A. and Prusky, D. 2008. Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. Mol. Plant Microbe Interact. 21: 1058-1066.
- Amersham pharmacia biotech. 1999. Protein purification handbook. (online). <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>. 28 June 2008.
- Archibald, F.S., and Fridovich, I. 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 145: 442-451.
- Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. 2009. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J. Appl. Microbiol. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x
- Bagyan, I., Martinez, L.C. and Setlow, P. 1998. The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by sF, and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. J. Bacteriol. 180: 2057–2062.
- Bais, H.P., Fall, R. and Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis thaliana* roots by *Pseudomonas syringae* DC3000 is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol. 134: 307-319.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.
- Berdy, J.1985. Screening, classification and identification of microbial products. In discovery and isolation of microbial products, pp.9-3. Edited by M.S. Verrall. Ellis Horwood publishers, Chichester.

- Bhattacharyya, P. and Bose, S.K. 1967. Effect of mycobacillin, an antifungal polypeptide antibiotic, on the producer *Bacillus subtilis* B3. Indian J. Med. Res. 55: 1025-1029.
- Bio-Rad. 2009. Bio-gel[®]P Polyacrylamide gel Instruction Manual. (online). <http://www.mendeley.com/download/public.com>. 10 August 2009.
- Boonnak, N., Chatchanok, K., Suchada, C., Chanita, P., Fun, H.K., Opas, A.K., Kan, C. and Shigeru, K. 2009. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* xanthones from the resin and green fruits of *Cratoxylum cochinchinense*. Tetrahedron. 65: 3003–3013.
- Bosshard, P.P., Abels, S., Zbinden, R., Böttger, E.C. and Altwegg, M. 2003. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory – 18 months evaluation. J. Clin. Microbiol. 41: 4134–4140.
- Bowden, R.L., Kardin, M.K., Percich, J.A. and Nickelson, L.J. 1984. Anthracnose of wild rice. Plant Dis. 68: 68-69.
- Chan, W.C., Bycroft, B.W., Leyland, M.L. Lian, L.Y., and Roberts, G.C. 1993. A novel post-translational modification of the peptide antibiotic subtilin: isolation and characterization of a natural variant from *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 6633. Biochem. J. 291: 23-27.
- Chang, H.T., Cheng, Y.H., Wu, C.L., Chang, S.T., Chang, T.T. and Su, Y.C. 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. Bioresour Technol. 99: 6266-6270.
- Chen, H.Q., X. Chen, X.M., Yin, L., Jing, W., Jin, Z.Y., Xu, X.M., Zhao, J.W., Chen, T.X. and Xie, Z.J. 2009. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. Food Chem. 115: 1206-1212.
- Del Rio, A.A., Gorgé, J.L., Olivares, J. and Mayor, F. 1972. Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora*. II. Isolation, purification, and properties. Antimicrob. Agents Chemother. 2: 189-194.
- Delcambe, L., Peypoux, F., Besson, F., Guinand, M. and Michel, G. 1977. Structure of iturin and iturin-like substances. Biochem. Soc. T. 5: 1122-1124.
- Doonon, S. and Cutler, P. 2004. Protein purification protocols. Methods in molecular biology. 2nd edition. Humana, Academic Press.

- Droby, S., Michael, W., Dumitru, M. and Charles, W. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. Postharvest Biol. Tec. 52: 137-145.
- Dubos, R.J. 1993. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus* II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infection in mice. J. Exp. Med. 70: 11-17.
- El-Awady, M.E., Reda, E.A., Moghaieb, W.H., Sawsan, S.Y., Ahmed M. and Sharkawy, E. 2007. Transgenic canola plants over-expressing bacterial catalase exhibit enhanced resistance to *Peronospora parasitica* and *Erysiphe polygoni*. Arab J. Biotech. 11: 71-84.
- Fujiwara, T., Takahashi, Y., Matsumoto, K. and Kondo, E. 1980. Production of a new aminoglycoside antibiotic by a mutant of *Bacillus circulans*. J. Antibiot. 33: 836-841.
- GE Healthcare. 2009. Ion Exchange. (online). [http:// www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com). 10 August 2009.
- Gleason, M.L. and Edmunds, B.A. 2006. Tomato diseases and disorders. pp. 1-12. Iowa State University, University extension.
- Hartford, O.M. and Dowds, B.C. 1994. Isolation and characterization of a hydrogen peroxide resistant mutant of *Bacillus subtilis*. Microbiology. 140: 297-304.
- Harveson, R.M. 2008. Fusarium yellows and Fusarium root rot. pp. 1-3. University of Nebraska-Lincoln extension, Institute of Agriculture and Natural resources.
- Hou, X., Boyetchko, S.M., Brkic, M., Olson, D., Ross, A. and Hegedus, D. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 644-653.
- Howard, R.J. and Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Microbiol. 50: 491-512.
- Jetiyanon, K. 2007. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. Biol. Control. 42: 178-185.

- Jetiyanon, K., Wittaya-Areekul, S. and Plianbangchang, P. 2008. Film coating of seeds with *Bacillus cereus* RS87 spores for early plant growth enhancement. Can. J. Microbiol. 54: 861-867.
- Joshi, S., Bharucha, C. and Desai, A.J. 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. Bioresource Technol. 99: 4603-4608.
- Jung, H.K. and Kim, S.D. 2005. An antifungal antibiotic purified from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora-blight disease. J. Microbiol. Biotechnol. 15: 1001-1010.
- Kamara, A.M., Al-Hazmi, A.S. and Qaid, M.S.N. 1989. Coffee anthracnose; development of morphological and histological symptoms. J. King Saud. Univ. 1: 115-122.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology. 94: 1259-1266.
- Kim, P.I. and Chung, K.C. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiol. Lett. 234: 177-183.
- Kobayashi, I., Sakurai, M., Tomikawa, A., Yamamoto, T., Yamaoka, N. and Kunoh, H. 1990. Cytological studies of tomato fruit rot caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race J3 (II) ultrastructural differences in infected styles of susceptible and resistant cultivars. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 56: 235-242
- Korsten, L., Bezuidenhout, J.J. and Kotze, J.M. 1988. Biological control of postharvest diseases of Avocada. In South African Avocado Growers' Association Yearbook, pp. 75-78.
- Kosuge, T. and Nester, E.W. 1989. Plant microbe interaction. New York: Mcgraw-Hill Publishing.
- Kugler, M., Loeffler, W., Rapp, C., Kern, A. and Jung, G. 1990. Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. Arch. Microbiol. 153: 276-281.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

- Lee, Y.G., Chung, K.C., Wi, S.G., Lee, J.C. and Bae, H.J. 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. Protein Express. Purif. 65: 244-250.
- Leelasuphakul, W., Pranom, S. and Souwalak, P. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme Microb. Tech. 38: 990-997.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology. 11: 1103-1110.
- Li, J., Yang, Q., Zhao, L.H., Zhang, S.M., Wang, Y.X. and Zhao, X.Y. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. J. Zhejiang Univ.-Sc. B. 10: 264-272.
- Liu, Y., Chen, Z., Ng, T.B., Zhang, J., Zhou, M., Song, F., Lu, F. and Liu, Y. 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. Peptides. 28: 553-559.
- Loewen, P.C. and Switala, J. 1987. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 169: 3601-3607.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J, Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mahovic, M., Sargent, S.A. and Bartz, J.A. 2004. Identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida. (online). <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS13100.pdf>. 8 July 2009.
- Mari, M., Guizzardi, M., Brunelli, M. and Folchi, A. 1996. Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Prot. 15: 600-705.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci. 64: 265-271.

- Moyne, A.L., Cleveland, T.E. and Tuzun, S. 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. FEMS Microbiol. Lett. 234: 43-49.
- Munoz, Z., Moret, A. and Garcés, S. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. Crop Prot. 28: 36-40.
- Naclerio, G., Baccigalupi, L., Caruso, C., De Felice, M. and Ricca, E. 1995. *Bacillus subtilis* vegetative catalase is an extracellular enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4471-4473.
- Nakano, T., Ikawa, N. and Ozimek, L. 2004. Use of epichlorohydrin-treated chitosan resin as an adsorbent to isolate kappa-casein glycomacropeptide from sweet whey. J. Agric. Food Chem. 52: 7555-7560.
- Nitarajan, D., Nagamurugan, N., Ramachandran, A., Mohanasundari, C. and Srinivasan, K. 2007. Anticandidial and anticryptococcal activity of *Euphorbia fusiformis*, a rare medicinal plant. World J. Microb. Biot. 23: 719-721.
- Ni, J., Tokuyama, S., Sogabe, A., Kawamura, Y. and Tahara, Y. 2001. Cloning and high expression of catalase gene from *Bacillus* sp. TE124. J. Biosci. Bioeng. 91: 422-424.
- Pal, K.K. and McSpadden, B. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. Ohio State University.
- Palamakumbura, A. 1987. Effect of seedling age and spacing on tomato growth and yield. ARC Training, pp. 1-3.
- Peralta, I.E. and Spooner, D.M. 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene c of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). Am. J. Bot. 88: 1888-1902.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L. and Delcambe, L. 1980. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. J. Antibiot. 33: 1146-1149.
- Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C. and Michel, G. 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. 39: 636-641.

- Raj, S.N., Deepak, S.A., Basavaraju, P., Shetty, H.S., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W. 2003. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. Crop Prot. 22: 579-588.
- Rajesh and Sharma, G.L. 2002. Studies on antimycotic properties of *Datura metel*. J. Ethnopharmacol. 80: 193-197.
- Roberts, P.D., Pernezny, K.L. and Kucharek, T.A. 2009. Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. pp 178-180. University of Florida extension.
- Rodriguez-Muñoz, E., Herrera-Ruiz, G., Pedraza-Aboytes, G. and Loarca-Pina, G. 2009. Antioxidant capacity and antimutagenic activity of natural oleoresin from greenhouse grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Plant Food. Hum. Nutr. 64: 46-51.
- Roe, S. 2001. Protein purification techniques : a practical approach. 2nd edition. Oxford University Press.
- Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Bioc.12: 370-375.
- Shi, X., Feng, M., Zhao, Y., Guo, X. and Zhou, P. 2008. Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretory catalase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Lett. 30: 181-186.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. J. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.
- Shoji, J. and Hinoo, H. 1975. Chemical characterization of new antibiotics, cerexins A and B. (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. II). J. Antibiot. 28: 60-63.
- Spadaro, D. and Gullino, M.L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. Int. J. Food Microbiol. 91: 185-194.
- Srivastava, M.P. and Tandon, A.N. 1966. Post-harvest diseases of tomato in India. Mycopathologia. 29: 254-264.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56: 845-857.

- Swain, M.R., Ray, R.C. and Nautiyal, C.S. 2008. Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung against postharvest Yam (*Dioscorea rotundata* L.) pathogens. Curr. Microbiol. 57: 407–411.
- Theis, T. and Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. Cell. Mol. Life Sci. 61: 437-455.
- Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 1990. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. Plant Soil. 129: 93-99.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., and Thonart, P. 2003. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96: 1151–1160.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. and Jung, G. 1986. Fengycin--a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. 39: 888-901.
- Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B. and Meinhardt, F. 2006. Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. Appl Environ. Microbiol. 72: 7879-7885.
- Wang, W., Sun, M., Liu, W. and Zhang, B. 2008. Purification and characterization of a psychrophilic catalase from Antarctic *Bacillus*. Can. J. Microbiol. 54: 823-828.
- Wilson, C.L., Franklin, J.D. and Pusey, P.L. 1986. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. Phytopathology. 77: 303-305.
- Wilson, D.L. and Pusey, P.L. 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. Plant Dis. 69: 375-378.
- Zhang, X.Q., Xue, Y.F., Zhao, A.M., Du, G.C., Xu, Z.H., Chen, J. and Ma, Y.H. 2005. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. F26. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 21: 71-77.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose (PDB broth)

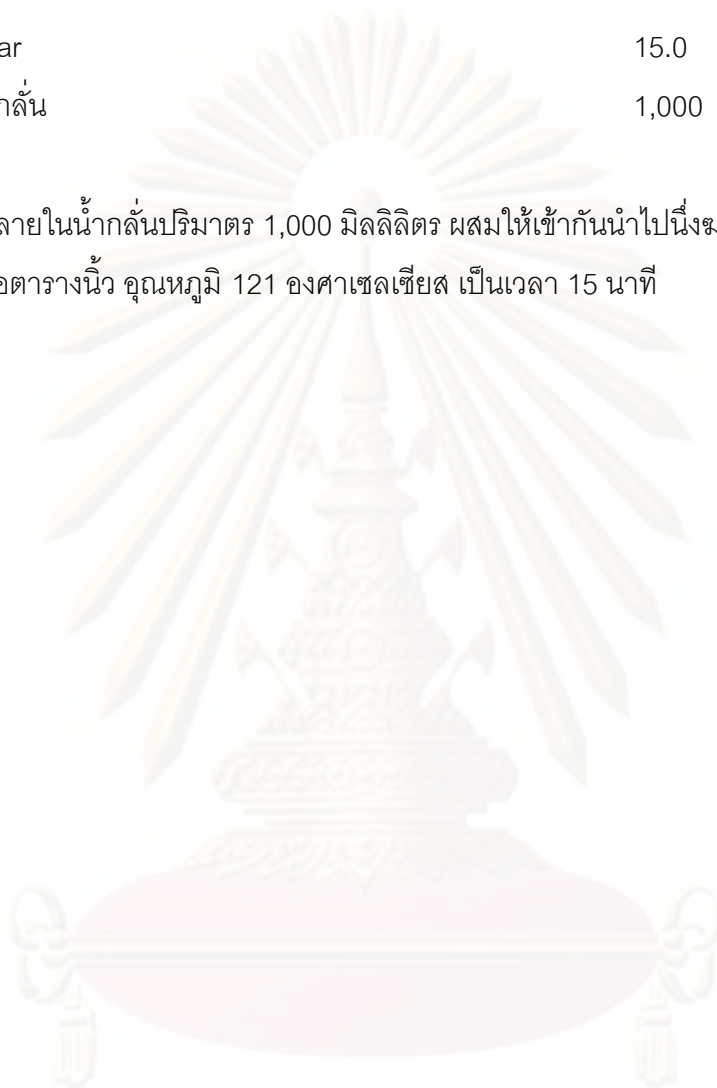
มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose (PD Agar)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กาลีเซอรอล 15%

นำกาลีเซอรอล 87% ปริมาตร 17.24 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 82.76 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7.5

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 7.5 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

5. กลีเซอรอล 30% ในบัฟเฟอร์

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 345 มิลลิลิตร ผสมใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 655 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. สารละลาย Lowry C สำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

a. เตรียมสารละลาย Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

b. เตรียมสารละลาย Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

นำ Lowry A 50 ส่วน ผสมกับ Lowry B 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลาย Lowry C แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

7. สารละลาย Lowry D สำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

8. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ซังโซเดียมคลอไรด์ 58.44 g ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

9. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25 มิลลิโมลาร์

10. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	181.71	กรัม
---------------------------------	--------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

ซังโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (ปฏิบัติในตู้ดูดควัน) น้ำหนัก 10 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

12. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

ซังแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครพิพิจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุลงไป 1 มิลลิลิตร ละลายจนหมด

13. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	60.57	กรัม
---------------------------------	-------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบส ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำกลั่นจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. สารละลาย 10X อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

15. 2X Laemmli buffer

กลีเซอรอล (87%)	2.29	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรดเบส 6.8	1.0	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
บรอมฟินอลบลู	0.001	กรัม
10% SDS	4	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน และนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตร ต่อ 50 ไมโครลิตร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

16. สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250	2	กรัม
เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

17. สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

18. สารละลายผสม dNTPs ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

19. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)

Trisma base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

20. 10X Loading dye

Bromphenolblue	0.025	%
Sucrose	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

21. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

22. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

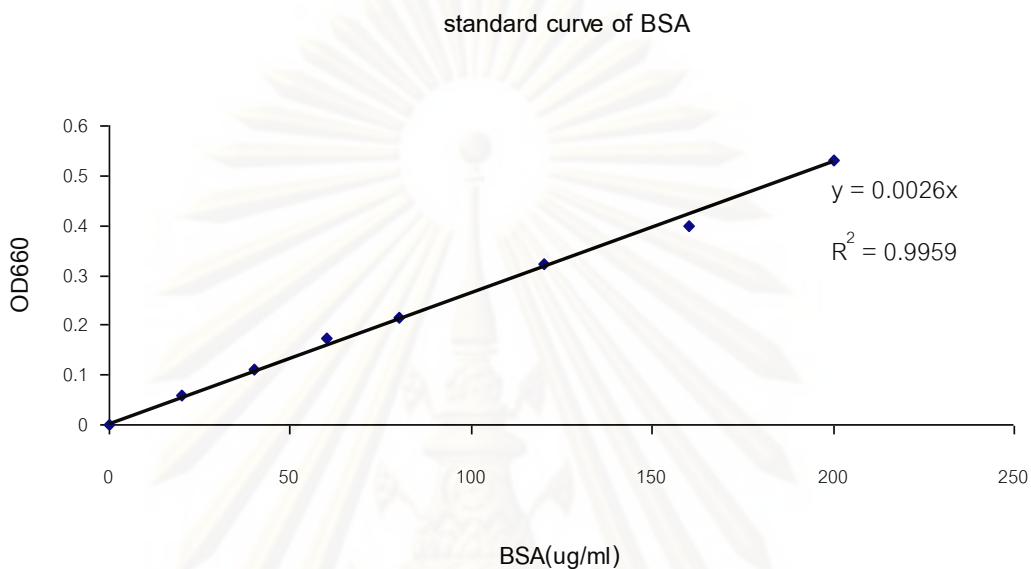
ประกอบด้วย

- Buffer QG
- Buffer PE
- Buffer EB
- Qiaquick column

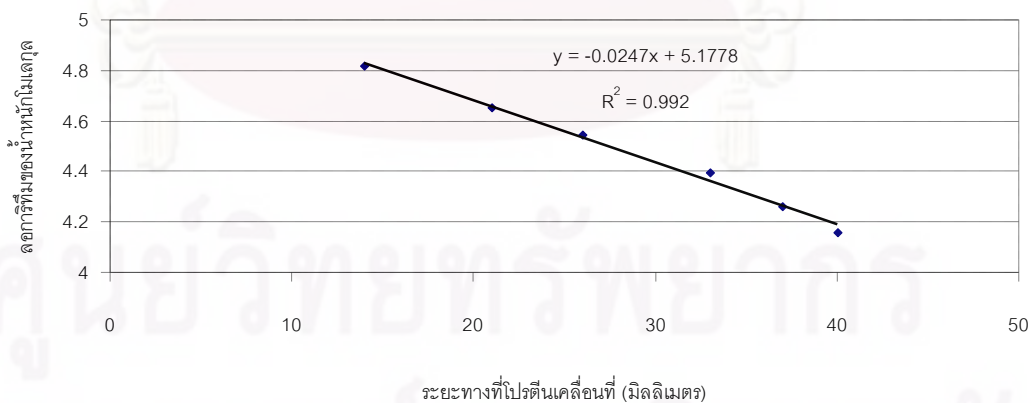
ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE โดยสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ภาคผนวก ค

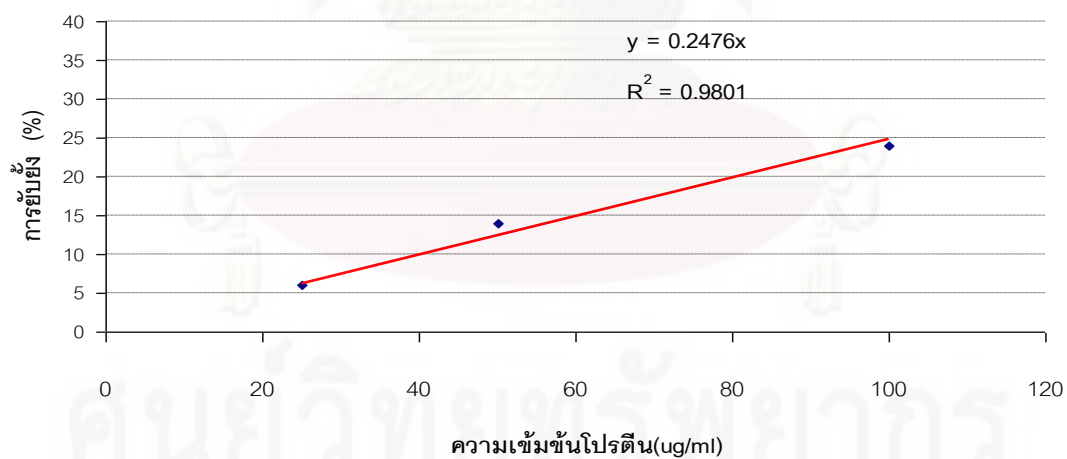
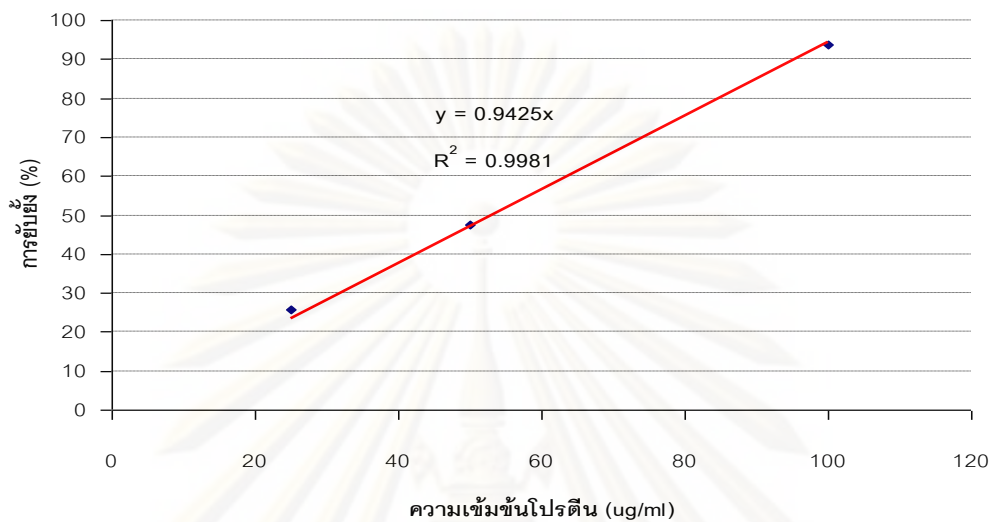
1. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)



2. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนไซโตเดียมโตเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล



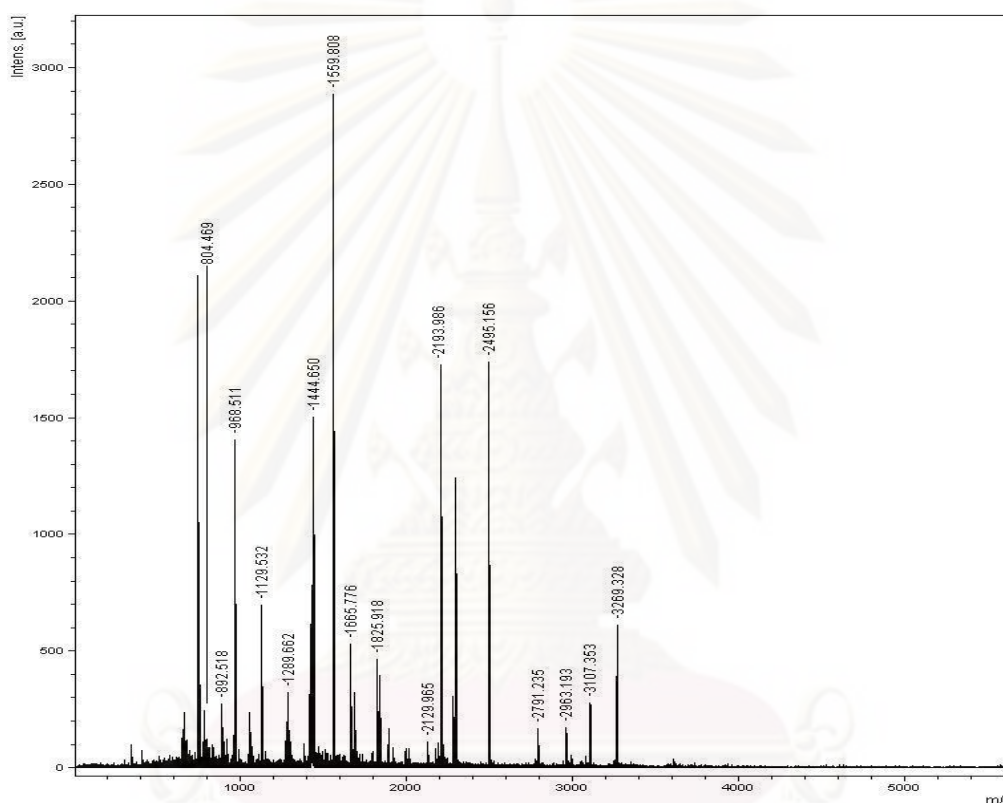
3. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของโปรตีนและการยับยั้งการงอกของ *Salmonella typhimurium* ที่ 50 µl โดยเฉลี่ย



ภาคผนวก ง

1. ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยเทคนิค MALDI-TOF MS และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย M10

1.1 รูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ (mass fingerprint) ของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรีย M10 ภายหลังจากย่อยด้วยทริปซิน



1.2. ผลการเปรียบเทียบรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ที่ทำบริสุทธิ์ได้กับโปรตีนในฐานข้อมูล

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi1154685344	54505	357	KatA [Bacillus amyloliquefaciens F2B42]
2. gi116077947	54699	147	vegetative catalase 1 [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]
3. gi1142861	54797	147	vegetative catalase
4. gi1221308720	54757	147	vegetative catalase 1 [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]
5. gi112381893	54722	111	catalase [Bacillus subtilis]
6. gi189097371	54421	94	vegetative catalase 1 [Bacillus sp. NRRL B-14911]
7. gi1224776038	54380	74	catalase [Bacillus sp. NZa]
8. gi1163735704	19509	72	transcriptional regulator, AraC family protein [Roseobacter litoralis Och 149]
9. gi1167859247	27971	71	matrix protein 1 [Influenza A virus (A/red-necked stint/Western Australia/4915/1984(H3N2))]
10. gi130925591	153360	70	KIF27B [Homo sapiens]
11. gi114625182	141497	69	PREDICTED: kinesin family member 27 isoform 3 [Pan troglodytes]
12. gi114625184	139632	68	PREDICTED: kinesin family member 27 isoform 2 [Pan troglodytes]
13. gi174007253	80073	68	PREDICTED: similar to LINE-1 reverse transcriptase homolog [Canis familiaris]
14. gi148393238	61229	67	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
15. gi119717105	26018	66	precorrin-6A reductase [Nocardioides sp. JS614]
16. gi130794488	141324	64	kinesin family member 27 [Homo sapiens]
17. gi190417185	23391	64	hypothetical protein OS2207_05659 [marine gamma proteobacterium HTCC2207]
18. gi1130493684	39145	64	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa [Oryctolagus cuniculus]
19. gi1224402018	94237	64	hypothetical protein MCF420_4821 [Microcoleus chthonoplastes FCC 7420]
20. gi1150002940	22322	61	putative regulatory protein [Bacteroides vulgaris ATCC 8482]

1.3 ผลการเปรียบเทียบรูปแบบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ของโปรตีนที่ทำ บริสุทธิ์ได้กับ KatA (gi|154685344)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
892.5182	891.5109	891.4603	0.0506	456	- 462	0	R.QIGHFYK.A
902.5867	901.5794	901.5498	0.0297	85	- 91	1	K.RTPLFIR.F
921.5444	920.5371	920.4967	0.0404	76	- 84	0	K.AAFLSEVGK.R
968.5109	967.5036	967.4651	0.0385	273	- 280	0	R.FDPFDVTK.V
1061.6018	1060.5945	1060.5553	0.0392	286	- 294	0	K.DYPLIEVGR.M
1077.6223	1076.6150	1076.5978	0.0172	76	- 85	1	K.AAFLSEVGKR.T
1129.5319	1128.5246	1128.5465	-0.0219	334	- 342	0	R.LFAYHDAHR.Y
1132.5661	1131.5588	1131.5713	-0.0125	140	- 148	0	K.FPDFIHTQK.R
1285.5605	1284.5532	1284.5822	-0.0290	190	- 200	0	R.HMHFGSHTFK.W
1289.6623	1288.6551	1288.7000	-0.0449	345	- 356	0	R.VGANHQALPINR.S
1301.5763	1300.5690	1300.5771	-0.0082	190	- 200	0	R.HMHFGSHTFK.W + Oxidation (M)
1383.6349	1382.6276	1382.5633	0.0642	367	- 378	1	R.DGQMRFDNNGGR.S + Oxidation (M)
1432.7595	1431.7522	1431.7147	0.0375	201	- 212	1	K.WTNDKGEVWIK.Y
1444.6499	1443.6426	1443.6670	-0.0244	379	- 391	0	R.SVYYEPNSFGGPK.E
1559.8078	1558.8006	1558.8144	-0.0138	136	- 148	1	R.DAIKFPDFIHTQK.R
1665.7764	1664.7691	1664.7795	-0.0104	57	- 72	0	K.GAGAHGYFEVINDVTK.Y
1689.8971	1688.8898	1688.8886	0.0012	281	- 294	1	K.VWSQKDYPLIEVGR.M
1825.9179	1824.9107	1824.9080	0.0027	258	- 272	0	K.LYVQIMPLEDANTYR.F
1841.9150	1840.9078	1840.9029	0.0049	258	- 272	0	K.LYVQIMPLEDANTYR.F + Oxidation (M)
1893.9581	1892.9508	1892.9228	0.0279	92	- 109	1	R.FSTVAGELGSSDTRVDRP.R
1998.0990	1997.0918	1997.1230	-0.0313	436	- 453	1	R.LVANIVSAMKPVKEEIK.L
2129.9651	2128.9578	2128.9589	-0.0011	379	- 397	1	R.SVYYEPNSFGGPKESPDK.Q
2193.9858	2192.9785	2192.9757	0.0028	6	- 26	0	K.LTTSWGAPVGDNSMTAGDR.G + Oxidation (M)
2495.1556	2494.1483	2494.1805	-0.0322	115	- 135	0	K.FYTEEGNYDIVGNTPVFFIR.D
2791.2351	2790.2279	2790.3575	-0.1296	258	- 280	1	K.LYVQIMPLEDANTYRFDPFDVTK.V + Oxidation (M)
2963.1930	2962.1857	2962.3409	-0.1552	232	- 257	0	K.IAGENPDYHTEDLFNAIENGDFPAWK.L
3107.3531	3106.3458	3106.4771	-0.1313	300	- 328	0	R.NPENYFAEVEQATFSPGTLVPGVDVSPDK.M
3269.3282	3268.3209	3268.4599	-0.1389	398	- 426	0	K.QAAYPVSGFADSVSYNHHHDHYTQAGDLYR.L

No match to: 804.4691, 958.6130, 1277.6667, 1428.3772, 1430.1640, 1436.1632, 1440.4879

1.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์กับโปรตีน KatA (gi|154685344)

1	MSSNKLTTSW	GAPVGDNONS	MTAGDRGPAL	IQDVHLLLEKL	AHFNRRERVPE
51	RVVHAKGAGA	HGYFEVTNDV	TKYTKAAFLS	EVGKRTPLFI	RFSTVAGELG
101	SSDTRVDRPRG	FAVKFYTEEG	NYDIVGNNTP	VFFIRDAIKF	PDFIHTQKRD
151	PRTHLKNPTA	VWDFWLSLSPE	SLHQVTILMS	DRGIPATLRH	MHGFGSHTFK
201	WTNDKGEVW	IKYHFKTEQG	VKNLVDNTAA	KIAGENPDYH	TEDLFNAIEN
251	GDFPAWKLYV	QIMPLEDANT	YRFDPFDVTK	VWSQKDYPLI	EVGRMVLNLRN
301	PENYFAEVEQ	ATFSPGTLVP	GVDVSPDKML	QGRLFAYHDA	HRYRVGANHQ
351	ALPINRSRNE	VKNYQRDQOM	RFDDNNGRSV	YYEPNSFGGP	KESPDKQAA
401	YPVSGFADSV	SYNHHHDHYTQ	AGDLYRLMSE	EERARLVANI	VSAMKPVKEE
451	EIKLRQIGHF	YKADPEYGRR	VAEGLGLPSP	K	

หมายเหตุ: ตัวอักษรตัวหนาแสดงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย M10 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

gb|EU194897.1| *Bacillus* sp. CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1445

Score = 874 bits (473), Expect = 0.0

Identities = 509/526 (96%), Gaps = 4/526 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 6	CTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGG	65
Sbjct11	CTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGG	70
Query66	TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA	125
Sbjct71	TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA	130
Query126	TACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT	185
Sbjct131	TACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT	190
Query186	ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT	245
Sbjct191	ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT	250
Query246	GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	305
Sbjct251	GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	310
Query306	ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC	365
Sbjct311	ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC	370
Query366	GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAAAACAAGTGCCGTT	425
Sbjct371	GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAGAACAAGTGCCGTT	430
Query426	TCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCGGAGGGGGCGGGCTAACACGTGCC	485
Sbjct431	-CAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC-CACGG-CTAACTACGTGCC	487
Query486	CGCCCCGCGGTAATACGGTTGGTGGCAAGCGTTGTCCGCAATTAT	531
Sbjct488	AGCAGCCGCGGTAATACG-TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGCAATTAT	532

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici* บนผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา โดยวิธี DMRT

Oneway

Descriptives

LESION		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
control		3	2.4900	.01732	.01000	2.4470	2.5330	2.47	2.50	
c1		3	2.4000	.01000	.00577	2.3752	2.4248	2.39	2.41	
c2		3	1.1667	.05774	.03333	1.0232	1.3101	1.10	1.20	
c3		3	.5067	.02517	.01453	.4442	.5692	.48	.53	
c4		3	.2200	.01000	.00577	.1952	.2448	.21	.23	
Total		15	1.3567	.97394	.25147	.8173	1.8960	.21	2.50	
Model	Fixed Effects			.02989	.00772	1.3395	1.3739			
	Random Effects				.47030	.0509	2.6624			1.10560

Test of Homogeneity of Variances

LESION			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.824	4	10	.011

ANOVA

LESION					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.271	4	3.318	3713.843	.000
Within Groups	.009	10	.001		
Total	13.280	14			

LESION

		N	Subset for alpha = .05				
CONC			1	2	3	4	5
Duncan ^a	c4	3	.2200				
	c3	3		.5067			
	c2	3			1.1667		
	c1	3				2.4000	
	control	3					2.4900
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *C. capsici*
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.4900	.01732	.01000	2.4470	2.5330	2.47	2.50	
c1	3	.4967	.00577	.00333	.4823	.5110	.49	.50	
c2	3	.2633	.01155	.00667	.2346	.2920	.25	.27	
c3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
c4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
Total	15	.6500	.97144	.25083	.1120	1.1880	.00	2.50	
Model									
Fixed Effects			.00966	.00249	.6444	.6556			
Random Effects				.46923	-.6528	1.9528			1.10087

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.714	4	10	.002

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.211	4	3.303	35386.25	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	13.212	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan ^a c3	3	.0000			
c4	3	.0000			
c2	3		.2633		
c1	3			.4967	
control	3				2.4900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici* บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ โดยวิธี DMRT

Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.3067	.01528	.00882	2.2687	2.3446	2.29	2.32	
c1	3	1.1967	.01528	.00882	1.1587	1.2346	1.18	1.21	
c2	3	.4233	.02082	.01202	.3716	.4750	.40	.44	
c3	3	.2067	.04041	.02333	.1063	.3071	.17	.25	
c4	3	.1167	.01155	.00667	.0880	.1454	.11	.13	
Total	15	.8500	.85074	.21966	.3789	1.3211	.11	2.32	
Model									
Fixed Effects									
Random Effects									.84376

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.737	4	10	.218

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.127	4	2.532	4747.156	.000
Within Groups	.005	10	.001		
Total	10.133	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a c4	3	.1167				
c3	3	.2067				
c2	3	.4233				
c1	3				1.1967	
control	3					2.3067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *C. capsici*
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.3067	.01528	.00882	2.2687	2.3446	2.29	2.32	
c1	3	.3433	.02082	.01202	.2916	.3950	.32	.36	
c2	3	.2667	.03512	.02028	.1794	.3539	.23	.30	
c3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
c4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
Total	15	.5833	.90351	.23329	.0830	1.0837	.00	2.32	
Model									
Fixed Effects			.01949	.00503	.5721	.5945			
Random Effects				.43637	-.6282	1.7949			.95195

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.626	4	10	.045

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.425	4	2.856	7516.404	.000
Within Groups	.004	10	.000		
Total	11.429	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan ^a c3	3	.0000			
c4	3	.0000			
c2	3		.2667		
c1	3			.3433	
control	3				2.3067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. capsici*
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี โดยวิธี DMRT

➔ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.2500	.02646	.01528	2.1843	2.3157	2.22	2.27	
c1	3	1.0900	.07937	.04583	.8928	1.2872	1.00	1.15	
c2	3	.7333	.15275	.08819	.3539	1.1128	.60	.90	
c3	3	.4100	.01000	.00577	.3852	.4348	.40	.42	
c4	3	.2000	.01000	.00577	.1752	.2248	.19	.21	
Total	15	.9367	.75073	.19384	.5209	1.3524	.19	2.27	
Model	Fixed Effects		.07815	.02018	.8917	.9816			
	Random Effects			.36123	-.0663	1.9396			.65040

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.149	4	10	.016

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.829	4	1.957	320.521	.000
Within Groups	.061	10	.006		
Total	7.890	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a c4	3	.2000				
c3	3		.4100			
c2	3			.7333		
c1	3				1.0900	
control	3					2.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *C. capsici*
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.2500	.02646	.01528	2.1843	2.3157	2.22	2.27	
c1	3	.4933	.01155	.00667	.4646	.5220	.48	.50	
c2	3	.2067	.02082	.01202	.1550	.2584	.19	.23	
c3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
c4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
Total	15	.5900	.87940	.22706	.1030	1.0770	.00	2.27	
Model									
Fixed Effects			.01592	.00411	.5808	.5992			
Random Effects				.42474	-.5893	1.7693			.90194

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.600	4	10	.007

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.824	4	2.706	10681.84	.000
Within Groups	.003	10	.000		
Total	10.827	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan ^a					
c3	3	.0000			
c4	3	.0000			
c2	3		.2067		
c1	3			.4933	
control	3				2.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกันรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา โดยวิธี DMRT

➔ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	3.0000	.20000	.11547	2.5032	3.4968	2.80	3.20	
c1	3	2.5000	.10000	.05774	2.2516	2.7484	2.40	2.60	
c2	3	2.0667	.11547	.06667	1.7798	2.3535	2.00	2.20	
c3	3	.5067	.01155	.00667	.4780	.5354	.50	.52	
c4	3	.2933	.01155	.00667	.2646	.3220	.28	.30	
Total	15	1.6733	1.12498	.29047	1.0503	2.2963	.28	3.20	
Model			.11278	.02912	1.6084	1.7382			
Fixed Effects									
Random Effects				.54146	.1700	3.1767			1.46167

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.367	4	10	.123

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.591	4	4.398	345.734	.000
Within Groups	.127	10	.013		
Total	17.718	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a						
c4	3	.2933				
c3	3		.5067			
c2	3			2.0667		
c1	3				2.5000	
control	3					3.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *Fusarium* sp.
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์สีดา โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	3.0000	.20000	.11547	2.5032	3.4968	2.80	3.20	
c1	3	.5000	.10000	.05774	.2516	.7484	.40	.60	
c2	3	.3067	.01155	.00667	.2780	.3354	.30	.32	
c3	3	.2733	.01155	.00667	.2446	.3020	.26	.28	
c4	3	.2567	.03055	.01764	.1808	.3326	.23	.29	
Total	15	.8673	1.11074	.28679	.2522	1.4824	.23	3.20	
Model									
Fixed Effects				.02613	.8091	.9255			
Random Effects				.53494	-.6179	2.3526			1.42741

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.521	4	10	.107

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.170	4	4.292	419.187	.000
Within Groups	.102	10	.010		
Total	17.272	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Duncan ^a				
c4	3	.2567		
c3	3	.2733		
c2	3	.3067		
c1	3		.5000	
control	3			3.0000
Sig.		.576	1.000	1.000

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกันรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	1.1000	.10000	.05774	.8516	1.3484	1.00	1.20	
c1	3	.7867	.03215	.01856	.7068	.8665	.75	.81	
c2	3	.5667	.02887	.01667	.4950	.6384	.55	.60	
c3	3	.3267	.02082	.01202	.2750	.3784	.31	.35	
c4	3	.2300	.01732	.01000	.1870	.2730	.21	.24	
Total	15	.6020	.32927	.08502	.4197	.7843	.21	1.20	
Model				.05020	.5731	.6309			
Fixed Effects				.15773	.1641	1.0399			
Random Effects									.12355

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.954	4	10	.178

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.493	4	.373	148.079	.000
Within Groups	.025	10	.003		
Total	1.518	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a c4	3	.2300				
c3	3		.3267			
c2	3			.5667		
c1	3				.7867	
control	3					1.1000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *Fusarium* sp. บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ท้อ โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
control		3	1.1000	.10000	.05774	.8516	1.3484	1.00	1.20	
c1		3	.3367	.02309	.01333	.2793	.3940	.31	.35	
c2		3	.2467	.00577	.00333	.2323	.2610	.24	.25	
c3		3	.2300	.02646	.01528	.1643	.2957	.20	.25	
c4		3	.2200	.02000	.01155	.1703	.2697	.20	.24	
Total		15	.4267	.35347	.09126	.2309	.6224	.20	1.20	
Model	Fixed Effects			.04830	.01247	.3989	.4545			
	Random Effects				.16960	-.0442	.8975			.14304

Test of Homogeneity of Variances

LESION			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.449	4	10	.114

ANOVA

LESION					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.726	4	.431	184.907	.000
Within Groups	.023	10	.002		
Total	1.749	14			

LESION

		N	Subset for alpha = .05		
CONC			1	2	3
Duncan ^a	c4	3	.2200		
	c3	3	.2300		
	c2	3	.2467		
	c1	3		.3367	
	control	3			1.1000
	Sig.		.533	1.000	1.000

11. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Fusarium* sp.
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
control		3	2.8800	.06083	.03512	2.7289	3.0311	2.84	2.95	
c1		3	2.5800	.02646	.01528	2.5143	2.6457	2.55	2.60	
c2		3	2.3967	.00577	.00333	2.3823	2.4110	2.39	2.40	
c3		3	1.3667	.15275	.08819	.9872	1.7461	1.20	1.50	
c4		3	.2900	.01000	.00577	.2652	.3148	.28	.30	
Total		15	1.9027	.98900	.25536	1.3550	2.4504	.28	2.95	
Model	Fixed Effects			.07465	.01928	1.8597	1.9456			
	Random Effects				.47676	.5790	3.2264			1.13464

Test of Homogeneity of Variances

LESION			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.468	4	10	.013

ANOVA

LESION					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.638	4	3.409	611.751	.000
Within Groups	.056	10	.006		
Total	13.694	14			

LESION

		N	Subset for alpha = .05				
CONC			1	2	3	4	5
Duncan ^a	c4	3	.2900				
	c3	3		1.3667			
	c2	3			2.3967		
	c1	3				2.5800	
	control	3					2.8800
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

12. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันรา *Fusarium* sp.
บนผลมะเขือเทศ พันธุ์ราชินี โดยวิธี DMRT

→ Oneway

Descriptives

LESION

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
control	3	2.8800	.06083	.03512	2.7289	3.0311	2.84	2.95	
c1	3	1.2000	.10000	.05774	.9516	1.4484	1.10	1.30	
c2	3	.7100	.01732	.01000	.6670	.7530	.69	.72	
c3	3	.3000	.01000	.00577	.2752	.3248	.29	.31	
c4	3	.2800	.02000	.01155	.2303	.3297	.26	.30	
Total	15	1.0740	.99813	.25771	.5213	1.6267	.26	2.95	
Model									
Fixed Effects			.05385	.01390	1.0430	1.1050			
Random Effects				.48164	-.2632	2.4112			1.15891

Test of Homogeneity of Variances

LESION

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.571	4	10	.103

ANOVA

LESION

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.919	4	3.480	1199.876	.000
Within Groups	.029	10	.003		
Total	13.948	14			

LESION

CONC	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan ^a c4	3	.2800			
c3	3	.3000			
c2	3		.7100		
c1	3			1.2000	
control	3				2.8800
Sig.		.659	1.000	1.000	1.000

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวประภาศรี ศรีคง เกิดเมื่อวันที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดสระบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 111/1 หมู่ 4 ตำบล บ้านโป่ง อำเภอหนองโดน จังหวัด สระบุรี 18190



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย