รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และรัศมี ฐิติเกียรติพงศ์. 2540. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมเชื้อโรคพืชทางดิน. **วารสารโรคพืช** 12: 41-47.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสอาด, พิรุณ จันทนกุล และมนูญ เอนกชัย. 2535. การป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อบักเตรี *Bacillus subtilis*. **วารสารข้าว** 1: 42-53.

ปรีชา ประเทพา. 2543. **พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม**. มหาสารคาม: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

มณจันทร์ เมฆธน. 2536. ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุของโรคพืช. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 11 (1): 9-20.

วุฒิ สุมิตร และชำนาญ แย้มผกา. 252530. ห้วยฮ่องไคร้ : ศูนย์ศึกษาพัฒนาอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. **วารสารข้าราชการ** 4: 32-37.

ศรีสุดา กวยาสกุล. 2542. การนับจำนวนและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อรา. **วารสารวิทยาศาสตร์** 339-344.

ศรีสุดา กวยาสกุล. 2536. **แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium moniliforme* SHELEDON เชื้อสาเหตุโรครากและลำต้นเน่าของอ้อย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2540. การจัดการโรคพืช ตอนที่ 1. **วารสารโรคพืช** 11 (1-2): 9-17.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, M. 1976. **Introduction of Soil Microbiology**. 2 nd ed. New York: John Wiley and Sons, 472 P.

Aldrich, J. and Baker, R. 1970. Biological control of *Fusarium roseum f. sp. Dianthi* by *Bacillus subtilis*. **Plant Dis. Rep**. 54 (5): 446-448.

Asante, G.S. and Neal, A.L. 1964. Characterization of fungistatic substances produced by a Bacillus antagonistic to *Ceratocystic ulmi*. **Phytopathol** 54: 819-822.

Bardakci, F. and Skibinski, D.O.F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: and subspecies identification. **Heredity** 73: 117-123.

Barnes, B.V., Zak, D.R., Dental, S.R. and Spurr, S.H. 1998. **Forest Ecology**, 4 th edition, John wiley & Son, Inc., New York, pp. 763

Batinic, T., Schmitt, J., Schulz, U.M., and Werner, D. 1998. Construction of RAPD – generated DNA probes for the quantification of *Bacillus subtilis* FZB C and the evaluation of its biocontrol efficiency in the system *Cucumis sativus* - *Pythium ultimum*. **Zeitschrift for Pfanzenkrankheiten and Pflanzenschutz** 105: 168-172.

Brock, T.D. 1966. Microbial ecology and applied microbiology. **Adv. Appl. Microbiol.** 8: 61-75.

Brown, A.L. 1978. **Ecology of Soil Organisms**. Heinemann Educational Books Ltd., London. 116 p.

Brousseau, R., Saint-onge, A., Prefontaine, G., Masson, L. and Cabana, J. 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. **Applied and enviromental microbiology** 59: 114-119.

Bu'Lock, J.D. 1961. Intermediatry metabolism and antibiotic synthesis. **Adv. Appl. Microbiol**. 3 : 293 -342.

Burr, M.D. and Pepper, I.L. 1997. Variability in presence-absence scoring of AP PCR fingerprints affects computer matching of bacterial isolates. **Journal of Microbiological Methods** 29: 63-68.

Cork, A.T.K. and Risbeth, J. 1981. **Use of microorganisms to control plant diseases**. Pages 717-736 In: Burges, H.D.ed. **Micribial control pests and plant Diseases**. 1970-1980. London: Academic press. 949 p.

Cocconcelli, P.S., Paris, M.G. Senini, l. and Bottazzi, V. 1997. Use of RAPD and 16S rRNA Sequencing for the study of Lactobacilllus population dinamics in natural whey culture. **Letters Appl. Microbiol**. 25: 8-12.

DeBuono, B.A., Brondum, J., Kmer, J.M., Gilbert, R.J. and Opal, S.M. 1998. Plasmid, serotypic, and enterotoxin analysis of *Bacillus cereus* in an outbreak setting. **Journal of Clinical Microbiology** 26: 1571-1574.

Edwards, C.A. and Rattan, L. 1990. **Sustainable Agricultural Systems**. St. Lucie Press, pp. 614-621

Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N. and Thomus, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on Grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **The American Phytopathological Society** 81: 283-287.

Gordon, R.e., Haynes, W.C. and Hor-Noy Pang, C. 1973. **The Genus *Bacillus***. Used agriculture handbook No. 427 Washington D.C.

Huang and Chang. 1975. Studies on Xanthobaccidin, a new antibiotic form *Bacillus subtilis* active ageinst Xanthomonas. **Bot. Bull. Acad. Sinica**. 16: 137-148.

Jansin, E.F. Hsieh and Hirshmann, D.J. 1944. Production of subtilin. Arch. Biochem. 4: 297-309.

Johanson, A., Crowhurst, R.N., Rikkerink, E.H.A., Fullerton, R.A. and Templeton. M.D. 1994. The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. mucsicola*, the causal agent of Sigatoka disease of banana. **Plant pathol**. 43: 701-7107.

Kangfu Yu and Pauls, K.P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. **Nucleic acids Research** 20: 2506.

Katz, E. and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis and possible functions. **Bacteriol. Rev**. 41(2): 449-474.

Kim H.T. 1996. **Soil Sampling, Preparation and Analysis**. New York: Maral Dekk

Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 1 Williams & Wilkins, Baltimore, MD. pp. 140-598.

Kurylowicz, W. 1976. **Antibiotic**: Warsaw: A critical Review. Polish Medical Publishers, 1047 pp.

Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittanakom, Kungler, M., Knorp, E., Hsieh, T.F. and Wu, T.G. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin form *B. Subtilis* F-29-23. A cimpairison with activities of other Bacillus antibiotics. **J. Phytopathology** 115: 204-213.

Mac faddin, F.J. 1980. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**, Baltimore: TheWilliam and Wilkin Company.

Martin, R.C.E. 1993. **Soil Sampling and Methods of Analysis**. Canadian Society of Soil Science.

Mckeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* of *Bacillus subtilis*. **Phytopathol**. 76: 136-139.

Michener, H.D. and Snell, N. 1949. Two antifungal substance from a strain of *Bacillus subtilis* culture. Arch. Biochem. 22: 208-214.

Moran, C., Wikinson, P. and Shaw, D.D. 1989. Allozyme variation across a narrow hybrid zone in the grasshopper, *Caledia captica*. **Heredity** 4: 69-81.

Niemann, S., Puhler, A., Tichy, H.V., Simon, R. and Selbitschka, W. 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of natural *Rhizobium melifoti* population. **J. Appl. Microbiol**. 82: 477-483.

Nilsson, J., Svinsson, B., Ekelund K. and Christiansson, A. 1998. A RAPD-PCR method for large- scale typing of *Bacillus cereus*. **Letters in applied Micribiology** 27: 168-172.

Oakey, H.J., Ellis, J.T. and Gibson. L.F. 1996. Diffferentiation of Aeromonas genomospecies using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **J. Appli. Bacteriol**. 80: 402-410.

Permaul, K., Pillay, D. and Pillay, B. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows interspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strain. **Letters Appl. Bacteriol**. 23: 307-311.

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. and Pelczar. 1981. Microbiology 2d. ed. New York: McGraw. Hill Book Company, 698pp.

Pleban, S., Ingel, F. and Chet, I. 1995. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerlotium rolfsii* in the green house using edophytic *Bacillus sp*. **Eur. J. Plant Pathology** 101: 665-672.

Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.T., Reilly, C.C. and Wilson, C.L. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for post harvest control of peach brown rot. **Plant Dis**. 72: 622-626.

Rafalski, J.A., Tingery, S.V. and Williams, J.G.K. 1994. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers**, pp. 1-8. In plant molecular Biology Manual. London: Kluwer Academic Publishers

Reddy, M.S. and Rage, J.E. 1989. *Bacillus subtilis* and selected onion rhizobacteria in onion seeding rhizosphere: Effecton seeding growth and indigenous rhizoaphee microglora. **Soil Biol. Biochem**. 21 (3): 379-383.

Roberts, M.S. and Cohan, F.M. 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and Mojavensis. **Evolution** 49 (6): 1081-1094

Ronimus, R.S., Parker, L.E. and Morgan, H.W. 1997. The utilization of RAPD-PCR of indentifying thermophilic and mesophilic *Bacillus species*. **FEMS Microbiology Letters** 147: 75-81.

Ruano, G., Brash, D.E. and Kidd, K.K. 1991. PCR: the first few cycles. **Amplifications** 7: 1-4.

Shinagawa, K. 1993. Serology and characterization of toxigenetic *Bacillus cereus* . **Netherlands Milk and Darily** 47: 89-103.

Sinclair, J.B., Agnihotri, P.V., Singh, N., Chrube, Singh, U.S. and Dnivedi. 1989. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant disease. **Perspectives in Phytopathology** 367-374.

Sikora, S., Redzepovic, S., Pejic, I. And Kozumplik, V. 1997. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* population ravealed by RAPD fingerprinting. **J. Appl. Microbiol**. 82: 527-531.

Sirokin, G. and Cullimore, S. 1969. **Practical Microbiology**. New York: McGRaw-Hill, 437pp.

Smith, D.R. and Stanosz, G.R. 1995. Confirmation of two distinct poppulations of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States using RAPDs. **Phytopathology** 85: 699-704.

Sneath, H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2 Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1104-1139.

Sobral, B.W.S. and Honeycutt, R.J. 1993. High out put genetic mapping of polypoids using PCR-generate markers. **Theor. Appl. Genet**. 86: 105-112.

Stanosz, G.R., Smith, D.R. and Guthmiller, M.A. 1996. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* form the West Central United States by means of random amplified polymorphic DNA marker analysis. **Plant Dis.** 80: 1175-1178.

Staub, J.E. and Meglic, V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination : a case study in cucumber. **Hort. Technol.** 3: 291-299.

Stephan, R., Schraft, H. and Untermann, F. 1994. Charterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). **Microbiology** 18: 260-263.

Stephan, R. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic Fingerprinting of *Bacillus cereus* isolates. **Food Microbiology** 31: 311-316.

Tate, R.L. 1995. **Soil Microbiology**. New york: John Wiley & Sons, pp. 100-120.

Vettori, C., Paffetti, D., Pietramellara, G., Stotzky, G. and Gallori, E. 1996. Amplification of bacterial DNA bound on clay minerrals by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **FEMS Microbiology Ecology** 20: 251-260.

Waksman, S.A. 1961. The role of antibiotics in nature. **Perspect. Biol. Med.** 4: 271-278.

Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. **Trend. Biotech.** 10: 186-191.

Welsh, J. and Mcclelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary Primers. **Nucleic Acids Research** 18 (2a): 7213-7218.

Williams, J.K., Kubelik, A., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.

Williams, J.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using Random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology** 218: 704-740.

Wolin, M.J. 1979. **Physical agents bactericidal substances and chemotherapeutic drug,** pp. 121-156. In B.A. Freeman (eds.). Texbook of Microbiology. 21st ed. Philadeophea: W.B. Sauders Company

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิธีเตรียม

สูตรอาหารเหล่านี้ ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นอาหารบางสูตรที่ระบุไว้โดยเฉพาะ อาหารทุกชนิดเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

1. Nutrient medium

Bacto-peptone	5.0	กรัม
Beef extract (Difco)	3.0	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
pH	7.0	

เมื่อจะเตรียม Nutrient Agar (NA) เติมวุ้น 15 กรัม ลงในอาหาร Nutrient Medium (NB)

2. Martin's medium

Bacto-Peptone	5.0	กรัม
Dextrose	10	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.05	กรัม
Rose bengal	0.05	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH	7.2	

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงเติม Chloramphenical 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย) เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน

3. Sodium caseinate agar (SCA)

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium caseinate	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.02	กรัม
$FeSO_4$ 7 H_2O	trace	
Agar	15.0	กรัม
pH	6.8-7.0	

ถ้าต้องการทดสอบความสามารถในการย่อยเคซีนของเชื้อแบคทีเรียให้ streak เชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหาร บ่มเชื้อที่อุณภูมิห้องนาน 3-5 วัน ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเคซีนได้

4. Potato dextrose medium

มันฝรั่งหั่นชิ้นสี่เหลี่ยม	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาล Dextrose ลงไปคนให้ละลายผสมกัน กรอกใส่ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ถ้าต้องการ potato dextrose agar (PDA) ให้เติมวุ้นลงไป 15 กรัม

5. Motality test medium

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
pH	6.8-7.0	

เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยเขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารเชื้อที่เจริญนอกรอยปลูกเชื้อ แสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้ (Gordon et al., 1973)

6. Voges- proskauer medium (VP)

Bacto-peptone	7.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม

เป็นอาหารทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วผลิต acetoin ซึ่งทำให้อาหารมีพีเอชเป็นกลาง ทดสอบโดยเขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย ∝-napthol 5 เปอร์เซ็นต์ 0.6 มิลลิลิตร แล้วหยดด้วยสารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 0.2 มิลลิลิตรลงไป (ภาคผนวก ข) เขย่าหลอดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ถ้ามี acetoin ในอาหารทดสอบ จะมีสีชมพูแดง

7. Starch agar

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Soluble starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH	6.8 – 7.0	

ถ้าต้องการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของแบคทีเรีย ให้เขี่ยเชื้อ 24 ชั่วโมง ลงบนอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน ตรวจดูการย่อยแป้งโดยหยดน้ำยาไอโอดีน (ภาคผนวก ข) จนกระทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงเชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

8. Simmon's citrate agar

$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
pH	6.8- 6.9	

เป็นอาหารทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนโดย เขี่ยเชื้อ อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจการเปลี่ยนสีของบรอมไธมอลบูลทุกวัน ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้

9. Glucose medium

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
K_4HPO_4	1.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
pH	6.9-7.2	

เติมบรอมไธมอลบูล 1.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงใน glucose medium เพื่อเป็นดัชนีชี้บอกระดับความเป็นกรดปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N ให้พีเอชอยู่ในช่วง 6.9-7.2 บรรจุอาหารลงในหลอดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ถ้าต้องการทดสอบการสร้างแก๊สใส่หลอดดักแก๊สใส่หลอดดดักแก๊สไว้ภายในหลอดอาหารนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 10 นาที จากนั้น นำออกมาแช่น้ำเย็น ทันทีเพื่อ ป้องกันน้ำตาลแตกตัวตรวจการเกิดกรดในอาหารโดยเขี่ยเชื่อลงในอาหารบ่มเชื่อที่อุณหภูมิห้องตรวจผลเป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสได้จะสร้างกรดขึ้นมาทำให้อาหารที่มีบรอมไธมอลบลู เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

10. การศึกษาการสร้างเอนไซม์ catalase

ศึกษาการสร้างเอนไซม์ ctalase เพื่อใช้ในการ เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ให้เป็นออกซิเจนทดสอบโดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ลงบนโคโลนีของเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ catalase (Gunther and White, 1961)

11. การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในสภาพที่ไม่มีอากาศ

โดยการ Streak กล้าเชื้อลงบนอาหาร NA ผิวเอียง ตัดจุกสำลีที่โผล่พ้นปากหลอด และจุกสำลีที่เหลือคาปากหลอดให้ลงไปในปากหลอดลึกประมาณ 1-2 นิ้ว เติม pyrogallol ลงไปในหลอดบริเวณเหนือจุกสำลี ให้สูงประมาณ 1 นิ้ว แล้วหยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์จนเห็นสำลีเปียกหมาดๆ แล้วอุดปากหลอดด้วยจุกยางสีส้มให้แน่น แล้วจุ่มปากหลอดลงในขี้ผึ้งที่หลอม

เหลว เพื่อให้ขี้ผึ้งอัดแน่นระหว่างจุกและหลอด ป้องกันการแทรกซึมลงไปในหลอดบ่มเชื้อโดยคว่ำปากหลอดลงข้างล่างที่ อุณหภูมิห้อง 7-14 วัน

12. Nitrate reducid to nitrite (Mac Faddin, 1980)

ทดสอบเพื่อศึกษาดูความสามารถของ bacteria ในการ reduce nitrate ให้ เป็น nitrite หรือ nitrogen gas โดย inoculate เชื้อลงใน trypticase-nitrate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติม sulfanilic acid solution 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และเติม dimethyl-alpha-naphtyl-amine solution 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก) เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามี nitric อยู่ ถ้าไม่มีสี ยังสรุปไม่ได้ ให้ทดสอบต่อโดยเติม zinc dust 20 มิลลิกรัม ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่ามี nitrate อยู่ ถ้าไม่มีสีแสดงว่าไม่มี nitrate เหลืออยู่

13. Gelatin (Mac Faddin, 1980)

เพื่อดูความสามารถของ bacteria ว่าสร้าง enzyme gelatinase ได้หรือไม่ ถ้ามี gelatinase จะทำให้ gelatin ละลาย โดย inoculate เชื้อลงใน nutrient gelatin โดยใช้ needle จะทำให้ gelatin ละลาย โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำมาใส่ในตู้เย็น ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตรวจดูรูปแบบของการละลาย gelatin พร้อมทั้งดูการเจริญเติบโตโดยสังเกตจากความขุ่น

14. Methyl red

เพื่อทดสอบดูความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างกรด ซึ่งเป็น end products ของ glucose fermentation และปริมาณกรดที่สร้างนั้นมีมากพอที่จะเอาชนะ buffering capacity หรือไม่ โดย inoculate เชื้อลงใน MR-VP broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำมาทดสอบโดยเติม methyl red indicator ประมาณ 5 หยด ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของอาหาร แสดงว่าแบคทีเรีย สามารถสร้างกรดได้

15. Carbohydrate Fermentation test

เพื่อทดสอบดูความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการ ferment (degrade) specific carbohydrate ที่ใส่ลงใน basal medium โดยตรวจผลจากการเกิดกรดหรือก๊าซในอาหาร โดย inoculate เชื้อลงใน Andrade's carbohydrate broth แต่ละอย่างคือ Glucose, mannitol, Xylose, Arabinose นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นแดง และมีก๊าซใน Durham tube แสดงว่าเป็น positive Test

ภาคผนวก ข

วิธีการย้อมสี และวิธีเตรียมสารเคมี

1. สีที่ใช้ย้อมแกรม และวิธีการที่ใช้ย้อมแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crytal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol	20.0	กรัม

ละลาย crystal violet ในเอธานอล 95% 20 มิลลิลิตร แล้วเจือจางในสารละลาย ammonium oxalate 1% 80 มิลลิลิตร

1.1.2 Gram's iodine

Gram's iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

สารละลาย Potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย iodine ในสารละลาย potassium iodine จนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปทดสอบ

1.1.3 เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีย้อมสีแบบแกรม

smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง บนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง ฟิกซ์ โดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ย้อม smear ด้วย crystal violet โดยหยดสีให้ท่วม smear 1 นาที เทสีทิ้งล้างด้วยน้ำเล็กน้อยหยดแกรมไอโอดินลงให้ท่วม smear นาน 1 นาที จากนั้นเทไอโอดินทิ้ง แล้วล้าง smear ด้วย ethanol 95% นาน 15 วินาที ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อม

smear ด้วยสี Safranin-O นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม และการจัดเรียงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. สีย้อม และวิธีการย้อมเอนโดสปอร์

2.1 สีย้อมเอนโดสปอร์

2.1.1 Malachite green solution

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95.0	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำไปใช้

2.1.2 Safranin solution

Safranin	2.5	กรัม
เอธานอล 95%	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีย้อมเอนโดสปอร์

Smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนสไลด์ที่สะอาดทิ้งให้แห้ง ฟิกซ์ smear โดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ย้อม smear ด้วย malachite green โดยหยดสีให้ท่วม smear นำสไลด์ไปอังบนไอน้ำเดือด หรืออังบนเปลวไฟ คอยเติมสี malachite green อย่าให้สีแห้ง เป็นเวลานาน 10 นาที ทิ้งสไลด์ให้เย็น จากนั้นนำไปล้างน้ำแล้วย้อม smear ด้วยสี safranin-0 นาน 15 วินาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์จะติดสีแดงของ safranin-0 ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

2.1.3 Hydrogen peroxide solution

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย hydrogen peroxide ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์โดยแสง

2.1.4 Alpha napthol เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

Alpha napthol	5.0	กรัม
เอธานอล 95%	100	มิลลิลิตร

ละลาย alpha napthol ในเอธานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชา

4.2 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

Potassium hydroxide (KOH)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิกรัม

ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชา สารละลายไอโอดีนสำหรับการทดสอบแป้ง Crystal iodine 1.0 กรัม Potassium idodine 2.0 กรัม เอธานอล 30.0 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 300.0 มิลลิลิตร ละลาย potassium idodine ด้วยเอธานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นละลายไอโอดีนในสารละลาย potassium idodide แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปใช้ทดสอบ

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับสกัด ดีเอ็นเอ

1. Saline – EDTA

NaCl	5.84	กรัม
EDTA	4.61	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

2. DNA extraction buffer

Tris-base	121.14	กรัม
NaCl	58.44	กรัม
SDS	100	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

3. Loading buffer

glycerol	56.50	มิลลิลิตร
EDTA	29.23	ลิตร
Bromphenol blue	0.1	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100	มิลลิลิตร

4. TBE Electrophoresis buffer

Tris-base	10.78	กรัม
boric aacid	5.50	กรัม
EDTA	0.58	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100	มิลลิลิตร

5. 3 M Sodium acetate

Sodium acetate	123.06	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

6. 0.5 μg/ml Ethidium bromide

Ethidium bromide	0.005	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

7. TE buffer (10 mM tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

Tris-base	1.21	กรัม
EDTA	0.29	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100	ลิตร

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 M แล้วจึงเติม EDTA ลงไป 0.29 กรัม

8. 1.8% Agarose gel

Agarose	1.8	กรัม
TBE buffer	100	มิลลิลิตร

ละลาย 1.8 กรัม Agarose gel ลงใน TBE buffer 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด โดยเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 35 ชนิด ที่คัดเลือกได้ จากดินทั้ง 5 แปลง (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เชื้อแบคทีเรีย	Inhibition zone (เซนติเมตร)		
	P. parasitica	*P. palmivora*	*P. grisea*
B. subtilis NRS01-2	3.63	2.17	2.20
B. subtilis NRS02-1	2.77	1.23	1.10
B. subtilis NRS02-2	2.43	2.07	2.17
B. subtilis NRS02-3	2.83	1.90	1.10
B. subtilis NRS02-4	3.10	1.60	1.27
B. subtilis NRS03-1	2.87	1.43	1.10
B. subtilis NRS03-2	2.77	1.37	1.00
B. subtilis COS02-1	2.50	1.93	1.97
B. subtilis COS03-1	2.87	1.47	1.10
B. subtilis COS03-2	3.10	2.37	2.10
B. subtilis COS03-3	2.47	1.50	1.03
B. subtilis COS03-4	2.97	1.40	1.10
B. subtilis COS03-5	2.53	1.67	1.10
B. subtilis AGS02-1	3.030	1.43	1.17
B. subtilis AGS02-2	3.070	1.67	0.97
B. subtilis AGS03-1	3.20	2.53	2.10
B. subtilis PS202-1	2.67	2.23	1.13
B. subtilis PS202-2	2.70	1.43	0.93
B. subtilis PS5202-1	3.00	1.43	1.10
B. subtilis PS5202-2	3.10	1.90	2.03
B. subtilis PS5202-3	3.00	1.83	1.23
B. subtilis PS5202-4	3.00	1.40	1.10
B. subtilis PS5202-5	3.10	1.70	1.03

ตารางที่ 1 (ต่อ)			
B. subtilis PS5202-6	3.10	1.30	1.07
B. subtilis PS5202-7	2.65	1.73	1.00
B. subtilis PS5202-8	2.90	2.53	2.30
B. subtilis PS5202-9	2.80	1.90	1.93
B. subtilis PS5203-1	2.80	1.16	1.10
B. subtilis PS5203-2	2.90	1.40	1.07
B. subtilis PS5203-3	2.90	1.57	1.10
B. subtilis PS5203-4	3.10	2.90	2.33
B. subtilis PS5203-5	3.00	1.43	1.07
B. subtilis PS5203-6	3.20	1.47	1.13
B. subtilis PS5203-7	3.30	1.37	1.10
B. subtilis PS5203-8	3.00	1.33	1.03
control	3.10	2.25	2.10

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	Inhibition zone (เซนติเมตร)		
	B. oryzae	*C. gloeosporioides*	*F. oxysporum*
B. subtilis NRS01-2	3.76	3.20	3.00
B. subtilis NRS02-1	2.60	2.45	2.43
B. subtilis NRS02-2	3.73	3.26	3.00
B. subtilis NRS02-3	3.20	3.13	3.00
B. subtilis NRS02-4	2.60	2.40	2.16
B. subtilis NRS03-1	2.86	3.80	2.10
B. subtilis NRS03-2	2.13	3.90	1.96
B. subtilis COS02-1	3.45	4.10	2.16
B. subtilis COS03-1	2.56	2.63	2.33
B. subtilis COS03-2	3.46	3.90	2.60
B. subtilis COS03-3	2.83	2.25	2.16
B. subtilis COS03-4	2.46	2.50	2.16
B. subtilis COS03-5	2.46	2.10	2.06
B. subtilis AGS02-	2.50	2.63	2.20
B. subtilis AGS02-2	2.60	2.50	1.93
B. subtilis AGS03-1	3.80	2.50	1.96
B. subtilis PS202-1	2.60	2.43	2.43
B. subtilis PS202-2	2.23	2.56	2.06
B. subtilis PS5202-1	2.60	2.46	2.00
B. subtilis PS5202-2	3.26	2.06	2.98
B. subtilis PS5202-3	2.66	2.42	2.40
B. subtilis PS5202-4	2.66	2.60	2.50
B. subtilis PS5202-5	2.30	2.53	2.40
B. subtilis PS5202-6	2.70	2.43	2.20
B. subtilis PS5202-7	2.50	2.40	2.33
B. subtilis PS5202-8	3.85	3.80	3.13
B. subtilis PS5202-9	2.90	3.80	2.20

ตารางที่ 1 (ต่อ)			
B. subtilis PS5203-1	2.50	2.50	2.03
B. subtilis PS5203-2	2.70	2.63	2.46
B. subtilis PS5203-3	2.56	2.50	2.17
B. subtilis PS5203-4	2.80	3.80	2.96
B. subtilis PS5203-5	3.46	2.43	2.00
B. subtilis PS5203-6	2.56	2.43	2.03
B. subtilis PS5203-7	2.63	2.43	2.26
B. subtilis PS5203-8	2.8	2.46	2.43
control	3.70	2.60	2.80

ตารางที่ 2 แถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบใน *B. subtilis* 35 ไอโซเลท จากการนับการปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) วิเคราะห์โดยวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

		2849	2874	2890	2798	2272	2061	1284	1182	1140	1014	862	660	610	586	271
		OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1	OPR1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NRS01-2	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
NRS02-1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
NRS02-2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
NRS02-3	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
NRS02-4	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
NRS03-1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
NRS03-2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
COS02-1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COS03-1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
COS03-2	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
COS03-3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COS03-4	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
COS03-5	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
AGS02-1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
AGS02-2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
AGS03-1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
PS02-1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PS02-2	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
PS5202-1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5202-2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
PS5202-3	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
PS5202-4	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5202-5	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5202-6	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5202-7	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
PS5202-8	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
PS5202-9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
PS5203-1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5203-2	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5203-3	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
PS5203-4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
PS5203-5	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5203-6	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5203-7	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PS5203-8	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

		2125	1823	1625	1227	1181	1052	941	907	842	736	643	605	562	491	446	399	357
		OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13	OPR13
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
NRS01-2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
NRS02-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
NRS02-2	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NRS02-3	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NRS02-4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NRS03-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
NRS03-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
COS02-1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
COS03-1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COS03-2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
COS03-3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
COS03-4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
COS03-5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AGS02-1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
AGS02-2	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
AGS03-1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
PS02-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
PS02-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PS5202-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PS5202-3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5202-8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PS5202-9	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
PS5203-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5203-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5203-3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PS5203-4	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PS5203-5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5203-6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5203-7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PS5203-8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0

ตารางที่ 2 (ต่อ)

		2894	2542	2169	1555	1486	1371	1395	1346	1155	1046	882	840	789	649	491	445	350	318	277	258
		OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16	OPR16
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
NRS01-2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
NRS02-1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
NRS02-2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
NRS02-3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
NRS02-4	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
NRS03-1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
NRS03-2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
COS02-1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
COS03-1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
COS03-2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
COS03-3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
COS03-4	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
COS03-5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
AGS02-1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AGS02-2	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AGS03-1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
PS02-1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS02-2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
PS5202-1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5202-2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PS5202-3	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5202-4	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5202-5	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5202-6	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5202-7	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
PS5202-8	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
PS5202-9	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
PS5203-1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5203-2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
PS5203-3	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
PS5203-4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1		0	0	0	0	1	0
PS5203-5	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5203-6	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
PS5203-7	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
PS5203-8	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

		2870	2835	2742	2649	2160	1995	1886	1762	1555	1437	1342	1185	1212	1058	667	650	643	607	567
		1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247	1247
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
NRS01-2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
NRS02-1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
NRS02-2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NRS02-3	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NRS02-4	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
NRS03-1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
NRS03-2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
COS02-1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
COS03-1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
COS03-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
COS03-3	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
COS03-4	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
COS03-5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
AGS02-1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
AGS02-2	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
AGS03-1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PS02-1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS02-2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
PS5202-1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5202-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
PS5202-3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
PS5202-4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
PS5202-5	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
PS5202-6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5202-7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
PS5202-8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
PS5202-9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PS5203-1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5203-2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5203-3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PS5203-4	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PS5203-5	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5203-6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
PS5203-7	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
PS5203-8	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายนิพัทธ์ มณีโชติ เกิดวันที่ 12 มิถุนายน พ.ศ. 2514 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2537 และสำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาการประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร คณะอุสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2542 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อ พ.ศ. 2541