

จีโนมและการแสดงออกของยีน nonribosomal peptide synthetase  
ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021  
GENOME AND EXPRESSION OF NONRIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE  
GENES IN *Bacillus* sp. 1021



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2565  
KMITL-2022-SC-M-020-068

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENOME AND EXPRESSION OF NONRIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE  
GENES IN *Bacillus* sp. 1021



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2022  
KMITL-2022-SC-M-020-068

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2022**

**SCHOOL OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	จีโนมและการแสดงออกของยีน nonribosomal peptide synthetase ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิริญญา นวงษ์
รหัสประจำตัว	63605052
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

### บทคัดย่อ

โรคใบไหม้ในข้าว (Rice Blast Disease) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และส่งผลให้ข้าวที่เป็นพืชทางด้านเศรษฐกิจเกิดความเสียหายทางด้านผลผลิต การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Bacillus* sp. 1021 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ได้สูง และได้พบลำดับเบสของยีนในกลุ่ม non-ribosomal peptides synthetase (NRPS) ได้แก่ ยีน *srfAA*, *fenC* และ *dhbE* การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae*, *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum fructicola* ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB), Nutrient broth (NB) และ Mineral salt medium (MSM) ศึกษาลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS ที่สังเคราะห์สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ด้วยวิธี Reverse-transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae*, *F. oxysporum* และ *C. fructicola* และสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* และ *C. fructicola* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีฤทธิ์ยับยั้งเส้นใยและสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM และน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ต่ำที่สุด วิเคราะห์การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ลำดับเบสของจีโนมในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ที่มีความยาว 3,753,774 คู่เบส ค่า GC content เท่ากับ 46.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ค่า Average nucleotide identity (ANI) และ ค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> เท่ากับ 99.1 เปอร์เซ็นต์ และ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีสายสัมพันธ์จากการทำ phylogenomic tree ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> ค้นหากลุ่มยีน NRPS ในลำดับเบสของจีโนม พบยีน

*fenC*, *dhbE* และ *srfAA* วัตรระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีระดับการแสดงออกของยีน *fenC* สูงที่สุด จึงสรุปได้ว่ายีน *fenC* ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *comA* และ *spo0A* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนสามารถทำนายความเป็นไปได้ของสารออกฤทธิ์ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในเบื้องต้นได้

**คำสำคัญ:** การแสดงออกของยีน จีโนม ยีน *fenC* สกุล *Bacillus* และ nonribosomal peptides synthetase



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Genome and expression of nonribosomal peptide synthetase genes in <i>Bacillus</i> sp. 1021
Student Name	Ms. Warinya Nuwong
Student ID	63605052
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2022
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr.Chokchai Kittiwongwattana

### Abstract

*Pyricularia oryzae* is the cause of rice blast disease which greatly damages rice production. A Previous study found *Bacillus* sp. 1021 had highly inhibition efficiency against *P. oryzae*. Partial gene sequences of non-ribosomal peptides synthetases (NRPSs) *srfAA*, *fenC* and *dhbE* were detected. The objective of this study was to examine the inhibition mechanism of strain 1021 against *P. oryzae*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum fructicola*. Cell-free supernatants (CF) obtained from the bacterial culture in potato dextrose broth (PDB), nutrient broth (NB) and mineral salt medium (MSM) were tested against the fungi. The genome of strain 1021 was sequenced and used for gene identification. NRPS gene expression was analyzed by reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR). The result showed that CF from PDB medium had high inhibition efficiency against mycelia of the fungi. It inhibited spore germination of *C. fructicola* but not *F. oxysporum*. Strain 1021 genome was approximately 3.7 Mb long. The G+C content was 46.4%. The analysis by average nucleotide identity (ANI) and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) indicated a close relationship between strain 1021 and *Bacillus siamensis* 13613<sup>T</sup> at 99.1% and 92.3%, respectively. The phylogenomic tree also showed that both strains were closely related. *srfAA*, *fenC* and *dhbE* were identified in strain 1021 genome. *fenC*, which were controlled by *comA* and *spo0A*, was highly expressed in PDB culture. This suggested *fenC* was likely involved in the antagonistic activity of strain 1021 against the

fungi. This study demonstrated the possibility of gene expression analysis as a tool for elucidating the mechanism of antagonistic activities.

**Keywords:** expression gene, genome, *fenC*, *Bacillus* and nonribosomal peptides synthetase



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำปรึกษา แนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ที่ตีมาโดยตลอด รวมถึงตรวจแก้ไขภาษาและส่วนที่บกพร่อง การค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์และเรียบร้อย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ และ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย ที่ให้คำแนะนำการดำเนินการ ให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และพิจารณาวิทยานิพนธ์ให้เป็นไปอย่างสมบูรณ์แบบและเรียบร้อย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ที่ให้ข้อมูล และตัวอย่างของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ที่ใช้ทดสอบในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจ ทำให้วิทยานิพนธ์ลุล่วงไปด้วยดี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จเรียบร้อยได้ด้วยความสำเร็จ ความอนุเคราะห์ และน้ำใจจากบุคลากรหลายฝ่าย อาทิเช่น เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และอาจารย์ภาควิชาทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมืออย่างถูกต้อง

สุดท้ายนี้หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจงานวิจัยด้านการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคพืช นับเป็นความปิติอย่างยิ่งที่ได้ทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขึ้น และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางผู้จัดทำวิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้

นางสาววิญญา นุงษ์

## สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ก
Abstract .....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูป.....	ฌ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>11</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	11
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	12
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	12
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	12
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>13</b>
2.1 แบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> .....	13
2.1.1 <i>Bacillus</i> sp. 1021.....	13
2.2 การควบคุมโรคพืช.....	14
2.2.1 <i>Pyricularia oryzae</i> .....	16
2.2.2 <i>Fusarium</i> sp. ....	17
2.2.3 <i>Colletotrichum</i> sp. ....	18
2.3 Nonribosomal peptide synthetases (NRPSs).....	19
2.4 การแสดงออกของยีน.....	21
2.5 Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR).....	23
2.6 จีโนมของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> .....	26
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>29</b>
3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา.....	29
3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช.....	29
3.1.2 การจัดจำแนกระบุชนิดของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. และ <i>Colletotrichum</i> sp.....	29
3.1.3 การทดสอบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา.....	29
3.2 การวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021 .....	31
3.3 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA.....	32

3.4 การวิเคราะห์ไพโรเมอร์ .....	32
3.5 การวิเคราะห์ยีนอ้างอิง .....	34
3.6 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน .....	34
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....</b>	<b>36</b>
4.1 การจัดจำแนกและระบุชนิดของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. และเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. ....	36
4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ .....	38
4.2 การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021 ด้วยจีโนม .....	44
4.4 คุณภาพของไพโรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน .....	47
4.5 กลุ่มยีนสังเคราะห์ NRPs ในจีโนมของ <i>Bacillus</i> sp. 1021 .....	50
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>55</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	55
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	56
เอกสารอ้างอิง .....	57
ภาคผนวก .....	69
ภาคผนวก ก .....	70
ประวัติผู้เขียน .....	72

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีนอ้างอิงและยีน NRPS.....	34
4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไพร์เมอร์(E) และค่า $r^2$ ของยีนอ้างอิงและยีนควบคุม.....	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 วงจรการบุกรุกของเชื้อรา <i>P. oryzae</i> .....	18
รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาที่โดเมน A กระตุ้นกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น.....	20
รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนด้วยพันธะเปปไทด์ของโดเมน C.....	20
รูปที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะถูกปล่อยโดยโดเมน TE.....	21
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ surfactin iturin และ fengycin.....	22
รูปที่ 2.6 หลักการ RT-qPCR.....	25
รูปที่ 2.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณแสง Fluorescence กับค่าจำนวนรอบของการทำ PCR.....	26
รูปที่ 3.1 การทดสอบการยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021.....	31
รูปที่ 3.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021....	32
รูปที่ 4.1 Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับเบส ITS ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. และเชื้อราในสกุล <i>Colletotrichum</i> sp. ชนิดอื่น .....	37
รูปที่ 4.2 Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับเบส ITS ของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. และเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. ชนิดอื่น .....	38
รูปที่ 4.3 การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา <i>P. oryzae</i> .....	40
รูปที่ 4.4 การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา <i>C. fruticola</i> .....	40
รูปที่ 4.5 การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> .....	41
รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา <i>P. oryzae</i> , <i>C. fruticola</i> และ <i>F. oxysporum</i> ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	42
รูปที่ 4.7 การยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา <i>C. Fruticola</i> .....	43
รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพการยับยั้งสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM.....	44
รูปที่ 4.9 แผนที่จีโนมของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. 1021 .....	46

รูปที่ 4.10 Phylogenomic tree โดยใช้ลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 และแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ชนิดอื่น.....47

รูปที่ 4.11 ค่าความเสถียร (Stability value) ของยีนอ้างอิง 7 ยีนจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder.....50

รูปที่ 4.12 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *fen* กำหนดการสังเคราะห์สาร fengycin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021.....52

รูปที่ 4.13 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *dhb* กำหนดการสังเคราะห์สาร bacillibactin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021.....52

รูปที่ 4.14 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *srf* กำหนดการสังเคราะห์สาร surfactin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021.....52

รูปที่ 4.15 ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายใน *Bacillus* sp. 1021 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM .....53



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การใช้ยาฆ่าเชื้อราเป็นอันตรายต่อมนุษย์และทำให้ดินเกิดการปนเปื้อนส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการควบคุมโรคและยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในพืช งานวิจัยก่อนหน้าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกแบคทีเรียจากต้นข้าว (*Oryza sativa*) ใช้ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าว (Rice Blast Disease) (Apimeteethamrong and Kittiwongwattana, 2019) แต่เมื่อใช้วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา จึงตั้งข้อสงสัยได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะมีส่วนในการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา ในงานวิจัยต่อมาจึงได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ Potato dextrose broth (PDB) โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ได้ข้อสรุปว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนต่อการสังเคราะห์สารยับยั้งเชื้อรา การวิเคราะห์ลำดับเบสความยาวประมาณ 1,400 คู่เบสของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียที่มีลำดับเบสใกล้เคียง คือ *Bacillus siamensis* KCTC13613<sup>T</sup> (Apimeteethamrong and Kittiwongwattana, 2021) การศึกษาในงานวิจัยอื่นๆแสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งเชื้อราคือโรคในพืชของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. คือสารในกลุ่ม Nonribosomal peptides (NRPs) ซึ่งเป็นสารประเภท lipopeptide สังเคราะห์โดย Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) ในงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษากลุ่มของยีน NRPS ในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 พบว่ามียีน *srfAA*, *fenC* และ *dhbF* สามารถยืนยันได้ว่าเป็นกลุ่มของยีน NRPS และสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนจาก *srfAA*, *fenC* และ *dhbF* ที่เป็นส่วนหนึ่งของการสังเคราะห์สาร surfactin, fengycin และ bacillibactin แต่เป็นการตรวจสอบที่ใช้ลำดับเบสของยีนในกลุ่ม NRPS เพียงแค่บางส่วน (Apimeteethamrong and Kittiwongwattana, 2021) งานวิทยานิพนธ์นี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชของน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ Mineral Salt Medium (MSM) ศึกษาจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน ให้แน่ชัดมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสแค่บางส่วนของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยวิธี

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) เพื่อใช้ในการศึกษา ระดับการแสดงออกของยีน NRPS ว่าให้ผลที่แตกต่างกันหรือไม่ หรือสามารถระบุได้ถึงกลไกของยีนในกลุ่ม NRPS ที่มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อราในทางอ้อมได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM
- 2) เพื่อศึกษาลำดับเบสจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021
- 3) เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM โดยเทคนิค RT-qPCR

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae*, *F. oxysporum* และ *C. fructicola* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ทดสอบโดยใช้วิธีการ Agar well และวิเคราะห์หาปริมาณอ้างอิงที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM เพื่อใช้วัดค่าการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS ในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยวิธี RT-qPCR

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจีโนมทำให้ทราบถึงตำแหน่งและหน้าที่ของยีน รวมทั้งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 สามารถคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่มีค่าการแสดงออกที่คงที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถวัดระดับการแสดงออกของกลุ่มยีน NRPS ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 โดยใช้วิธี RT-qPCR ได้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แบคทีเรียสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีความหลากหลายของแหล่งที่พบ ตัวอย่างเช่น พบในอากาศ (Frankland and Frankland, 1887) ในดิน (Nagel and Andreesen, 1991) ในกากตะกอนน้ำเสีย (Demharther and Hensel, 2007) รวมทั้งพบได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น ปูเค็ม (Sumpavapol et al., 2010) และอื่นๆ แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างลักษณะเป็นแท่งสามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ ในบางชนิดของสกุล *Bacillus* มีความสามารถเป็น Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างเอนโดสปอร์ได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดสารอาหาร โดยเอนโดสปอร์ที่สร้างขึ้นสามารถทนความร้อน ความแห้งแล้ง รังสี และยาปฏิชีวนะ (Christie and Setlow, 2020) ซึ่งเป็นคุณสมบัติในการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ถูกใช้ในทางการแพทย์ เกษตรกรรม การเกษตร และอุตสาหกรรม มีความสามารถในการผลิตเปปไทด์ที่เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic peptides) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้ โรคที่เกิดในมะเขือเทศ เช่น โรคเหี่ยวสาเหตุมาจากเชื้อรา *Verticillium dahliae* ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. C2 (Dhouib et al., 2019) และโรคน้ำในผลมะเขือเทศสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* V26 (Fekiab et al., 2016) โรคแอนแทรกโนสในพริกที่เกิดจากเชื้อราได้หลายสายพันธุ์เช่น เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 ซึ่งถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* J1 (Ashwini and Srividya, 2014) และ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. M10 ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Srihong et al., 2018) โรคน้ำในแอปเปิ้ลที่สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea* ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* 9407 (Fan et al., 2017) และโรคใบจุดในมะม่วงสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis mangiferae*, *Botryodiplodia theobromae* และ *Macrophoma mangiferae* ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* NCIB 3610 (Okigbo and Osuinde, 2003) ดังนั้นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. นิยมใช้เป็น biocontrol ในการควบคุมโรคพืช (Fira et al., 2018) เป็นทางเลือกที่ไม่เป็นอันตรายกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในด้านการเกษตร

#### 2.1.1 *Bacillus* sp. 1021

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากพื้นผิวของรากของต้นข้าวที่ปลูกในแปลงนาอินทรีย์ มีลักษณะติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน โคโลนีมีสีครีมขาวและพื้นผิวเป็นเมือก

(Aphimeteetamrong, 2017) เมื่อนำไปจัดจำแนกลำดับเบสของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA ในการทำ pairwise alignment ด้วย EzBioCloud พบว่าจากการใช้ยีน 16S rRNA มีค่าความคล้ายคลึงกันกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* KCTC13613<sup>T</sup> เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และทำ multiple alignment มาใช้สร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA7 เพื่อดูความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 กับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกัน พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* KCTC13613<sup>T</sup>, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7<sup>T</sup> และ *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup> ที่มีค่าน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ (Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2021) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ที่ก่อโรคในข้าว (Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2019) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการสังเคราะห์สารในกลุ่ม NRP ที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ (Felnagle et al., 2011) โดยวิเคราะห์การมีอยู่ของกลุ่มยีน NRPS ในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 จากการใช้ลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะพบกลุ่มของยีน NRPS ของแบคทีเรีย *B. siamensis* SCSIO 05746, *B. amyloliquefaciens* DSM7<sup>T</sup> และ *B. velezensis* FZB42 ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล วิเคราะห์หากกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร surfactin (*srfAA*), fengycin (*fenC*) และ bacillibactin (*dhbF*) ด้วยโปรแกรม antiSMASH พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันของยีนที่สร้างสาร surfactin, fengycin และ bacillibactin ในจีโนมของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดสูงถึง 82 – 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในกลุ่ม NRPS ในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยวิธีการทำ PCR พบว่ามียีน *srfAA*, *fenC* และ *dhbF* ที่มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับของยีน NRPS จากการใช้ลำดับเบสของกลุ่มยีน NRPS วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastx พบว่าลำดับเบสของยีน *srfAA*, *fenC* และ *dhbF* ที่พบใน *Bacillus* sp. 1021 มีค่าความคล้ายคลึงกันกับลำดับเบสของกลุ่มยีน NRPS ที่พบใน *B. siamensis* อยู่ที่ 98.40 เปอร์เซ็นต์, 100 เปอร์เซ็นต์ และ 98.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2021) จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในกลุ่ม NRPS ในงานวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างสารในกลุ่ม NRPs ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค

## 2.2 การควบคุมโรคพืช

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มักใช้เป็น biocontrol ในการควบคุมโรคพืชซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสามารถป้องกันไม่ให้พืชเกิดโรคได้ แต่จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคพืชน้อยกว่าการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหรือสารกำจัดเชื้อราซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายแต่มีความอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม พืช และ

มนุษย์ และมักจะมีสารเคมีตกค้างในดินสูง การเลือกใช้จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่สังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาใช้ในการควบคุมเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเรียกว่า biocontrol เป็นการนำจุลินทรีย์มายับยั้งหรือเข้าทำลายเชื้อที่ก่อโรคในพืช ไม่ให้พืชเกิดโรค โดยกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ (Köhl et al., 2019) ได้แก่ กลไกการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในทางตรง เช่น Hyperparasitism เป็นความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดโดยที่สิ่งมีชีวิตหนึ่งสามารถเจริญเติบโตได้จากการใช้สารอาหารจากสิ่งมีชีวิตหนึ่ง และไม่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้านตาย เรียกว่า ปรสิต ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นปรสิตอยู่ในเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ก่อให้เกิดโรคฝักข้าวไหม้ (Thornton and Gilligan, 1999) และการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ เป็นวิธีที่ใช้ควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด พบได้ในแบคทีเรียหลายสกุล ตัวอย่างในแบคทีเรียสกุล *B. subtilis* สามารถสังเคราะห์สารประเภท lipopeptide เช่น surfactin (Bonmatin et al., 2003) และ *B. amyloliquefaciens* FZB42T สามารถสร้างสารในกลุ่ม NRP ได้แก่ surfactin, bacillomycin และ fengycin (Grosch et al., 2001) กลไกการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในทางอ้อม เช่น การแข่งขันการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็น Biocontrol โดยเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคพืชจะเข้าไปบุกรุกและแย่งสารอาหารจากพืช ทำให้พืชเกิดโรคหรือตาย เช่น การที่ผลไม้ไม่เกิดแผล ในบริเวณนั้นจะเกิดการบุกรุกของเชื้อก่อโรคได้โดยใช้สารอาหารบริเวณส่วนนั้นในการเจริญเติบโต และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยเข้าไปแย่งอาหารกับเชื้อก่อโรค ดังนั้นการแข่งขันการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไม่ก่อโรคสามารถใช้เป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการควบคุมโรค นอกจากนี้แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรค และยังสามารถเพิ่มธาตุอาหารและส่งเสริมการเจริญเติบโตให้พืชได้อีกด้วย (จนาร, 2557) การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชมิได้ทั้งการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. มาควบคุมโรคพืชและผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ เป็นเชื้อราที่ได้รับการศึกษามากที่สุด (Harman, 2000; Harman et al., 2004) และเชื้อราที่พบในดินบางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้เช่น โรครากเน่า แต่ในบางสายพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืช และสามารถใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืช ได้เช่น *Fusarium oxysporum* ควบคุมโรคพืชได้โดยการที่เชื้อราเข้าไปแย่งสารอาหารในดินทำให้ลดการเกิดโรคเน่าในต้นกล้วย และสามารถกระตุ้นความต้านทานของพืชได้ (Nel et al., 2006) การใช้จุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ที่พบในดินสามารถสังเคราะห์สารต้านเชื้อราที่ประกอบด้วย 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid และ pyrrolnitrin [3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) -pyrrole] มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium ultimum* ที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่าในต้นปืทุต (Mavrodi et al., 2011), *Fusarium sambucinum* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าแห้งในมันฝรั่ง (Burkhead et al., 1995) และเชื้อรา *Ralstonia solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคเน่าในมะเขือเทศ (Ligon et al., 2000) และมีงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรีย *B. subtilis* Y-1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงถึง 64.90 เปอร์เซ็นต์ ลดการติดเชื้อ *F. oxysporum* ในผลของแอปเปิ้ลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในต้นกล้าแอปเปิ้ลได้ (Ju et al., 2014) การวิเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิคทางโมเลกุลพบว่าแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช มักจะพบยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในจีโนมของแบคทีเรีย เห็นได้จากการศึกษา *B. siamensis* JFL15 วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธีการ PCR พบว่าในจีโนมของแบคทีเรียมียีน *srfAD* (สังเคราะห์สาร surfactin), *fenB* (สังเคราะห์สาร fengycin), *ituA,C* (สังเคราะห์สาร iturin) และ *bmyD* (สังเคราะห์สาร bacillomycin) เป็นสารประเภท cyclic lipopeptides ที่มีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio* (Xu et al., 2018a) นอกจากนี้สารประเภท cyclic lipopeptides ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและต้านเชื้อแบคทีเรียสามารถพบในแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (Felnagle et al., 2011) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความน่าสนใจใช้เป็น biocontrol ในการควบคุมเชื้อก่อโรคในพืช

### 2.2.1 *Pyricularia oryzae*

สกุล *Pyricularia* ตั้งชื่อตามรูปร่างของ conidia มีลักษณะคล้ายลูกแพร์ สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อราดังนี้ (Saccardo, 1880)

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Subdivision: Pezizomycotina

Class: Sordariomycetes

Subclass: Sordariomycetidae

Order: Magnaporthales

Family: Magnaporthaceae

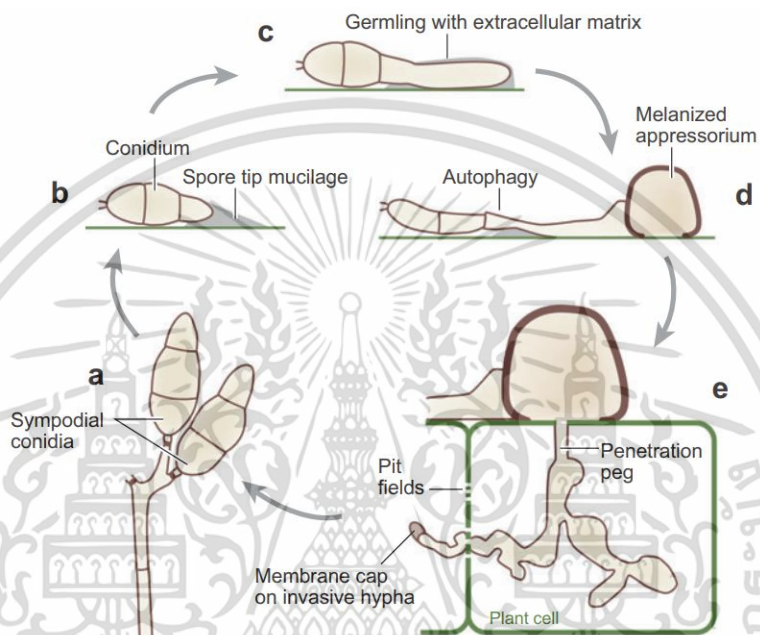
Genus: *Pyricularia*

Species: *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe oryzae*)

ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว ส่วนสปอร์มีรูปร่างไม่แน่นอนเป็น pyriform หรือ obclavate ไม่มีสี บริเวณปลายของสปอร์มีลักษณะแหลม (Ou, 1973) จะมีการบุกรุกของเชื้อรา (รูปที่ 2.1) ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* บริเวณปลายของเส้นใยในอากาศมีส่วนที่เรียกว่า conidiophores ที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ บริเวณส่วนปลายของ conidiophores จะมี conidia เมื่อสปอร์เกิดการหลุดออกมาไปตกที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อเกิดการยึดเกาะบนผิวเนื่องจากส่วนปลายของสปอร์ประกอบไปด้วยสารประกอบในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นส่วนประกอบและไกลโคโปรตีน (Hamer et al., 1988) เกาะเป็นเมือกที่มีลักษณะเหนียว เมื่อเกิดการยึดเกาะสปอร์จะเกิดการงอกเป็นเส้นใย และสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

appressorium ที่ทำหน้าที่เจาะเข้าไปในเนื้อเยื่อของเซลล์ โดยเส้นใยที่เจริญภายในเนื้อเยื่อจะทำให้มีลักษณะเป็นรอยโรคเกิดขึ้น เมื่อเส้นใยผ่านรูที่เรียกว่า pit field เข้าไปในเซลล์ถัดไป บริเวณส่วนของปลายเส้นใยจะมีหน้าที่ในการหลังโปรตีนเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นเชื้อราจะมีการสร้างสปอร์ขึ้นจาก conidiophore และปล่อยสปอร์ทางอากาศ (Ebbole, 2007)



รูปที่ 2.1 วงจรการบุกรุกของเชื้อรา *P. oryzae* (ที่มา: Ebbole, 2007)

## 2.2.2 *Fusarium* sp.

จัดลำดับอนุกรมวิธานดังนี้ (Snyder and Hansen, 1940)

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Nectriaceae

Genus: *Fusarium* sp.

เส้นใยของเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในสภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสม สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่จะพบเชื้อรา *Fusarium* sp. ในดินสามารถผลิตสารพิษได้ (Desjardins and Proctor, 2007) เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cumini* สามารถก่อให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคในพืชทำให้รากและลำต้นเน่า อาการของโรคแรกเริ่มเห็นได้จากใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและร่วงหล่น เกิดจากการติดเชื้อที่บริเวณรากกลุกลามขึ้นไปทำให้ใบและดอกเหี่ยวเฉา (Gajera, 2016) *F. graminearum* สามารถสร้างสารพิษ deoxynivalenol (DON) ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวสาลีและโรคเน่าในข้าวโพด (Breunig and Chilvers, 2021) *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ก่อโรคในมะเขือเทศ ทำให้ผลมะเขือเทศเหี่ยว (Larkin and Fravel, 1998) *F. oxysporum* f. sp. *cepae* เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรครากและโคนเน่าในหัวหอม (Esfahani, 2018) และเชื้อราในสกุล *Fusarium* สามารถเกิดการติดเชื้อในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และธัญพืชเมล็ดเล็ก (Oldenburg et al., 2017) นอกจากนี้สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชและเกิดการปนเปื้อนในผลผลิต ซึ่งอาจทำให้เป็นอันตรายต่อพืช สัตว์ และมนุษย์ได้ (Abbas et al., 2013)

### 2.2.3 *Colletotrichum* sp.

จัดหมวดหมู่ตามลำดับอนุกรมวิธานดังนี้ (Sutton, 1992)

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Class: Sordariomycetes

Subclass: Hypocreomycetidae

Family: Glomerellaceae

Genus: *Colletotrichum* sp.

ลักษณะของสปอร์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา เชื้อราในสกุลนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชทำให้พืชได้รับความเสียหายและเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส อาการของโรคแอนแทรกโนสในใบจะมีลักษณะเป็นจุดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม และในผลจะทำให้เกิดอาการเน่า เชื้อรา *Colletotrichum capsica* สปอร์มีลักษณะเป็นรูปคล้ายพระจันทร์เสี้ยวก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพริก (Rahman et al., 2011) *C. gloeosporioides* สปอร์มีลักษณะเป็นรูปท่อนสั้นปลายกลมมน ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ (Dissanayake et al., 2019) และในมะม่วง (Kamle and Kumar, 2016) *Colletotrichum fructicola* มีลักษณะสปอร์เป็นรูปท่อนสั้นปลายกลมมน ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพริก (Sharma and Shenoy, 2013)

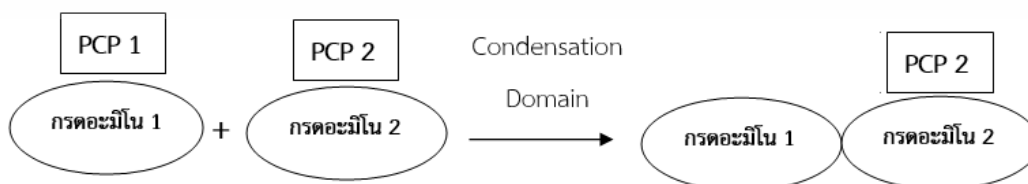
## 2.3 Nonribosomal peptide synthetases (NRPSs)

Nonribosomal peptides (NRPs) คือ สารทุติยภูมิที่เป็นคุณสมบัติหลักที่ทำให้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการใช้เป็น biocontrol มีโครงสร้างเป็นวงหรือสายยาว มีความสำคัญทางด้านชีววิทยาสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตยาปฏิชีวนะ สารพิษ รวมทั้งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Caboche et al., 2008) สารในกลุ่ม NRPs สังเคราะห์โดย Nonribosomal peptides synthetases (NRPSs) (Stein, 2005; Finking and Marahiel, 2004) มีลักษณะเป็นโมดูลที่มีการทำงานแยกกัน แต่ละโมดูลประกอบไปด้วย 3 โดเมน คือ Adenylation (A), Thiolation (T) หรือ Peptidyl Carrier Protein (PCP) และ Condensation (C) ในการทำงานของโมดูลแรกประกอบไปด้วย โดเมน A และโดเมน PCP เริ่มต้นที่โดเมน A จะกระตุ้นกรดอะมิโนอิสระที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ให้เป็นสารตัวกลาง aminoacyl-AMP ด้วย ATP ซึ่งสารตัวกลางที่ได้จะเข้าไปจับกับ 4'-phosphopantetheine (PPT) ที่ติดอยู่กับโดเมน PCP (รูปที่ 2.2)



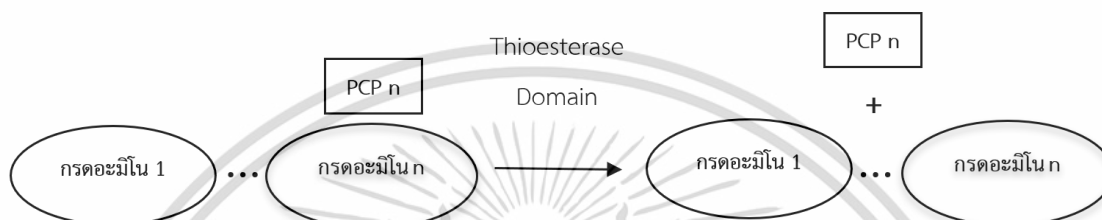
รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาที่โดเมน A กระตุ้นกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น

ต่อมาการทำงานของโมดูลตัวที่สอง ประกอบไปด้วยโดเมน A, โดเมน PCP และโดเมน C โดยจะมีลักษณะการทำงานที่คล้ายกับโมดูลตัวแรก ที่กระตุ้นกรดอะมิโนเพื่อให้ได้สารตัวกลาง และมาจับอยู่ที่โดเมน PCP จากนั้นโดเมน C จะเชื่อมระหว่างกรดอะมิโนที่ได้จากโมดูลตัวที่หนึ่ง และโมดูลตัวที่สองด้วยพันธะเปปไทด์ ผลที่ได้จากการทำงานจะอยู่ในรูปของกรดอะมิโน 2 ตัวเชื่อมอยู่กับโดเมน PCP (รูปที่ 2.3) การทำงานของโมดูลตัวถัดไปจะทำงานในลักษณะที่เหมือนกันกับโมดูลตัวที่สองอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนด้วยพันธะเปปไทด์ของโดเมน C

จนถึงโมดูลตัวสุดท้ายที่ประกอบไปด้วย โดเมน A, โดเมน PCP, โดเมน C และเปปไทด์สายยาวที่เชื่อมอยู่กับโดเมน PCP เมื่อได้กรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นเปปไทด์สายยาว โดเมน Thioesterase (TE) จะเข้าไปเชื่อมต่อกับโดเมน PCP ในลักษณะเช่นเดียวกันกับโมดูลตัวที่สอง จะเกิดการแยกระหว่างสายเปปไทด์และโดเมน PCP ออกจากกัน (รูปที่ 2.4) ด้วยการ hydrolyses ได้เปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง หรือ การ cyclisation ที่มีลักษณะเป็นวง (Miller and Gulick., 2016)

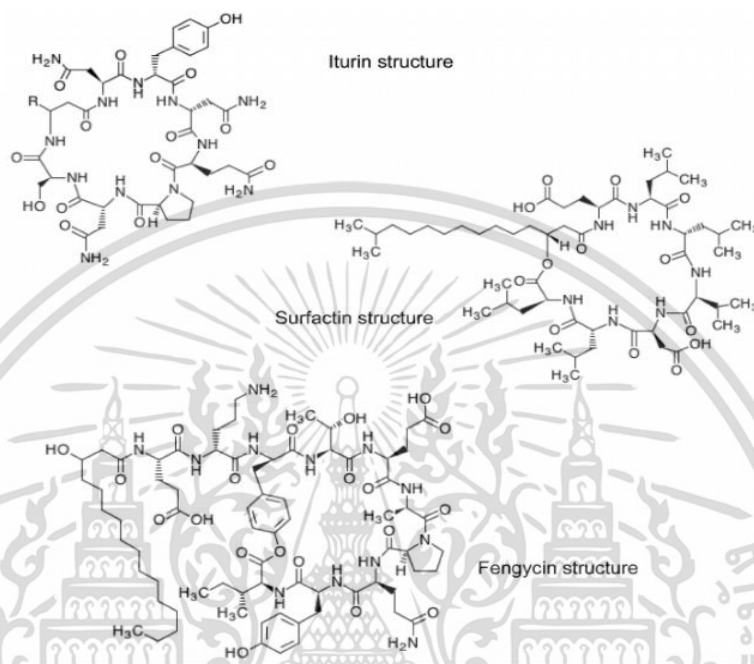


รูปที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะถูกปล่อยโดยโดเมน TE

ประเภทของสาร NRPs ที่มีการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโนและกรดไขมันเป็นสารประเภท lipopeptide (Ongena and Jacques, 2005) ตัวอย่างเช่น surfactin, iturin และ fengycin จะมีความยาวของสาย ชนิดของกรดไขมัน และชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน surfactin เป็น heptapeptide เชื่อมต่อกับกรดไขมัน  $\beta$ -hydroxyl (C12 - C16) fengycin เป็น decapeptides เชื่อมต่อกับกรดไขมัน  $\beta$ -hydroxyl (C 14 - C18) และ bacillomycin D เป็นสารอยู่ในกลุ่ม iturin เชื่อมต่อกับกรดไขมัน  $\beta$ -hydroxyl (C14 - C17) (รูปที่ 2.5) ดังนั้นสาร NRPs 3 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช หรือทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคได้ (Chowdhury et al., 2015)

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ส่วนใหญ่ผลิตสารประเภท lipopeptide ซึ่งสาร surfactin พบในกลุ่มแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Bacillus coagulans* (Huszczka and Burczyk, 2006) *Bacillus pumilus* และ *Bacillus licheniformis* (Peypoux et al., 1999) สาร Iturin เป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในแบคทีเรียได้ เช่น *B. subtilis*. (Bonmatin et al., 2003) และ *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsis et al., 2004) และสาร Fengycin ก็เป็นสารที่พบมากในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* (Jacques et al., 1999) และ *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsis et al., 2004) ใน *B. amyloliquefaciens* FZB42<sup>T</sup> สามารถสร้างสารในกลุ่ม NRP ได้แก่ surfactin, bacillomycin และ fengycin ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *F. oxysporum* ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ (Grosch et al., 2001) และกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรค (Induced Systemic Resistance) (Farace et al., 2015; Fira et al., 2018) *B. subtilis* DFH08 สามารถสร้างสาร fengycin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ

รา *F. graminearum* ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวสาลี (Ramarathnam et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่ม NRPs มักจะพบในแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ surfactin iturin และ fengycin (ที่มา: Mongkoltharuk, 2012)

## 2.4 การแสดงออกของยีน

สิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันจะทำให้มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (Lobo, 2008) โดยยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาเรียกว่า housekeeping เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพื้นฐานของเซลล์ มักใช้เป็นยีนควบคุมสำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆ (Wong and Medrano, 2005) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ยีน housekeeping โดยการตรวจสอบและคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทำให้เป็นมาตรฐานในเทคนิค real-time PCR (Dheda et al., 2004) สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการคัดเลือกใช้ยีนอ้างอิงในการวิเคราะห์คือ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ และชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากไม่มียีนอ้างอิงที่สามารถแสดงออกได้อย่างคงที่ในทุกสภาวะและทุกชนิดของแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่มีการแสดงออกที่คงที่ในสภาวะและชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โปรแกรมที่ใช้การวิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสม เช่น โปรแกรม geNorm วิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจากค่า M โดยยีนอ้างอิงที่มีค่าความเสถียรต่ำจะมีค่า M ที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Vandesompele et al., 2002), โปรแกรม NormFinder วิเคราะห์จากค่า  $C_q$  ที่แทนในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจะมีค่าความเสถียรต่ำ (Andersen et al., 2004) และ Bestkeeper วิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า SD ของค่า  $C_q$  ควรมีค่าใกล้เคียง 1 (Michael et al., 2004) ในงานวิจัยที่ศึกษาการคัดเลือกยีนอ้างอิง โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonas brassicacearum* GS20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Broth วิเคราะห์การแสดงออกของยีนอ้างอิง *recA*, *gyrA*, *proC*, *rpoD*, *gmk*, *rho*, *16S*, *ftsZ* และ *secA* ด้วยโปรแกรม GeNorm, NormFinder และ BestKeeper ทดสอบในสภาวะที่แตกต่างกันซึ่งจะพิจารณาจากค่าความเสถียรที่ต่ำจะบ่งบอกได้ว่ายีนมีการแสดงออกที่คงที่ เช่น ในสภาพของช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต โดยการเก็บเซลล์แบคทีเรียในช่วงระยะเวลาที่ 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง พบว่ายีนอ้างอิงที่มีระดับการแสดงออกคงที่มากที่สุดคือยีน *rho*, ในสภาพการของค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.0, 7.0 และ 9.0 พบว่ายีนอ้างอิงที่มีระดับการแสดงออกคงที่ของค่าความเป็นกรด-ด่างคือยีน *ftsZ* และในสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ายีนที่มีระดับการแสดงออกที่คงที่ คือ ยีน *gmk* (Bai et al., 2020) แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้มีระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงแต่ละตัวไม่เท่ากัน และงานวิจัยการคัดเลือกใช้ยีนอ้างอิงในแบคทีเรียที่มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกันระหว่างแบคทีเรีย *B. cereus* และ *B. thuringiensis* (Ehling-Schulz et al., 2019) ด้วยโปรแกรม Normfinder แบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 14579 ยีนอ้างอิงที่เหมาะสม คือ *gatB\_Yqey* มีค่าความเสถียรต่ำอยู่ที่ 0.422 และ *B. thuringiensis* subsp. *Konkukian* 9T-27 ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมคือยีน *rpsU* มีค่าความเสถียรอยู่ที่ 0.323 (Reiter et al., 2011) สรุปว่าแบคทีเรียที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันไม่สามารถใช้ยีนอ้างอิงตัวเดียวกันได้ แสดงให้เห็นว่ายีนอ้างอิงเพียงหนึ่งตัวไม่สามารถแสดงออกได้อย่างคงที่ในทุกๆ สภาวะ และไม่สามารถใช้ยีนอ้างอิงร่วมกันได้ในแบคทีเรียที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน เมื่อได้ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมใช้เป็น normalization วัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) เป็นเทคนิคมีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการตรวจหาปริมาณของการแสดงออกของยีน มีค่าความไวสูง และค่าความเสถียรสูง (Wong and Medrano, 2005) จากนั้นคำนวณค่าระดับการแสดงออกระหว่างค่า  $C_q$  ของยีนเป้าหมายและค่า  $C_q$  ของยีนอ้างอิง จากการเปรียบเทียบค่า  $C_q$  จากสูตร (Schmittgen and Livak, 2008)

$$\text{ค่าการแสดงออกของยีน} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

$$\Delta C_q = \text{ค่า } C_q \text{ ของยีนเป้าหมาย} - \text{ค่า } C_q \text{ ของยีนอ้างอิง}$$

$$\Delta\Delta C_q = \text{ค่า } \Delta C_q \text{ ของกลุ่มทดสอบ} - \text{ค่า } \Delta C_q \text{ ของกลุ่มควบคุม}$$

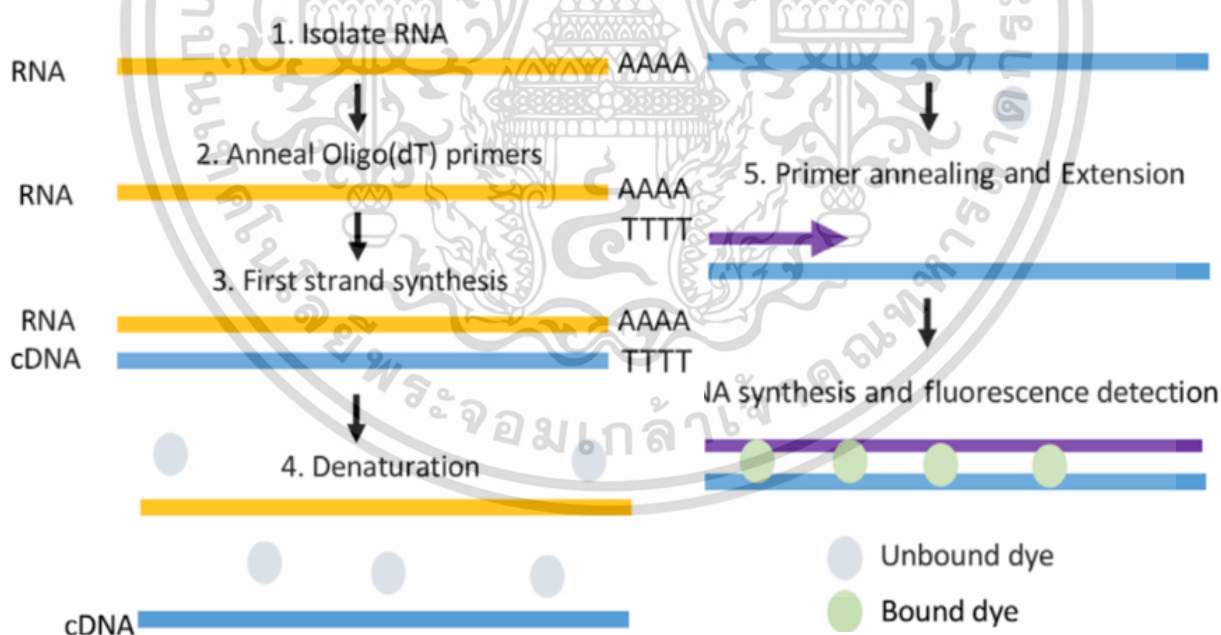
เมื่อยีนมีระดับการแสดงออกที่ไม่เท่ากันทำให้การสังเคราะห์สารที่ได้ออกมาไม่เท่ากัน ในงานวิจัยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยธาตุอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างสาร fengycin และ surfactin พบว่าเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยยูเรียร่วมกับแอมโมเนียและน้ำตาลแมนนิทอลจะมีระดับการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์สาร fengycin ที่สูงมากกว่ายีนที่สังเคราะห์สาร surfactin ส่งผลทำให้มีปริมาณของสาร fengycin สูงถึง 768 มิลลิกรัมต่อลิตร สรุปได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลทำให้มีปริมาณของสาร fengycin ที่สูงขึ้น (Yaseen et al., 2017) นอกจากนี้มียีนที่เป็นตัวควบคุมในการแสดงออกของยีนที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทดสอบโดยการลบยีน *degQ* ในแบคทีเรีย *B. subtilis* NCD-2 พบว่าสาร fengycin ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Botrytis cinerea* ก่อให้เกิดโรคราสีเทาในมะเขือเทศลดลง แสดงให้เห็นว่ายีน *degQ* เป็นตัวควบคุมเชิงบวกของระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างสาร fengycin (Wang et al., 2015) ในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* fmbJ พบว่ายีน *codY* เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์สาร bacillomycin D เมื่อทดสอบโดยการลบยีน *codY* ทำให้มีการผลิตของสาร bacillomycin D เพิ่มขึ้น (Sun et al., 2020) และในการศึกษารูปแบบเดียวกันในแบคทีเรีย *B. subtilis* BSB1 พบว่าการลบยีน *codY* ก็มีผลทำให้มีการผลิตสาร surfactin เพิ่มขึ้น (Dhali et al., 2017) สรุปได้ว่ายีน *codY* เป็นยีนควบคุมเชิงลบระดับการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์สาร surfactin และ bacillomycin D

## 2.5 Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

เทคนิค RT-qPCR เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน ประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา คือ Reverse transcription ที่ใช้เอนไซม์ reverse-transcriptase เปลี่ยน mRNA เป็น complementary DNA (cDNA) และปฏิกริยา PCR ที่เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบ ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความแม่นยำของการใช้ RT-qPCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน คือ ความบริสุทธิ์ของ mRNA ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ mRNA ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร และ 260/230 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรตีน และสารอินทรีย์ (Adams, 2020) เทคนิค RT-qPCR จะใช้หลักการเดียวกันกับเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่เป็นวิธีที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณของ DNA โดยการใช้นิวคลีโอไทด์ DNA polymerase ในการเพิ่มปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

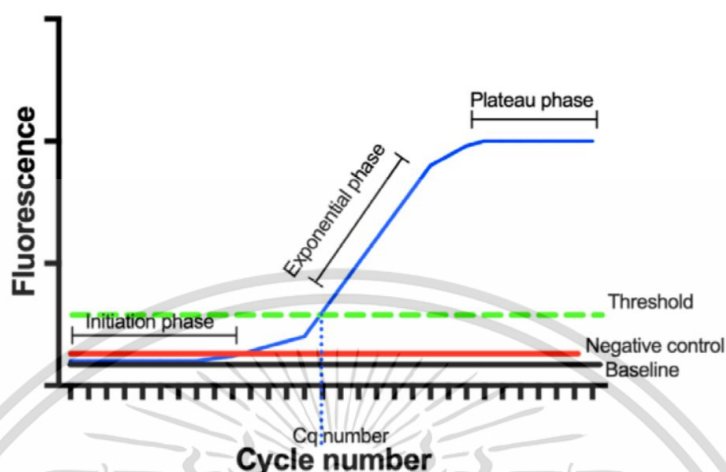
ของสาย DNA ผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ได้แก่ 1. Denaturation ที่ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนให้สายแม่แบบแยกออกจากกัน และ 2. Extension โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase จำลองสาย DNA จากแม่แบบโดยมี primer เป็นตัวตั้งต้น การเพิ่มขึ้นของสาย DNA ที่ได้จะเพิ่มขึ้นในลักษณะทวีคูณ เป็น  $2^n$  คู่ โดย n คือจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา (Pocathikorn, 2013) สาย DNA ที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาในแต่ละรอบจะถูกจับโดยสารเรืองแสง เช่น SYBY Green ซึ่งจะเกิดการเรืองแสง เมื่อถูกกระตุ้นโดยแสงเลเซอร์พลังงานสูง (รูปที่ 2.6) โดยที่ปริมาณของแสงที่ตรวจวัดได้จะขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ PCR ถ้ามีปริมาณ cDNA แม่แบบมากจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก และส่งผลให้ปริมาณแสงที่วัดได้สูงขึ้นตามไปด้วย ในการตรวจวัดปริมาณของแสงในแต่ละรอบระหว่างกระบวนการจนสิ้นสุดกระบวนการจะได้ออกมาเป็นค่า cycle threshold ( $C_t$ ) หรือ cycle quantitative ( $C_q$ ) ซึ่งหมายถึงจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ DNA มากเพียงพอที่สารเรืองแสงจะเข้าจับ และปล่อยแสงออกมาเกินระดับ Threshold ดังนั้นแล้วยิ่งค่า  $C_q$  ที่ได้มีค่าที่ต่ำแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณตัวอย่างในสารตั้งต้นสูง และวิเคราะห์ Melting curve เพื่อใช้ยืนยันความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ด้วยการวิเคราะห์นี้ทำให้ไม่ต้องไปผ่านวิธีการทำ gel electrophoresis (Pocathikorn, 2013)



รูปที่ 2.6 หลักการ RT-qPCR (ที่มา: Adams, 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Amplification curve



รูปที่ 2.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณแสง Fluorescence กับค่าจำนวนรอบของการทำ PCR (ที่มา: Adams, 2020)

สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้ RT-qPCR เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน คือ การใช้ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิง (reference gene) มาทำ normalization กับระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจะต้องมีระดับการแสดงออกที่คงที่ในสภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ ยีนอ้างอิงนี้อาจมีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสภาวะที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงต้องทดสอบหายีนอ้างอิงที่เหมาะสมในแต่ละการทดลอง กลุ่มยีนอ้างอิงที่นิยมนำมาตรวจสอบเพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิง เช่น House-keeping gene ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA replication, transcription หรือ translation เป็นต้น เมื่อได้ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมแล้วสามารถนำไปทำให้เป็นมาตรฐานในการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไปได้ ดังเช่นงานวิจัยหนึ่งที่วิเคราะห์ยีนอ้างอิงทั้งหมด 13 ตัวที่เหมาะสมของพืช *Setaria viridis* ในสภาวะความแตกต่างของเนื้อเยื่อพืช ระยะการเจริญเติบโต สภาวะความแห้งแล้ง และสภาวะที่มีลูมิเนีย พบว่ายีนอ้างอิงร่วม *EXP* กับ *KIN* และยีน *BIND* กับ *SDH* มีความเสถียรในแต่ละสภาวะมากที่สุด สามารถใช้เป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมได้

## 2.6 จีโนมของแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

การจัดจำแนกแบคทีเรียใช้ในการระบุสกุลของแบคทีเรีย มักจะพิจารณาจากลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่างของแบคทีเรีย การติดสีของเซลล์ ความต้องการออกซิเจน และอื่นๆ ซึ่งเป็นลักษณะพื้นฐานของการจัดจำแนกทำให้เห็นถึงความแตกต่างกันของแบคทีเรียในลักษณะที่เรียกว่า พีโนไทป์ แต่ถ้าต้องการที่จะจัดจำแนกถึงในระดับชนิดของแบคทีเรีย การใช้ลักษณะทางพีโนไทป์อาจจะไม่เหมาะสมและไม่เพียงพอต่อการระบุชนิดของแบคทีเรีย จึงต้องจัดจำแนกในลักษณะทางจีโนมได้แก่ การใช้ยีน 16S rRNA เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการระบุชนิดและจัดลำดับความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย ทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของแบคทีเรีย ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลต 1, 2 และ 3 ที่คัดแยกได้จากในดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต 1 มีค่าความคล้ายคลึงกันกับ *B. cereus* ATCC 14579<sup>T</sup> อยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลตที่ 2 มีค่าความคล้ายเท่ากับ 99.9 เปอร์เซ็นต์กับแบคทีเรีย *B. subtilis subsp. inaquosorum* KCTC 13429<sup>T</sup> และไอโซเลตที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus safensis* FO-36b<sup>T</sup> ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ (Ishag et al., 2020) และอีกงานวิจัยแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PB-I ที่คัดแยกได้จากดิน ใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกับ *B. licheniformis* เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ (Ghumro et al., 2012) แสดงให้เห็นว่ายีน 16S rRNA ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ และปริมาณ GC content ก็เป็นตัวบ่งบอกความคล้ายคลึงกันของแบคทีเรีย จากงานวิจัยศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกันในสกุล *Bacillus* จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้ลำดับยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* มีความใกล้ชิดกับ *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* และ *B. cereus* (Li et al., 2016) ซึ่งแบคทีเรียในสกุลเดียวกันจะมีปริมาณ GC content ของจีโนมที่ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีปริมาณ GC content อยู่ในช่วงระหว่าง 32–66 (Tm) เปอร์เซ็นต์ (Logan and De Vos, 2015) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เป็น Type species มีปริมาณ GC content 43.5 เปอร์เซ็นต์ (Piggot, 2009) *B. cereus* มีปริมาณ GC content เท่ากับ 35.5 เปอร์เซ็นต์ (Anderson et al., 2005) *B. amyloliquefaciens* มีปริมาณ GC content เท่ากับ 45.9 เปอร์เซ็นต์ (Chun et al., 2019) *B. velezensis* มีปริมาณ GC content เท่ากับ 46.4 เปอร์เซ็นต์ (Chun et al., 2019) และ *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> มีปริมาณ GC content เท่ากับ 46.3 เปอร์เซ็นต์ (Jeong et al., 2012) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันก็จะมีปริมาณ GC content ที่ใกล้เคียงกัน

การใช้ยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกแบคทีเรียก็มีข้อจำกัดในการใช้จัดจำแนก เนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกันแต่เป็นแบคทีเรียต่างชนิดกัน ดังนั้น

จึงต้องใช้การศึกษา DNA-DNA hybridization (DDH) เป็นการวิเคราะห์การเข้าคู่กัน โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของจีโนมและวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงกันของแบคทีเรีย แบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีค่าความคล้ายคลึงกันมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Wayne et al., 1987) แต่ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าในการจัดจำแนกลำดับเบสของจีโนมโดยใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงจึงใช้วิธีอื่นแทนการวิเคราะห์ค่า DDH ซึ่งข้อเสียที่พบ คือ มีการใช้สารเคมีในการวิเคราะห์เยอะ และเป็นการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการอาจจะเกิดข้อผิดพลาดที่มาจากแต่ละบุคคล ได้แก่ การวิเคราะห์ค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เป็นการวิเคราะห์การเข้าคู่กันระหว่างแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์จากการใช้ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมมาใช้คำนวณค่าความคล้ายคลึงกัน และการวิเคราะห์ค่า Average Nucleotide Identity (ANI) ในการเข้าคู่กันของลำดับเบสในส่วนที่เป็นยีนของจีโนมระหว่างแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ หลักเกณฑ์ในการจำแนกแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (Goris et al., 2007) ตัวอย่างในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA ระหว่าง *Bacillus psychrophilus* และ *Bacillus globisporus* พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันสูงถึง 99.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทางตรงกันข้ามกับงานวิจัยก่อนหน้านี้จัดจำแนกโดยใช้ค่า DDH พบว่ามีค่าที่ต่ำกว่ามาตรฐาน โดยมีค่าน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Fox et al., 1992) สรุปได้ว่าค่าความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA มีค่าที่สูงที่บ่งบอกว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แต่ในทางตรงกันข้ามค่าความคล้ายคลึงกันของ DDH มีค่าที่ต่ำกว่าบ่งบอกว่าเป็นแบคทีเรียต่างชนิดกัน จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ค่า DDH ในการจัดจำแนกแบคทีเรียมีความน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้ยีน 16S rRNA เพราะเป็นการใช้ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนม และการจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus vanillea* ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และค่า DDH แบคทีเรีย *Bacillus* sp. XY18 กับ *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535<sup>T</sup> และ *B. siamensis* PD-A10<sup>T</sup> พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.1 เปอร์เซ็นต์ และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีค่า DDH เท่ากับ 35.7 เปอร์เซ็นต์ และ 41.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ สรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. XY18 ได้ระบุเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ในชื่อ *B. vanillea* (Chen et al., 2015) และงานวิจัยต่อมาได้จัดจำแนกแบคทีเรีย *B. vanillea* เปรียบเทียบกับ *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> โดยใช้ลำดับเบสของจีโนมในการวิเคราะห์ พบว่ามีค่า dDDH เท่ากับ 91.2 เปอร์เซ็นต์ และค่า ANI เท่ากับ 98.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *B. vanillea* เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับ *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> (Dunlap, 2015) แสดงให้เห็นว่าการจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดยใช้ยีน 16S rRNA อาจจะไม่เหมาะสมเพราะว่าเป็นลำดับยีนเพียงแค่บางส่วนของจีโนมเท่านั้น ดังนั้นการใช้ลำดับเบสของจีโนมในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย สามารถบ่งบอกลักษณะความคล้ายคลึงกันได้อย่างชัดเจนในแบคทีเรียที่มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกันได้

จีโนมเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต โดยลำดับเบสของจีโนมใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียจะพิจารณาจาก ค่า dDDH และ ค่า ANI ถึงจะบ่งบอกความคล้ายคลึงกันของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ลำดับเบสของจีโนมในการวิเคราะห์ปริมาณ GC content ได้ ทำให้การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น การศึกษาจีโนมนอกจากจะสามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้แล้วดังที่กล่าวข้างต้น ยังสามารถทราบลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมต่างๆของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็น biocontrol มักจะพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ในจีโนม เช่น สารในกลุ่ม NRPS และสารในกลุ่ม polyketides (PKS) จากงานวิจัยแบคทีเรีย *B. velezensis* B-4 พบว่ามีขนาดจีโนม 3,919,798 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีนที่กำหนดโปรตีน 3,725 ยีน มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม NRPs ได้แก่ bacilysin, bacillibactin, fengycin และ surfactin และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม PKSs ได้แก่ bacillaene, difficidin และ macrolactin สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* และ *F. graminearum* (Zhu et al., 2020) *B. amyloliquefaciens* FZB42<sup>T</sup> มีขนาด 3,918,589 ประกอบไปด้วยยีนที่กำหนดโปรตีน 3,695 ยีน มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่ม NRPs ได้แก่ surfactin, bacillomycin และ fengycin ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *F. oxysporum* ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ (Grosch et al., 2001) และพบยีนที่สร้างสารในกลุ่ม PKSs ได้แก่ bacillaene, difficidin และ macrolactin (Chen et al., 2009) แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ DSM 23117 สามารถสร้างสาร iturin และ fengycin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคในองุ่น (Pretorius et al., 2015) แบคทีเรีย *Bacillus siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> มีขนาดจีโนมเท่ากับ 3,779,696 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีนที่กำหนดโปรตีน 3,620 ยีน ในจำนวนนี้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม polyketides (bacillaene และ difficidin) และสารในกลุ่ม NRPs เช่น surfactin (*srf*), bacillibactin (*dhb*), และ fengycin (*fen*) และแบคทีเรียชนิดเดียวกันในสายพันธุ์ JFL15 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Magnapothe grisea*, *Rhizoctoria solani* ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าว และเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคในมะม่วง (Xu et al., 2018b) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มียีนในกลุ่ม NRPS สอดคล้องกับกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ดังนั้นแล้วในการศึกษาจีโนมจึงช่วยให้เห็นถึงกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียได้มากขึ้น

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา

##### 3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ *Pyricularia oryzae* ที่มาจาก ผศ. ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล., *Fusarium* sp. และ *Colletotrichum* sp. ที่มาจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

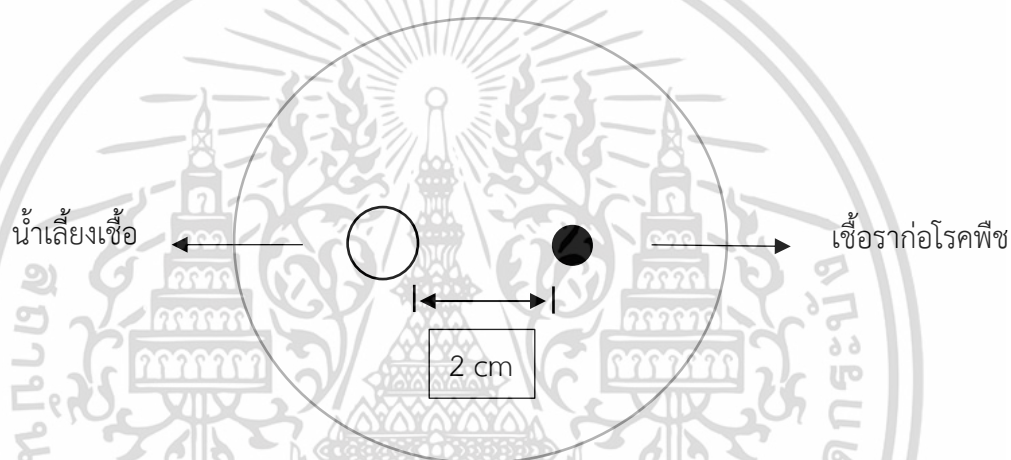
##### 3.1.2 การจัดจำแนกระบุชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Colletotrichum* sp.

นำลำดับเบส internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Colletotrichum* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้มาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบส ITS ของเชื้อราสายพันธุ์อื่นจากฐานข้อมูล GenBank โดยการทำให้ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) จากนั้นสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.26 (Newman et al., 2016) ด้วยวิธี Neighbour-joining และวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มด้วยวิธี Bootstrap โดยทำซ้ำ 1,000 ครั้ง

##### 3.1.3 การทดสอบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) เชื้อเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มสภาวะเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) และเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มสภาวะเขย่า 160 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบ่งเชื้อ 2 มิลลิลิตรใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง เก็บรักษาตะกอนเซลล์โดยแช่ในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการสกัด RNA จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่เหลือปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที กรองด้วยแผ่นกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร เพื่อใช้เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อในการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้หลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตุน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ และใช้หลอดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นในบริเวณที่มีเส้นใยของ *P. oryzae*, *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum fructicola* วางขึ้นรู้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยห่างจากหลุมที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน กลุ่มควบคุมวางขึ้นรู้นเชื้อราเพียงอย่างเดียวไม่มีการใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ ทดลอง 3 ซ้ำต่ออาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งชนิด วัดรัศมีของเชื้อราในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม



รูปที่ 3.1 การทดสอบการยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยของเชื้อราโดยวิธีของ (Mostapha, 2004) ดังแสดงในสมการ

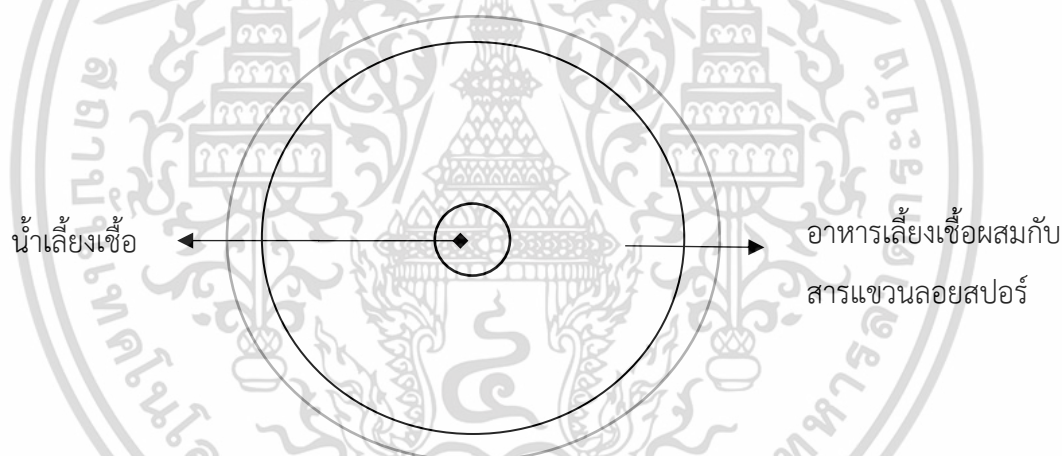
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [1 - (R1 / R2)] \times 100$$

R1 = รัศมีของเส้นใยของเชื้อราในกลุ่มทดสอบ

R2 = รัศมีของเส้นใยของเชื้อราในกลุ่มควบคุม

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งสปอร์ *F. oxysporum* และ *C. fructicola* เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อรา *F. oxysporum* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน และเชื้อรา *C. fructicola* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน เทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิตรลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วชูดบริเวณผิวหน้าเชื้อรา

เบาๆ และใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยของสปอร์ กรองผ่านกระดาษ kimwipe ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วย Hemacytometer เจือจางความเข้มข้นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตรและสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *C. fructicola* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 15 มิลลิลิตรในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งตัวและเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 15 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตรผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในลักษณะเป็นสองชั้น ใช้หลอดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะลงบริเวณตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ (รูปที่ 3.2) ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมบวมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนในสรอบหลุมที่มีการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา กลุ่มควบคุมไม่มีการใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021

### 3.2 การวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021

ใช้ข้อมูลลำดับเบสของ *Bacillus* sp. 1021 (Accession number: GCA\_014534735.1) ลักษณะไฟล์ fasta วิเคราะห์ด้วย RAST server (Aziz et al., 2008) ในการทำ annotation เพื่อระบุหน้าที่และตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น ยีนอ้างอิง และยีนควบคุม จัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ลำดับเบสจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 วิเคราะห์ค่า ANI และค่า dDDH กับ type strains ของ *Bacillus* ชนิดอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม J-species (Richter et al., 2016) และโปรแกรม Type Strain Genome Server (Kolthoff and Göker, 2019) ตามลำดับ และวิเคราะห์หา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มยีน NRPS ในลำดับเบสของจีโนม *Bacillus* sp. 1021 ด้วยโปรแกรม antiSMASH (Medema et al., 2011)

### 3.3 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

นำลำดับเบสของยีนอ้างอิงที่วิเคราะห์ได้จาก RAST server และข้อมูลของกลุ่มยีน NRPS ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรม antiSMASH มาออกแบบไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) เพื่อใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์และค่า  $R^2$  สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของยีนอ้างอิง ยีนควบคุม และยีนเป้าหมายในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM นำตะกอนเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในตอนต้นมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด FavorPrep Tissue Total RNA Purification Mini Kit (Favogen, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุในชุดสกัด จากนั้นนำสารละลาย RNA ที่ได้ไปวิเคราะห์การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, USA) แล้วทำ Reverse transcription (RT) (Bustin et al., 2009) โดยใช้ชุด iScript Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA) ใช้ RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม เพื่อให้ได้สารละลาย cDNA

### 3.4 การวิเคราะห์ไพรเมอร์

หลักการในการออกแบบไพรเมอร์จะต้องออกแบบเป็น 2 สาย ที่ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ forward มีลำดับเบส 5'-3' และ ไพรเมอร์ reverse ที่มีลำดับเบสที่ตรงกันข้ามคือ 3'-5' โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ ควรอยู่ระหว่าง 20-22 คู่เบส, เปอร์เซ็นต์ GC content ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์เพื่อป้องกันการเกิด hairpin loop ภายในสายไพรเมอร์, melting temperature ( $T_m$ ) เป็นอุณหภูมิที่ทำให้สายของ DNA เสียสภาพ (denaturation) เกิดการคลายเกลียวออกจากกันครั้งหนึ่ง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร  $T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4$  ควรมีอยู่ในช่วงระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส และไม่มี secondary structures ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบ จะต้องกับเข้าคู่กับสายต้นแบบ โดยที่ เบส G คู่กับเบส C และ เบส A คู่กับเบส T ในส่วนของบริเวณปลายสายของไพรเมอร์ Forward และต้นสายของไพรเมอร์ Reverse จะต้องมีเบส G และ C อย่างน้อย 1 ตัว และควรมีความยาวของ product อยู่ระหว่าง 60-100 คู่เบส ยีนที่ใช้ในการศึกษานี้ แบ่งออกเป็นยีนอ้างอิง 7 ยีน ได้แก่ *rpsU*, *Udp*, *gatB\_Yqey*, *dnaB*, *ssb*, *gyrA* และ *gyrB* ยีนควบคุม 4 ยีน ได้แก่ *degU*, *codY*, *comA* และ *spo0A* และยีนเป้าหมาย 3 ยีน ได้แก่ *fenC*, *dhbE* และ *srfAA* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม NRPS จากนั้นนำสารละลาย cDNA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ (E) และค่า  $R^2$  โดยนำสารละลาย cDNA 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10

ไมโครลิตร แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำสารละลาย cDNA ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อมารวมกัน และเจือจางโดยใช้ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 1 เท่า, 1/5 เท่า, 1/25 เท่า และ 1/125 เท่า วิเคราะห์ด้วยวิธี RT-qPCR ผลที่ได้จะออกมาเป็นค่า Cq สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลาย cDNA และค่า Cq จากนั้นใช้ค่าความชันจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมาคำนวณค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์โดยใช้สูตร  $E = (10^{-1/\text{ความชัน}} - 1) * 100$  (ตารางที่ 3.1) ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 90-110 เปอร์เซนต์ (Robledo et al., 2014) และค่า R<sup>2</sup> ที่ยอมรับได้จะมีค่ามากกว่า 0.99 หรือเข้าใกล้ 1 (Peirson, 2003) และส่วนที่ 2 ใช้สำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder เพื่อวิเคราะห์หาอินอ้างอิงที่เหมาะสม

**ตารางที่ 3.1** ลำดับเบสไพรเมอร์ของอินอ้างอิง ยีนควบคุม และยีน NRPS

ยีน	หน้าที่ของยีน	ลำดับเบสไพรเมอร์	ขนาดชิ้น DNA ที่ได้ (คู่เบส)
<i>rpsU</i> (อินอ้างอิง)	30S ribosomal protein S21	5'-GCTCTTCGTCGCTTCAAACGC-3'(F) 5'-TTCGCGCTTTCTTGCTTCTTGC-3'(R)	64
<i>Udp</i> (อินอ้างอิง)	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	5'-AGGGAGTCAAAGCAGGAACA-3'(F) 5'-CAGCCTGATCGGTTAAAAGC-3'(R)	77
<i>gatB_Yqey</i> (อินอ้างอิง)	GatB/YqeY domain-containing protein	5'-CGAGCTCGAAAGCGGACATG-3'(F) 5'-GTTAATCACGCTGCCGTCAGC-3'(R)	83
<i>dnaB</i> (อินอ้างอิง)	Replicative DNA helicase (DnaB)	5'-CAGCTTGTCATGCGTATGCT-3'(F) 5'-AGCTTGCCCAATCTTCTTC-3'(R)	68
<i>ssb</i> (อินอ้างอิง)	single-stranded DNA-binding protein	5'-GGATACAACGAAGGAAACAGCG-3'(F) 5'-GATTATCATTTTGGCCTCCGCC-3'(R)	61
<i>gyrA</i> (อินอ้างอิง)	DNA gyrase subunit A	5'-CGATTAACCGGTCTGGAGCG-3'(F) 5'-AGCTCGGCGATAAGCGCAAC-3'(R)	71
<i>gyrB</i> (อินอ้างอิง)	DNA gyrase subunit B	5'-CCGTTCCAAAGAAGTCGTTTC-3'(F) 5'-CTTCAACCGTAATGCCGTCT-3'(R)	72
<i>degU</i> (ยีนควบคุม)	two-component system response regulator DegU	5'-GAGGCAGTCAAAGTGGTAGC-3'(F) 5'-TCGCAAGACGTCGGAATTTCG-3'(R)	88
<i>codY</i> (ยีนควบคุม)	GTP-sensing pleiotropic transcriptional regulator CodY	5'-GGGCTTAACGACGATTGTGC-3'(F) 5'-CAAATTGGTCCTGCAGACGG-3'(R)	83
<i>comA</i> (ยีนควบคุม)	response regulator transcription factor	5'-GGTAACTCCGAGAGAGCGC-3'(F) 5'-AGCGCATCGGCGATTTCTCG-3'(R)	76

ยีน	หน้าที่ของยีน	ลำดับเบสไพรเมอร์	ขนาดชิ้น DNA ที่ได้ (คู่เบส)
<i>spo0A</i> (ยีนควบคุม)	sporulation transcription factor Spo0A	5'- ACCGCAAGCCGTGTAGAACG-3' (F) 5'- TTTCCCCTGCTCCAAGCGAC -3'(R)	62
<i>fenC</i> (ยีนเป้าหมาย)	Fengycin	5'-GGTGCCGTTACAGGACATCT-3' (F) 5'-CTTCATACGGGCTCTCTTCG-3' (R)	88
<i>dhbE</i> (ยีนเป้าหมาย)	Bacillibactin	5'-GAGCAGCCTGCATAGAGAGC-3' (F) 5'-CTCGGAATCAGCTTGGACAG-3' (R)	103
<i>srfAA</i> (ยีนเป้าหมาย)	Surfactin	5'-TAGGTCATGTTTCGCAAGCAG-3' (F) 5'-ATCGGATGCCTGCTCATATC-3' (R)	69

### 3.5 การวิเคราะห์ยีนอ้างอิง

นำสารละลาย cDNA ของตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM มาวิเคราะห์กับยีนอ้างอิงทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ *rpsU*, *Udp*, *gatB*, *Yqey*, *dnaB*, *ssb*, *gyrA* และ *gyrB* ด้วยวิธี RT-qPCR จะได้ค่า Cq ของยีนอ้างอิงในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปวิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Normfinder (Andersen, 2004) หลักการในการวิเคราะห์ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่าความเสถียรการแสดงออกของยีน ซึ่งยีนอ้างอิงที่มีค่าระดับความเสถียรที่ต่ำ ยีนจะมีระดับการแสดงออกที่คงที่ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ระดับแสดงออกของยีนเป้าหมาย

### 3.6 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการ RT-qPCR ใช้ชุด Luna Universal qPCR (New England Biolabs, USA) ปริมาตรรวมที่ใช้ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ cDNA เจือจางความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร น้ำยาสีย้อมเรืองแสง Luna Universal qPCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ Reverse ของยีนอ้างอิง ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และน้ำ Nuclease-free ปริมาตร 7 ไมโครลิตร รวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ RT-qPCR คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และทำ Melt curve เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียส จนถึง 60 องศาเซลเซียส เพื่อดูความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ เมื่อได้ค่า Cq ของยีนเป้าหมายและค่า Cq ของยีนอ้างอิงที่เหมาะสมข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดแล้ว จากนั้น

คำนวณค่าระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยใช้ระดับการแสดงออกของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นกลุ่มควบคุม โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าการแสดงออกของยีน} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

$$\Delta Cq = \text{ค่า } Cq \text{ ของยีนเป้าหมาย} - \text{ค่า } Cq \text{ ของยีนอ้างอิง}$$

$$\Delta\Delta Cq = \text{ค่า } \Delta Cq \text{ ของกลุ่มทดสอบ} - \text{ค่า } \Delta Cq \text{ ของกลุ่มควบคุม}$$



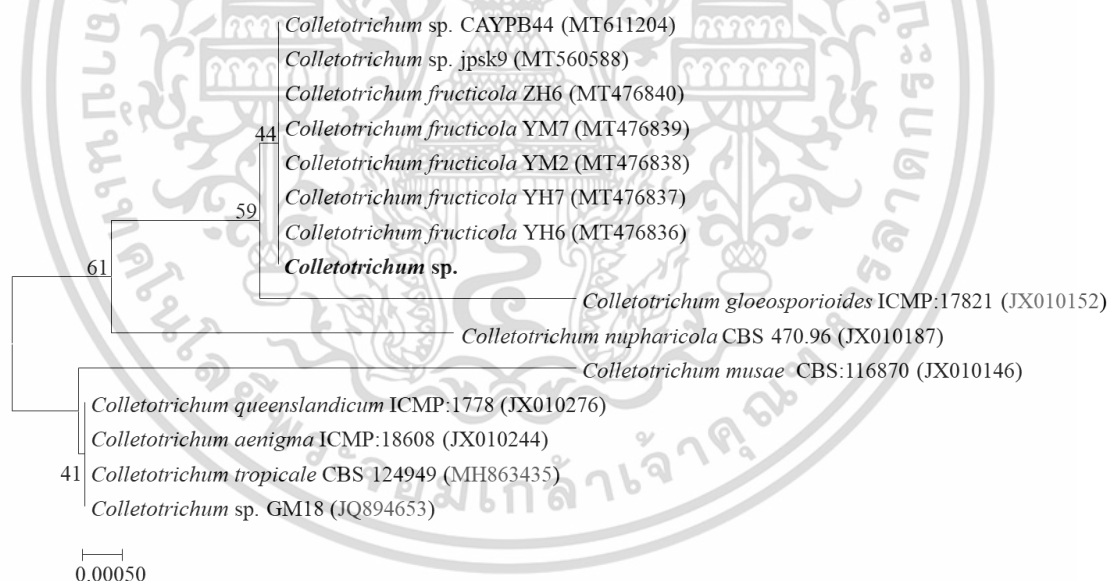
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

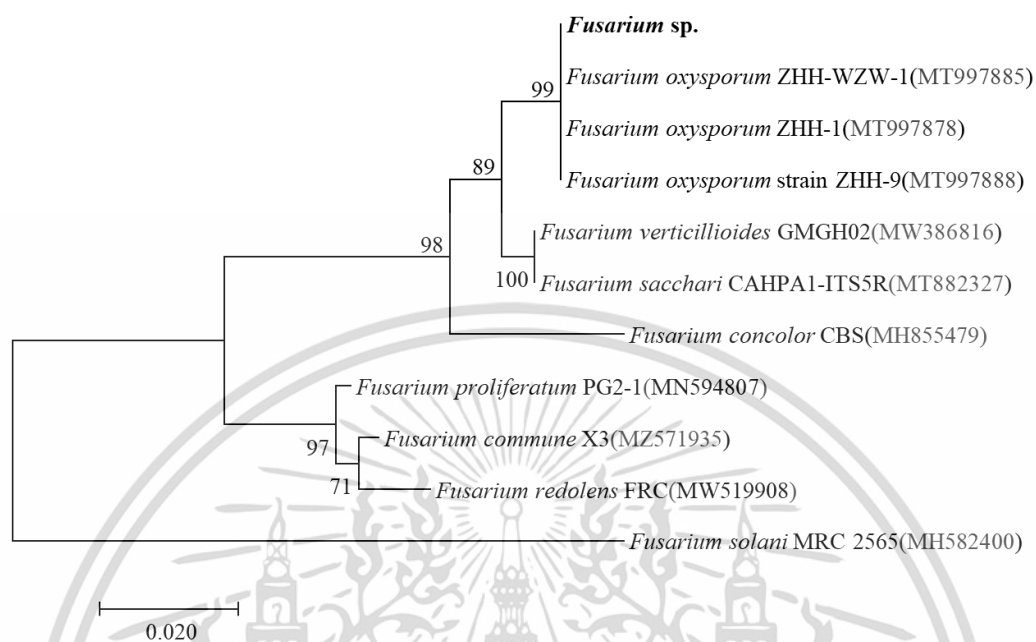
### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การจัดจำแนกและระบุชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp.

จัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลลำดับเบส Internal Transcribed Spacer (ITS) ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. มาวิเคราะห์ลำดับเบส ITS ที่ใกล้เคียงกัน พบว่าลำดับเบสดังกล่าวของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของเชื้อรา *Colletotrichum fructicola* CAYPB44 และ *Fusarium oxysporum* ZHH-1 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันจากการทำ phylogenetic tree พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. fructicola* (รูปที่ 4.1) และเชื้อรา *Fusarium* sp. มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับ *F. oxysporum* (รูปที่ 4.2) สรุปได้ว่าเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบของการศึกษานี้คือ เชื้อรา *C. fructicola* และ *F. oxysporum*



**รูปที่ 4.1** Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับเบส ITS ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* sp. ชนิดอื่นที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี neighbour-joining เส้นบาร์แทนระยะเท่ากับ 0.00050 ต่อตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์



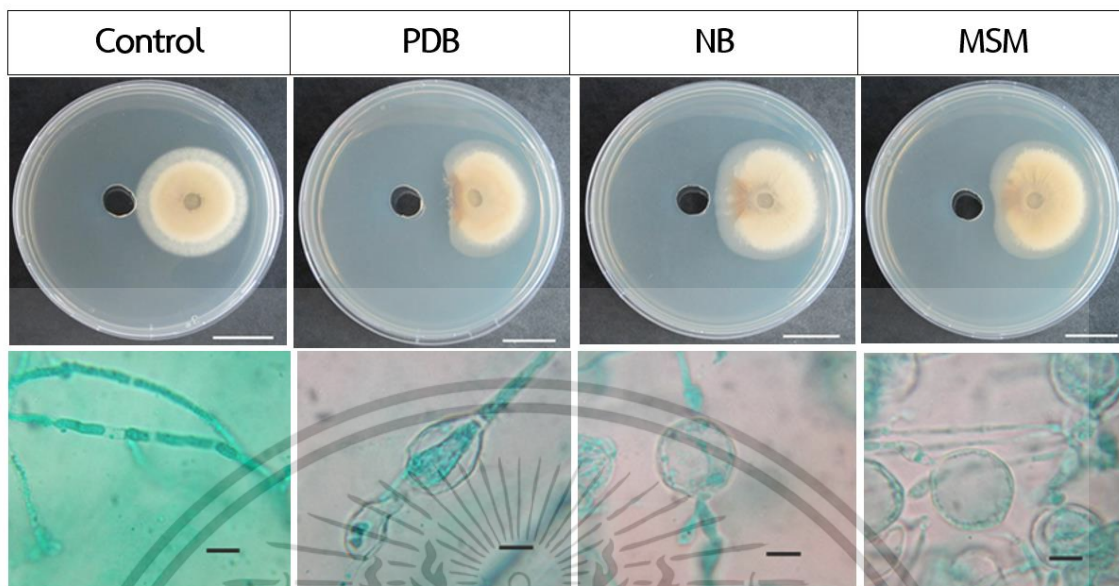
**รูปที่ 4.2** Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับเบส ITS ของเชื้อรา *Fusarium* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. ชนิดอื่นที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันด้วยวิธี neighbour-joining เส้นบาร์แทนระยะเท่ากับ 0.020 ต่อตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบนี้ทั้ง 3 ชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้ อาทิเช่น เชื้อรา *Pyricularia oryzae* ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวสาลี (Perelló et al., 2015) พบรอยของโรคได้ที่บริเวณใบ มีลักษณะอาการเป็นรอยไหม้รูปวงรี ขอบของโรคจะมีสีเข้ม และตรงกลางรอยแผลเป็นสีเทา เชื้อรา *F. oxysporum* ส่วนใหญ่เชื้อราในสายพันธุ์นี้ก่อให้เกิดโรคเน่า อาการเน่าของรากและโคนในหัวหอมที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Esfahani, 2018) และอาการเน่าของมะเขือเทศเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Larkin and Fravel, 1998) และเชื้อราส่วนใหญ่ในสกุล *Colletotrichum* sp. ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส อาการของโรคมักมีลักษณะเป็นจุดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มสามารถเกิดโรคได้ในส่วนของใบและผล โรคแอนแทรคโนสในมะละกอเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Dissanayake et al., 2019) ก่อโรคในพริกเกิดจากเชื้อรา *C. fructicola* (Sharma and Shenoy, 2013) ในส่วนของผลการจัดจำแนกของเชื้อราในการศึกษานี้จัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของ ITS คือบริเวณที่เป็นช่องว่างระหว่างเบสที่เข้ารหัสของยีน 26S หรือ 28S กับยีน 18S ITS เป็นลำดับเบสที่มีความจำเพาะเจาะจงใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา (Badotti et al.,

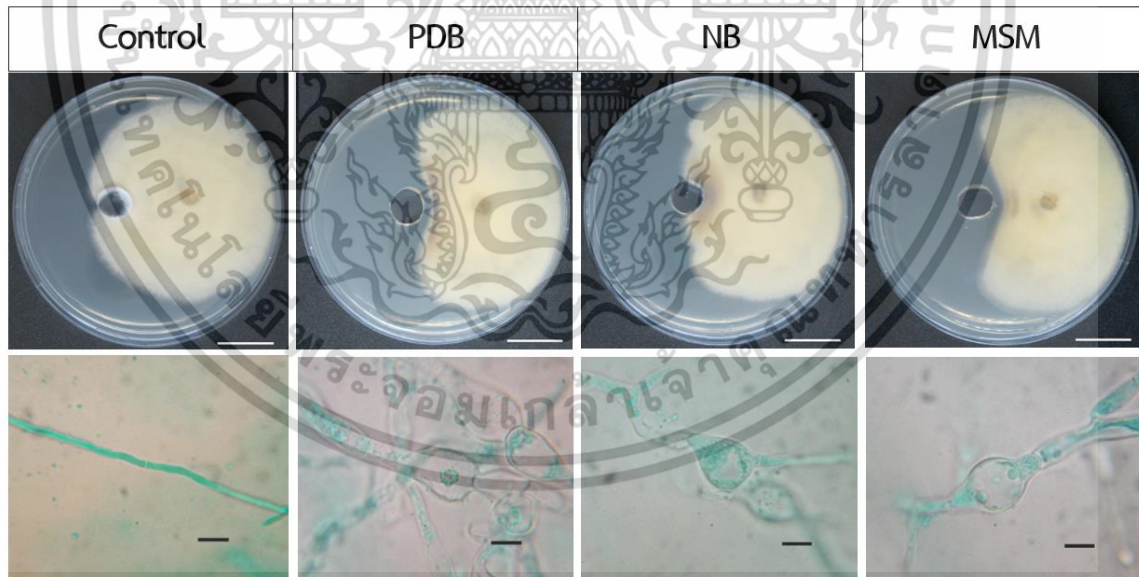
2017) เนื่องจากการระบุชนิดเชื้อราโดยใช้สัญญาณวิทยาซึ่งเป็นวิธีที่ระบุชนิดได้ยากสำหรับเชื้อราบางชนิด เช่น เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ (Raja et al., 2017) จึงนิยมใช้ลำดับเบส ITS ในการจัดจำแนกเชื้อรา ดังนั้นในการศึกษานี้ใช้ลำดับเบสของ ITS ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

#### 4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sp.* 1021 ซึ่งเป็นแบคทีเรียจากงานวิจัยก่อนหน้าจากผิวรากของต้นข้าว (Apimeteethamrong and Kittiwongwattana, 2019) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เท่ากับ  $9.5 \pm 0.04$  รองลงมาคือแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เท่ากับ  $3.1 \pm 0.03$  และ MSM เท่ากับ  $1.7 \pm 0.20$  เห็นได้ว่าแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี ในการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ของแบคทีเรีย *Bacillus sp.* 1021 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae*, *C. fructicola* และ *F. oxysporum* โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบร่วมกับเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค Agar well diffusion ที่บ่มเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเกิดบริเวณยับยั้งในจานทดลอง โดยไม่พบการเจริญของเชื้อราในบริเวณดังกล่าวเมื่อเทียบกับจานควบคุม (รูปที่ 4.3-4.5) เมื่อนำเส้นใยเชื้อราในจานทดลองมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับเส้นใยของเชื้อราในจานควบคุม (รูปที่ 4.3-4.5)

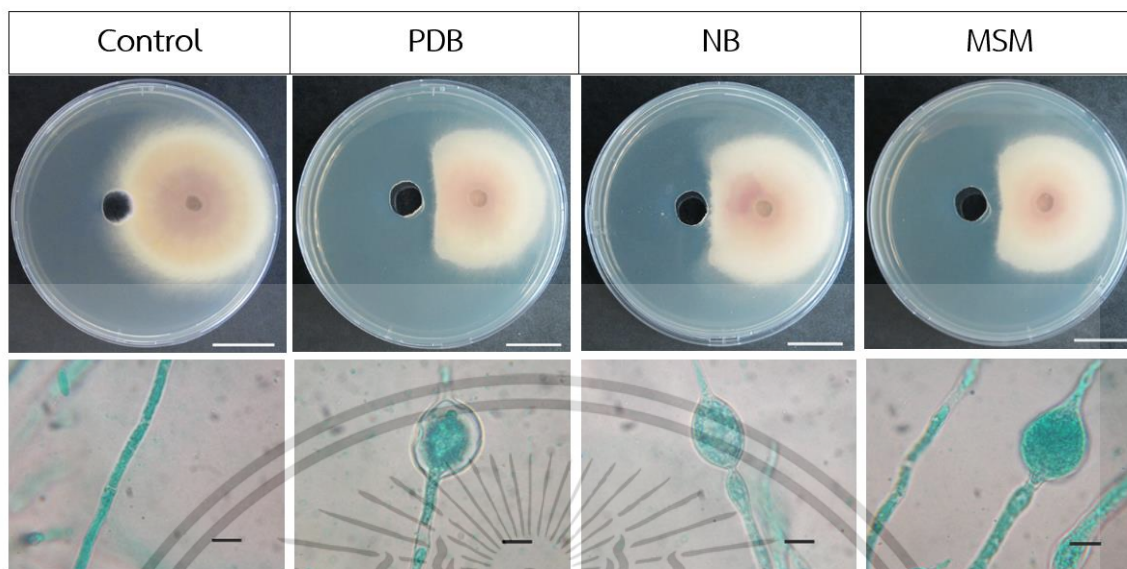


**รูปที่ 4.3** การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบ ร่วมกับเชื้อรา *P. oryzae* เส้นสีขาวแสดงระยะของภาพเท่ากับ 2 เซนติเมตร และเส้นสีดำแสดงระยะภาพ ใต้กล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



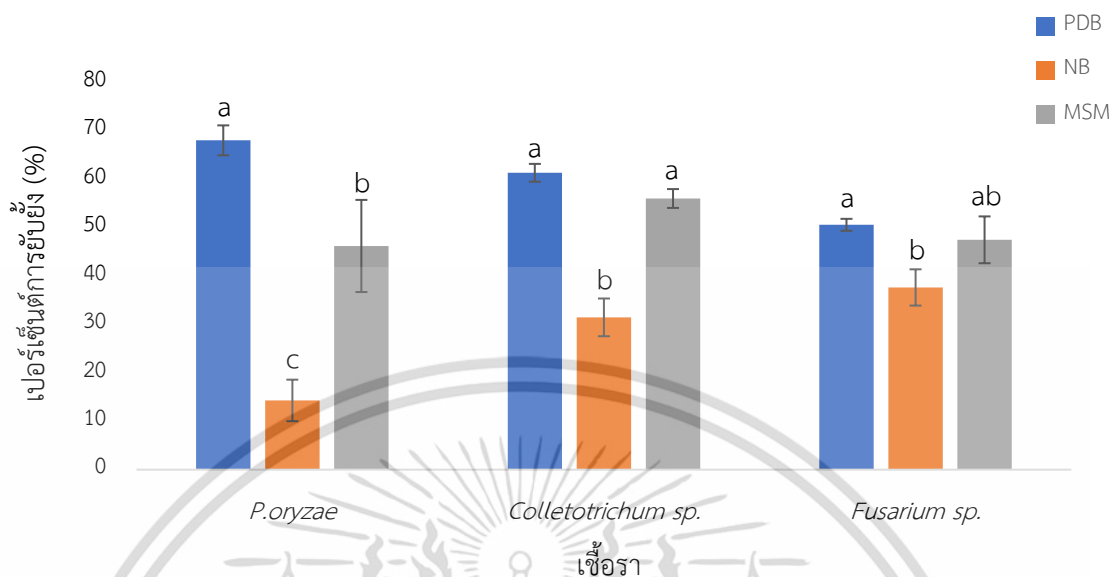
**รูปที่ 4.4** การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบ ร่วมกับเชื้อรา *C. fruticola* เส้นสีขาวแสดงระยะของภาพเท่ากับ 2 เซนติเมตร และเส้นสีดำแสดงระยะภาพ ใต้กล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 10 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



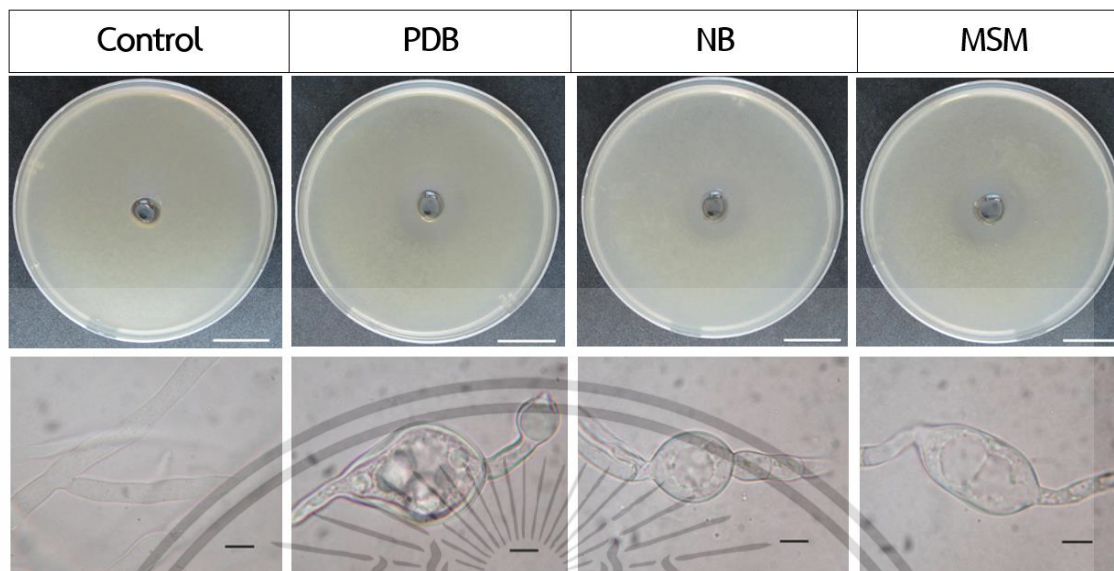
**รูปที่ 4.5** การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum* เส้นสีขาวแสดงระยะของภาพเท่ากับ 2 เซนติเมตร และเส้นสีดำแสดงระยะภาพได้กล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 10 ไมโครเมตร

วัตถุประสงค์การเจริญของเส้นใยเชื้อราและนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา (รูปที่ 4.6) พบว่าการทดสอบในเชื้อรา *P. oryzae* น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพการยับยั้ง ( $67.95 \pm 3.08$  เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ MSM ในการยับยั้งเชื้อรา *C. fructicola* สูงใกล้เคียงกัน ( $P > 0.05$ ) และสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ( $31.42 \pm 3.89$  เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ไม่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ NB แต่ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพการยับยั้ง ( $50.51 \pm 1.24$  เปอร์เซ็นต์) ที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นสรุปได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *P. oryzae* ที่ดีที่สุด และน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ MSM มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* และ *C. fructicola* ที่ใกล้เคียงกัน



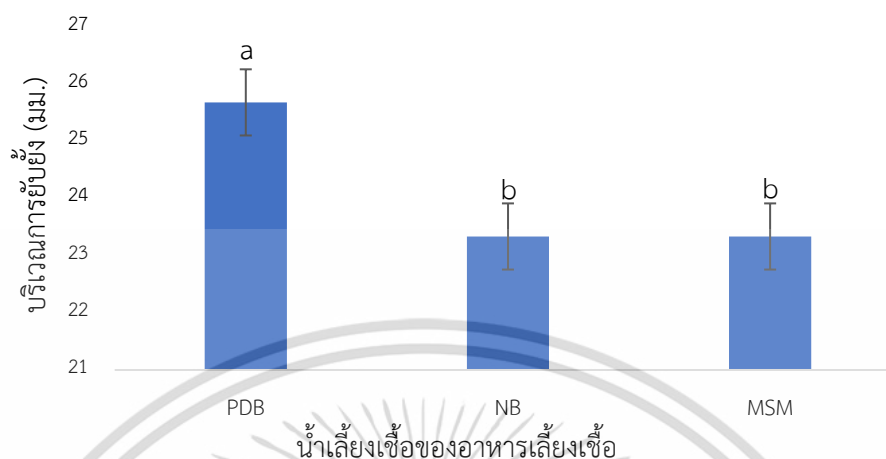
**รูปที่ 4.6** ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae*, *C. fructicola* และ *F. oxysporum* ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

การทดสอบการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. fructicola* และ *F. oxysporum* ร่วมกับน้ำเลี้ยงเชื้อของแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. fructicola* ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณยับยั้งที่มีลักษณะใสรอบหลุมที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำบริเวณส่วนใสไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เห็นได้ชัดเจนว่า เซลล์สปอร์ในงานทดสอบ เซลล์มีขนาดใหญ่ผิดปกติซึ่งอาจเป็นผลมาจากการขยายตัวของโครงสร้างภายในเซลล์ ในทางตรงกันข้ามเซลล์สปอร์ในงานควบคุมมีลักษณะปกติ (รูปที่ 4.7)



**รูปที่ 4.7** การยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ที่ทดสอบร่วมกับเชื้อรา *C. fructicola* เส้นสีขาวแสดงระยะของภาพเท่ากับ 2 เซนติเมตร และเส้นสีดำแสดงระยะภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 10 ไมโครเมตร

การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการยับยั้ง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM มีประสิทธิภาพการยับยั้งสปอร์เชื้อรา *C. fructicola* ได้แตกต่างกัน โดยการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ให้ผลการยับยั้งเชื้อราที่สูงกว่า ( $25.67 \pm 0.58$  มิลลิเมตร) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. fructicola* ที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับผลของน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ MSM ที่ให้ผลการยับยั้งที่เท่ากัน และในส่วนของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้



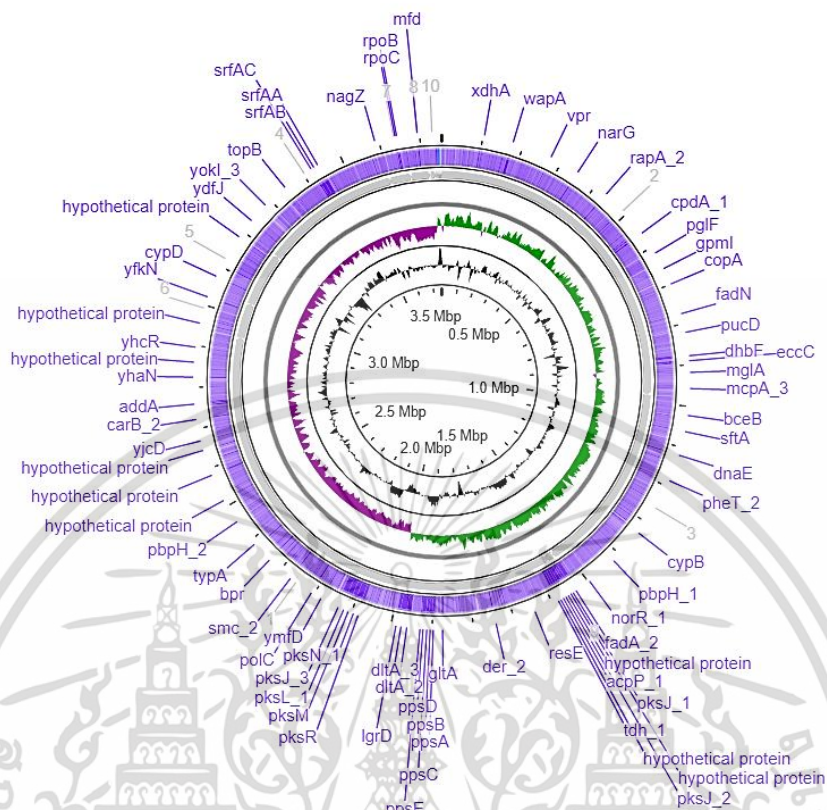
**รูปที่ 4.8** ประสิทธิภาพการยับยั้งสปอร์เชื้อรา *C. fructicola* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างกัน โดยที่น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM และ NB มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้รองลงมา และเมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนของแสงของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรที่สูงที่สุด มีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB น่าจะเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่สูง อาจเป็นผลทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อร่าก่อโรคได้สูง สอดคล้องกับการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus natto* NT-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ Landy medium (LB) พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีปริมาณของสาร surfactin สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (Sun et al., 2019) จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์สูง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งเชื้อราได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ถึงแม้จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา แต่การนำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก็สามารถทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและมีปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่สูง

ผลของการทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *P. oryzae*, *C. fruticola* และ *F. oxysporum* ยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา *C. fruticola* แต่ไม่ยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum*. ผลการทดลองนี้ คล้ายกับงานวิจัยของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ JCK-12 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *M. oryzae*, *F. graminearum* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* แต่ไม่สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *F. graminearum* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่มากขึ้นทำให้มีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้เพียงเล็กน้อย (Kim et al., 2017) เช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DA12 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *F. graminearum* แต่ต้องใช้ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราข้างต้น (Lee et al., 2017) จากการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นเห็นได้ว่า ความแตกต่างทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันของฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช

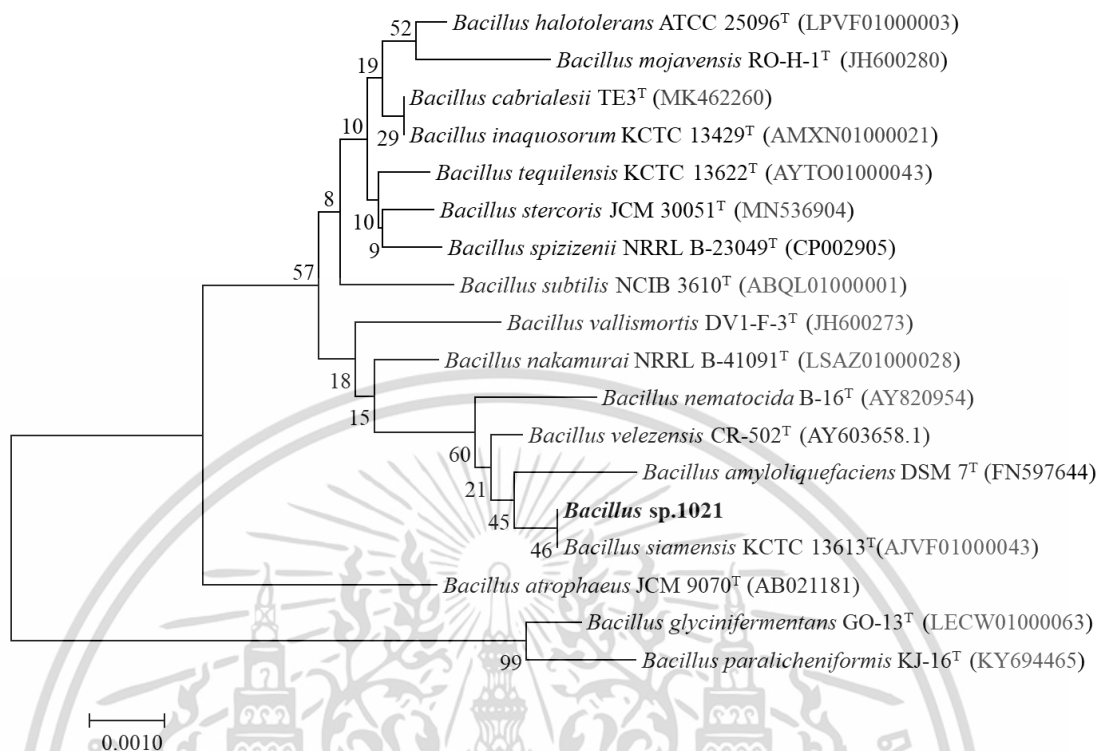
#### 4.2 การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยจีโนม

ใช้ข้อมูลลำดับเบสของจีโนม *Bacillus* sp. 1021 (GCA\_014534735.1) ที่มีความยาว 3,753,774 คู่เบส ประกอบไปด้วย 26 contig ซึ่งจากการทำแผนที่จีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีจำนวนยีนทั้งหมด 3,767 ยีน มีค่า GC content เท่ากับ 46.4 เปอร์เซ็นต์ Coding sequences (CDSs) มีทั้งหมด 3,685 ยีน (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 แผนที่จีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 จากทางด้านใน: วงกลมสีดำใช้แสดงค่า G+C content วงกลมที่ 2 สีม่วงแสดงค่า GC skew- และสีเขียวแสดงค่า GC skew+ วงกลมที่ 3 สีเทาใช้แสดงลำดับของ contig และวงกลมที่ 4 แสดง CDSs ที่พบบนจีโนม

วิเคราะห์ค่า ANI ด้วยโปรแกรม J species ซึ่งต้องมีค่าความคล้ายคลึงของแบคทีเรียมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และ ค่า dDDH ด้วยโปรแกรม TYGS ต้องมีค่าความคล้ายคลึงกันมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อบ่งบอกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (Wayne et al., 1987) ผลที่ได้พบว่าจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> มีค่า ANI สูงที่สุดเท่ากับ 99.11 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า dDDH สูงที่สุดเท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์สายสัมพันธ์ที่มีลำดับเบสของจีโนมที่ใกล้เคียงกันจากการทำ phylogenomic tree พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup>, *B. amyloliquefaciens* DSM 7<sup>T</sup> และ *B. velezensis* CR-502<sup>T</sup> (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 Phylogenomic tree โดยใช้ลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 และแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ชนิดอื่นที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุล แต่ไม่สามารถระบุได้ถึงชนิดของแบคทีเรียจึงใช้ยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงกันของแบคทีเรียจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ดังในงานวิจัยที่ใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* PB-I ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ กับ *Bacillus licheniformis* (Ghumro et al., 2012) แต่ในบางกรณีการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ก็มีข้อจำกัดในการจัดจำแนก เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดมีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นในการใช้ยีน 16S rRNA อาจไม่เพียงพอในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ดังเช่นในการจัดจำแนก *Bacillus psychrophilus* และ *Bacillus globisporus* เมื่อใช้ยีน 16S rRNA พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงสูงถึง 99.8 เปอร์เซ็นต์ (Fox et al., 1992) แต่ผลที่ได้ตรงกันข้ามกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่จัดจำแนกโดยใช้ค่า DDH มีค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่ามาตรฐาน โดยมีค่าน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Ruger, 1983) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการใช้จีโนมในการจัดจำแนกซึ่งค่า DNA-DNA hybridization (DDH) เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์

ความคล้ายคลึงกันระหว่างแบคทีเรีย ใช้การเข้าคู่กันของลำดับเบสทั้งหมดของจีโนม นอกจากนี้มีการใช้เทคโนโลยีเพื่อให้มีความรวดเร็วและสะดวกในการจัดจำแนก ได้แก่ การวิเคราะห์ค่า dDDH ที่ใช้ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมเช่นเดียวกับค่า DDH และค่า ANI ดังในงานวิจัยที่จัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BY-2 และ *Bacillus* sp. Tu-100 โดยการใช้จีโนมในการจัดจำแนก ซึ่งจากเดิมจัดจำแนกจากการใช้ยีน 16S rRNA พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์กับ *B. subtilis* 168 ดังนั้นจึงจัดอยู่ในชนิด *B. subtilis* ที่มีการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* จากเมล็ดพืช น้ำมัน (Hu et al., 2011; Hu et al., 2014) ในงานวิจัยต่อมาจัดจำแนก *B. subtilis* BY-2 และ *B. subtilis* Tu-100 ใหม่จากการใช้จีโนมในการจัดจำแนก พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่า ANI อยู่ที่ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ และค่า dDDH ประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ คล้ายคลึงกับ *B. velezensis* และเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* ค่าของ ANI อยู่ที่ประมาณ 84 เปอร์เซ็นต์ และ ค่า dDDH อยู่ที่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ต่ำกว่าเกณฑ์ ทั้ง 2 ค่า ดังนั้นจึงจัดจำแนกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ดังกล่าวใหม่ในชื่อ *B. velezensis* (Mullins et al., 2020) แสดงให้เห็นว่าการจัดจำแนกโดยใช้ยีน 16S rRNA มีข้อจำกัดดังที่กล่าวไปข้างต้น แต่ผลของการศึกษานี้จัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 โดยใช้ลำดับเบสของจีโนมที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยการใช้ยีน 16S rRNA ของงานวิจัยก่อนหน้า (Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2021) เห็นได้ว่าการใช้ลำดับเบสของจีโนมในการจัดจำแนกเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือของข้อมูลสูง เนื่องจากการใช้ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมมาวิเคราะห์ซึ่งแตกต่างจากการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่เป็นการวิเคราะห์ยีนเพียงแค่บางส่วนของจีโนมในแบคทีเรีย

#### 4.4 คุณภาพของไพรมอร์สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

นำลำดับเบสของจีโนมแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 วิเคราะห์ด้วย RAST server ในการค้นหา ยีนอ้างอิงและยีนควบคุมทั้งหมด 11 ยีน แบ่งได้เป็นยีนอ้างอิงได้แก่ *rpsU*, *Udp*, *gatB*, *dnaB*, *ssb*, *gyrA* และ *gyrB* และยีนควบคุมได้แก่ *spo0A*, *codY*, *degU* และ *comA* และวิเคราะห์ยีนในกลุ่ม NRPS ได้แก่ *fenC*, *dhbE* และ *srfAA* คำนวณประสิทธิภาพของไพรมอร์ (E) และค่า R<sup>2</sup> ทั้ง 2 ค่าเป็นค่าที่บ่งบอกความเหมาะสมของไพรมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งค่าประสิทธิภาพของไพรมอร์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 90-110 เปอร์เซ็นต์ (Robledo et al., 2014) และค่า R<sup>2</sup> ที่ยอมรับได้จะมีค่ามากกว่า 0.99 หรือเข้าใกล้ 1 (Peirson, 2003) จะเห็นได้ว่าค่า E และ R<sup>2</sup> ของไพรมอร์ยีนทั้งหมดที่ได้รับการออกแบบมีค่า E อยู่ระหว่าง 94-109 เปอร์เซ็นต์ และ R<sup>2</sup> มีค่าอยู่ระหว่าง 0.993-0.999 ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดสามารถใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเป้าหมาย (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ (E) และค่า R<sup>2</sup> ของยีนอ้างอิงและยีนควบคุม

Gene name	Gene function/product	E (%)	R <sup>2</sup>	ACCESSION
<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	94.91	0.998	WP_003152957
<i>Udp</i>	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)	98.62	0.999	WP_099745079
<i>gatB</i>	GatB/YqeY domain-containing protein	101.77	0.993	WP_007408278
Helicase	DNA helicase	104.55	0.995	WP_188154234
<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein Ssb	99.26	0.998	WP_016937325
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	99.26	0.998	WP_016937309
<i>gyrB</i>	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing)	99.44	0.998	WP_099743883
<i>spo0A</i>	sporulation transcription factor Spo0A	106.44	0.996	WP_003153177
<i>codY</i>	GTP-sensing pleiotropic transcriptional regulator CodY	109.42	0.996	WP_013352252
<i>degU</i>	two-component system response regulator DegU	109.72	0.998	WP_003219701
<i>comA</i>	response regulator transcription factor	109.56	0.997	WP_016937821

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกยีนอ้างอิงมาใช้เป็นมาตรฐานในการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย จะต้องวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงที่มีระดับการแสดงออกคงที่ในสภาวะที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่มียีนอ้างอิงเพียงตัวเดียวที่สามารถแสดงออกได้อย่างคงที่ในทุกสภาวะและทุกชนิดของแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงให้คงที่ในสภาวะที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้ยีนอ้างอิงที่เหมาะสม ยีนอ้างอิงที่นำมาวิเคราะห์คัดเลือกมาจากการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องภายในเซลล์ (Rocha et al., 2015) แบ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการถอดรหัสมี 4 ยีน ได้แก่ *Helicase*, *ssb*, *gyrA* และ *gyrB* การแปลรหัส ได้แก่ ยีน *rpsU* และ ยีน *gatB* และการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ ยีน *Udp* วัดระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงทั้งหมด 7 ยีน ด้วยวิธีการ RT-qPCR ได้ผลออกมาเป็นค่าจำนวนรอบของปริมาณ (Cq) จากนั้นนำค่า Cq วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder เพื่อวิเคราะห์คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าความเสถียร (Stability value) ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่มีระดับการแสดงออกที่คงที่จะมีค่า Stability value ต่ำ (รูปที่ 4.11)

Gene	Expression stability
<i>rpsU</i>	0.553
<i>Udp</i>	0.409
<i>gatB</i>	0.327
<i>ssb</i>	0.287
<i>dnaB</i>	0.653
<i>gyrB</i>	0.286
<i>gyrA</i>	0.377

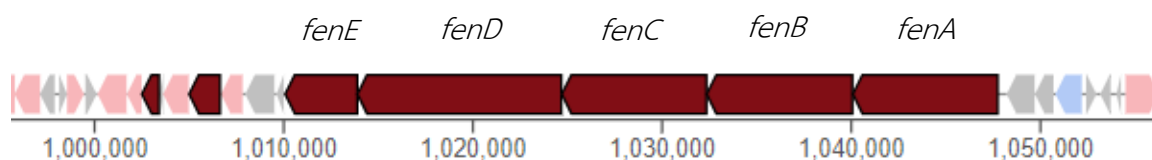
**รูปที่ 4.11** ค่าความเสถียร (Stability value) ของยีนอ้างอิง 7 ยีนจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder

ผลที่ได้พบว่ายีนอ้างอิง *dnaB* มีค่า Stability value ที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.653 และยีนอ้างอิง *gyrB* มีค่า Stability value ที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.286 นอกจากนี้โปรแกรมแนะนำการใช้ยีนอ้างอิงร่วมกันระหว่าง *gatB* และ *ssb* มีค่า Stability value ที่ต่ำเท่ากับ 0.104 ในการศึกษาเลือกใช้ยีนอ้างอิงร่วมกันในการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ในแบคทีเรีย *Bacillus cereus*

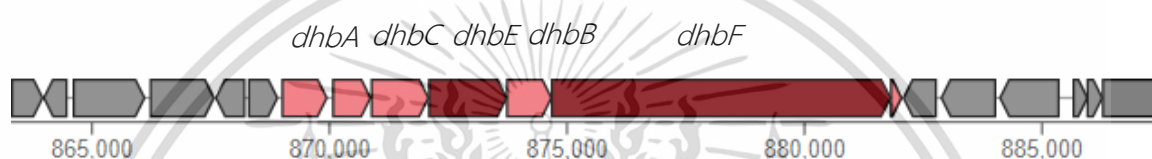
ATCC 14579 และ *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* 97-27 พบว่ายีน *gatB\_Yqey* เป็นยีนที่มีความเสถียรที่สูงที่สุดจึงใช้วัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีนอ้างอิงร่วมกัน ผลของระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ได้มีค่าที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (Reiter et al., 2011) จะเห็นได้ว่าการใช้ยีนอ้างอิงเดี่ยวหรือยีนอ้างอิงร่วมกัน สามารถใช้เป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ ซึ่งจะต้องพิจารณาจากค่า Stability value ยิ่งถ้ามีค่า Stability value ที่ต่ำ ก็จะมีระดับการแสดงออกของยีนที่เสถียรสูงภายใต้สภาวะที่ทดสอบ สรุปการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM มีระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงร่วมกันของยีน *gatB* และ *ssb* เป็นยีนที่มีความเสถียรสูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยที่คัดเลือกยีนอ้างอิงทั้งหมด 11 ยีน 18ST4, ACT, HPRT, PBGD, G6PD, GAPDH, TBP, RasC, GLP, TPI และ TUB ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม NormFinder, GeNorm และ BestKeeper มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (CSP21) ในสภาวะอุณหภูมิที่ต่างกัน สารเคมี และความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ด้วยวิธีการ RT-qPCR ในแบคทีเรีย *Acanthamoeba* spp. พบว่าในสภาวะอุณหภูมิที่ต่างกันและความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ยีน HPRT เป็นยีนอ้างอิงที่มีความเสถียรสูงที่สุด แต่ในทางกลับกันยีน 18ST4 เป็นยีนที่มีความเสถียรสูงที่สุดในสภาวะสารเคมีที่ต่างกัน (Köhler et al., 2020) จะเห็นได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงในบางสภาวะมีระดับการแสดงออกที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นการใช้ยีนอ้างอิงมาทำให้เป็นมาตรฐานสำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย จะต้องมีการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของแบคทีเรีย และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

#### 4.5 กลุ่มยีนสังเคราะห์ NRPs ในจีโนมของ *Bacillus* sp. 1021

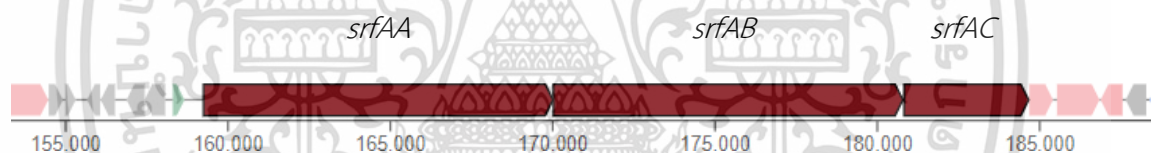
การวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 ด้วยโปรแกรม antiSMASH พบยีน 3 กลุ่มซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม NRPS (รูปที่ 4.12-4.14) ได้แก่กลุ่มของยีน *fen*, *dhb* และ *srf* ที่กำหนดการสังเคราะห์ NRPs ประเภท fengycin, bacillibactin และ surfactin ตามลำดับ โดยมีค่าความคล้ายคลึงในแต่ละยีนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์, 100 เปอร์เซ็นต์ และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *fen* กำหนดการสังเคราะห์สาร fengycin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021

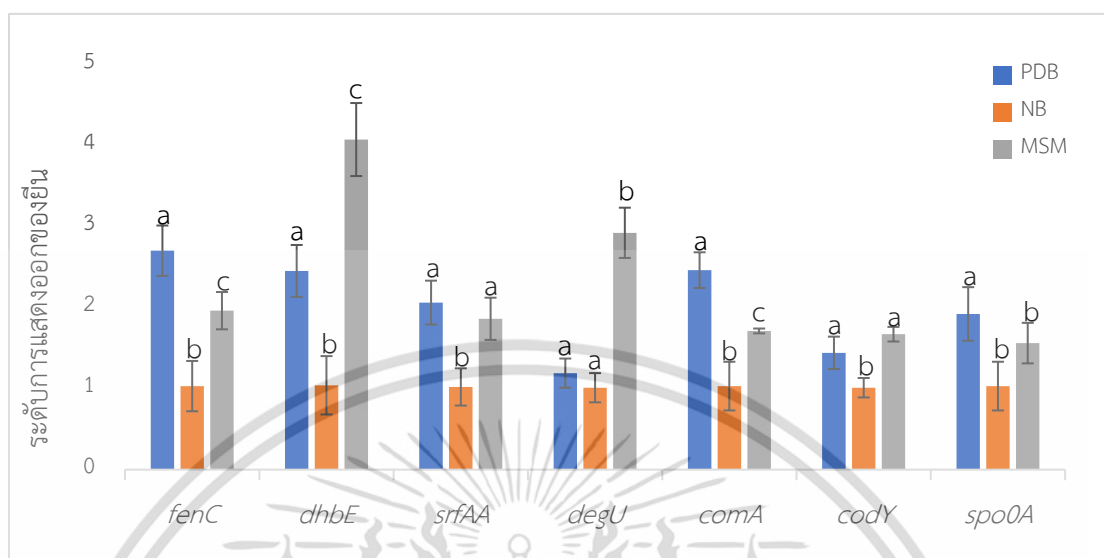


รูปที่ 4.13 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *dhb* กำหนดการสังเคราะห์สาร bacillibactin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021



รูปที่ 4.14 ลำดับเบสของกลุ่มยีน *srf* กำหนดการสังเคราะห์สาร surfactin ที่พบในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021

การวัดระดับการแสดงออกของยีน *fenC*, *dhbE* และ *srfAA* ด้วยวิธี RT-qPCR ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM (รูปที่ 4.15) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *fenC* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ( $2.7 \pm 0.31$ ) สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ( $1.96 \pm 0.23$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ในทางกลับกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีระดับการแสดงออกของยีน *dhbE* ที่สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และในส่วนระดับการแสดงออกของยีน *srfAA* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ( $2.06 \pm 0.27$ ) และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ( $1.86 \pm 0.26$ ) มีระดับการแสดงออกที่สูงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )



**รูปที่ 4.15** ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายใน *Bacillus* sp. 1021 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

การพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน NRPS ร่วมกับฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรค โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM สามารถใช้ระบุสารยับยั้งเชื้อราได้โดยอ้อม ผลของระดับการแสดงออกของยีนเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีระดับการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูง ส่งผลให้น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้สูง แต่ในทางกลับกันระดับการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียที่ต่ำส่งผลทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ต่ำเช่นเดียวกัน โดยที่แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีระดับการแสดงออกของยีน *fenC* ที่สูงที่สุด ระดับการแสดงออกของยีน *dhbE* และยีน *srfAA* รองลงมาตามลำดับ แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีระดับการแสดงออกของยีน *dhbE* ที่สูงที่สุด รองลงมาคือยีน *fenC* และยีน *srfAA* มีระดับการแสดงออกของยีนที่ต่างกันเล็กน้อย และระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ยีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ต่ำที่สุด ส่งผลทำให้การสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อราน้อยที่สุด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าผลของระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS ในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อ สรุปได้ว่ายีน *fenC* เป็นยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา แต่ในส่วนของยีน *dhbE* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในการสะสมธาตุเหล็กในแบคทีเรีย (Chen et al., 2009) ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ข้อสรุปนี้สอดคล้องกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบว่ายีนในกลุ่ม

NRPS เป็นยีนที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ ดังในงานวิจัยที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค พบว่าสาร fengycin A และ fengycin B ที่สังเคราะห์ได้จากกลุ่มของยีน *fen* ที่พบในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* Q-426 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* (Zhao et al., 2013) เช่นเดียวกับสาร fengycin ที่พบใน *B. subtilis* สายพันธุ์ CMB32 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้สูงกว่าสาร surfactin (Kim et al., 2010) ในทางกลับกันสาร surfactin ที่สังเคราะห์ได้จากยีน *srfAA* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้เล็กน้อย แต่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดังในงานวิจัยที่ทดสอบสาร surfactin ในแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ MSH1 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (Isa et al., 2017) และผลของการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea* โดยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ SYBC H47 พบว่าสาร surfactin มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสาร fengycin (Li et al., 2016) อย่างไรก็ตาม surfactin จากแบคทีเรียบางชนิดในสกุล *Bacillus* ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้เมื่อทำงานร่วมกันกับสาร NRPS กลุ่มอื่น ตัวอย่างเช่นในงานวิจัยที่ศึกษาการสร้างสาร Cyclic lipopeptides ในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ JCK-12 พบว่าสาร fengycin, surfactin และ Iturin มีบทบาทเสริมฤทธิ์กันทำให้สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *F. graminearum* ได้ดียิ่งขึ้น (Kim et al., 2017) นอกจากนี้สาร surfactin สามารถกระตุ้นทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการสร้างแผ่นฟิล์มรอบๆ การเจริญของแบคทีเรีย (Ongena and Jacques, 2008; Chen et al., 2009) ดังนั้นแล้วเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน อาจจำเป็นต้องมีการสกัดสาร fengycin และ surfactin ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 มาทดสอบกับเชื้อราโดยตรงต่อไป

ระดับการแสดงออกของยีนควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB, NB และ MSM (รูปที่ 4.15) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *degU* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ( $2.92 \pm 0.31$ ) สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ อาหารเลี้ยงเชื้อ NB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีระดับการแสดงออกของยีน *comA* สูงที่สุด ( $2.46 \pm 0.22$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ( $1.71 \pm 0.03$ ) ต่อมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีระดับการแสดงออกของยีน *codY* ใกล้เคียงกันและสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และระดับการแสดงออกของยีน *spo0A* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ( $1.92 \pm 0.33$ ) สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม NRPS กับยีนควบคุมในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีน *fenC* ยีน *srfAA* ยีน *comA* และยีน *spo0A* มีระดับการแสดงออกของทั้ง 3 ยีนไปในทิศทางเดียวกันคือ แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีระดับการแสดงออกยีนที่สูงที่สุด อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีระดับการแสดงออกของยีนที่รองลงมา

และระดับการแสดงออกของยีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB น้อยที่สุด ส่วนยีน *degU* และยีน *codY* มีระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อในทิศทางตรงกันข้าม คือ แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีระดับการแสดงออกยีนที่สูงกว่าระดับการแสดงออกของยีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ NB (รูปที่ 4.12) ระดับการแสดงออกของยีนควบคุม ได้แก่ ยีน *comA* และยีน *spo0A* มีระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไปในทิศทางเดียวกันกับยีนในกลุ่ม NRPS อาจจะเป็นเพราะว่ายีนควบคุมทั้ง 2 ยีนนี้ เป็นยีนที่เข้าไปช่วยให้ระดับการแสดงออกของยีน *fenC* และยีน *srfAA* มากขึ้น ส่วนยีน *degU* และยีน *codY* ที่มีระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อในทิศทางตรงกันข้ามจะเข้าไปยับยั้งหรือขัดขวางการแสดงออกของยีน *fenC* และยีน *srfAA* ซึ่งได้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* fmbJ ที่ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *comA* และยีน *spo0A* เป็นยีนที่ควบคุมระดับการแสดงออกของยีน *fenC* เมื่อยีนควบคุมมีระดับการแสดงออกสูงจะทำให้มีระดับการแสดงออกของยีน *fenC* ที่สูงไปด้วย (Sun et al., 2020) และระดับการแสดงออกของยีน *comA* และยีน *spo0A* เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *srfAA* ทำให้มีการสังเคราะห์สาร surfactin ออกมาเพิ่มมากขึ้น แต่ในทางกลับกันยีน *codY* และยีน *degU* เป็นยีนที่ยับยั้งการสังเคราะห์สาร surfactin ในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* fmbJ (Zhi et al., 2017; Sun et al., 2020) จึงสรุปได้ว่ายีน *fenC* คาดว่าน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *comA* และยีน *spo0A* เมื่อยีนควบคุมมีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงส่งผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *fenC* สูงขึ้นเช่นเดียวกัน

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 โดยการใช้ลำดับเบสของจีโนมในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน ผลของการวิเคราะห์ค่า ANI เท่ากับ 99.11 เปอร์เซ็นต์ และค่า dDDH เท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 2 ค่าอยู่ในระดับที่สูงกว่าเกณฑ์ จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 1021 เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับกับ *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup> และการระบุชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยใช้ลำดับเบส ITS ในการจัดจำแนกเชื้อราที่นำมาทดสอบ เมื่อนำไปวิเคราะห์พื้นฐานข้อมูลพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Fusarium* sp. มีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส ITS ที่ใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. fructicola* และเชื้อรา *F. oxysporum* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ phylogenetic tree ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด สรุปได้ว่า เชื้อรา *Fusarium* sp. เป็นเชื้อราชนิดเดียวกับกับเชื้อรา *F. oxysporum* และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อราชนิดเดียวกับกับ *C. fructicola* จาก การทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชโดยการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างชนิดกัน ส่งผลให้แบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ออกมาได้ไม่เท่ากัน โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราดีที่สุด ทำให้มีการยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างกัน ซึ่งในการวิเคราะห์ระดับการ แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการศึกษานี้เป็นยีนในกลุ่ม NRPS ผลที่ได้จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราสอดคล้องกับผลของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยระดับการแสดงออกของยีน *fenC* ในอาหารเชื้อเลี้ยง PDB มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงเป็นไปในทางเดียวกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดี แสดงให้เห็นว่ายีน *fenC* ซึ่งมียีน *comA* และยีน *spo0A* ที่ควบคุมการสังเคราะห์สาร fengycin คาดว่าน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อรา จึงสรุปได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน เป็นผลทำให้แบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมายับยั้งเชื้อราได้แตกต่างกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนจึงอาจใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของยีนที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกิจกรรมนั้นๆ ในเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยอื่น ทำให้สามารถลดระยะเวลาและความซับซ้อนของวิธีการวิเคราะห์ได้ ในการศึกษาข้างต้นนี้หากต้องการข้อมูลที่ชี้จำเพาะเจาะจงของสารออกฤทธิ์จำเป็นต้องไปวิเคราะห์เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารเพิ่มเติมในวิธีการต่อไป

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช อาทิเช่น การทำให้บริสุทธิ์ สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา
2. ศึกษากลไกอื่นๆ ภายในเซลล์ที่อาจจะส่งผลทำให้แบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เท่ากัน นอกเหนือจากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน
3. ปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลา และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นที่ทำให้มีปริมาณของสารออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น



## เอกสารอ้างอิง

- ธนากร แสงสง่า. 2557. “ฟิสิกส์อาร์: บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(4).
- Abbas, H.K. Yoshizawa, T. and Shier, W.T. 2013. “Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium* spp. *Toxicon*. 74 : 68–75.
- Adams, G. 2020. **A beginner’s guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR**. Leicester. Portland Press Limited under the Creative Commons Attribution.
- Andersen, C.L. Ledet-Jensen, J. and Ørntoft, T. 2004. “Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets.” *Cancer Research*. 64 : 5245-5250.
- Anderson, I. Sorokin, A. Kapatral, V. Reznik, G. Bhattacharya, A. Mikhailova, N. Burd, H. Joukov, V. Kaznadzey, D. Walunas, T. D'souza, M. Larsen, N. Pusch, G. Liolios, K. Grechkin, Y. Lapidus, A. Goltsman, E. Chu, L. Fonstein, M. Ehrlich, S.D. Overbeek, R. Kyrpides, N. Ivanova, N. 2005. “Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 250(2) : 175–184.
- Aphimeteetamrong, S. 2017. Isolation of Plant-Growth-Promoting Epiphytic Bacteria from Organic Rice Plant. Thesis of The degree of master in biotechnology department of biology faculty of science, KING MONGKUT’S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG.
- Aphimeteetamrong, S. and Kittiwongwattana, C. 2019. “Diversity and Plant Growth Promoting Activities of Rice Epiphytic Bacteria.” *Current Applied Science and Technology*. 19(2) : 66-79.
- Aphimeteetamrong, S. and Kittiwongwattana, C. 2021. “Medium Effecton Antagonistic Activity and Detection of Nonribosomal Peptide Synthetase Genes in Epiphytic *Bacillus* Strains.” *Current Applied Science and Technology*. 21(4) : 637-65.
- Ashwini, N. and Srividya, S. 2014. “Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1.” *Biotech*. 4 : 127–136.

- Aziz, R.K. Bartels, D. Best, A.A. DeJongh, M. Disz, T. Edwards, R.A. Formis, K. Gerdes, S. Glass, E.M. Kubal, M. Meyer, F. Olsen, G.J. Olson, R. Osterman, A.L. Overbeek, R.A. McNeil, L.K. Paarmann, D. Paczian, T. Parrello, B. Pusch, G.D. Reich, C. Stevens, R. Vassieva, O. Vonstein, V. Wilke, A. and Zagnitko, O. 2008. “The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.” *BMC Genomics*. 9 : 75
- Badotti, F. Oliveira, D. Silva, F. Fernando, G.C. Martins, V.A.B. Camargos, P.L.F. Alves, N.L. Guilherme, O. Aristóteles, G.N. 2017. “Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi).” *BMC Microbiology*. 17(1).
- Bai, B. Ren, J. Bai, F. and Hao, L. 2020. “Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR.” *PLoS ONE*. 15(1).
- Bonmatin, J.M. Laprévote, O. and Peypoux, F. 2003. “Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. activity-structure relationships to design new bioactive agents.” *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 6 : 541–556.
- Breunig, M. and Chilvers, M.I. 2021. “Baseline sensitivity of *Fusarium graminearum* from wheat, corn, dry bean and soybean to pydiflumetofen in Michigan, USA.” *Crop Protection*. 140 : 105419.
- Burkhead, K.D. Schisler, D.A. and Slininger, P.J. 1995. “Bioautography shows antibiotic production by soil bacterial isolates antagonistic to fungal dry rot of potatoes.” *Soil Biology and Biochemistry*. 27(12) : 1611–1616.
- Bustin, S.A. Benes, V. Garson, J.A. Hellems, J. Huggett, J. Kubista, M. Mueller, R. Nolan, T. Michael, W. Shiple, G.L. Vandesompele, J. and Wittwer C.T. 2009. “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.” *Clinical Chemistry*. 55(4) : 611–622.
- Chen, X. H. Koumoutsis, A. Scholz, R. Schneider, K. Vater, J. Süssmuth, R. Piel, J. and Borriss, R. 2009. “Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens.” *Journal of Biotechnology*. 140(1-2) : 27–37.

- Chen, Y. Gu, F.I. Li, J.h. Xu, F. He, S.Z. Fang, Y. 2015. “*Bacillus vanillea* sp. nov., Isolated from the Cured Vanilla Bean.” *Current Microbiology*. 70 : 235–239.
- Chowdhury, S.P. Hartmann, A. Gao, X. and Borriss, R. 2015. “Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*. 6 : 780.
- Chun, B.H. Kim, K.H. Jeong, S.E. and Jeon, C.O. 2019. “Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group– *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*– revealed by pan-genome analysis.” *Food Microbiology*. 77 : 146–157.
- Demharter, W. and Hensel, R. 2007. “*Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a new thermophilic species from sewage sludge.” *Systematic and Applied Microbiology*. 11(3) : 272–276.
- Desjardins, A.E. and Proctor, R.H. 2007. “Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins.” *International Journal of Food Microbiology*. 119 : 47–50.
- Dhali, D. Coutte, F. Arias, A.A. Auger, S. Bidnenko, V. Chataigné, G. Lalk, M. Niehren, J. Sousa, J.d. Versari, C. and Jacques, P. 2017. “Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C14 isoform.” *Biotechnology Journal*. 12(7) : 1600574.
- Dheda, K. Huggett, J. F. Bustin, S. A. Johnson, M. A. Rook, G. and Zumla, A. 2004. “Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.” *BioTechniques*. 37(1) : 112–119.
- Dunlap, C.A. 2015. “Phylogenomic analysis shows that ‘*Bacillus vanillea*’ is a later heterotypic synonym of *Bacillus siamensis*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65 : 3507–3510.
- Ebbole, D.J. 2007. “Magnaporthe as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions.” *Annual Review of Phytopathology*. 45(1) : 437–456.
- Ehling-Schulz, M. Lereclus, D. and Koehler, T. M. 2019. “The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential.” *Microbiology Spectrum*. 7(3).
- Esfahani, M.N. 2018. “Genetic and virulence variation in *Fusarium oxysporum* f. sp.

- cepae* causing root and basal rot of common onion in Iran.” *Journal of Phytopathology*. 1–9.
- Fan, H. Ru, J. Zhang, Y. Wang, Q. and Li, Y. 2017. “Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease.” *Microbiological Research*. 89–97.
- Farace, G. Fernandez, O. Jacquens, L. Coutte, F. Krier, F. Jacques, P. Clement, C. BarkaE, A. Jacquard, C. and Dorey, S. 2015. “Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine.” *Molecular plant pathology*. 16(2) : 177–187.
- Fekiab, O.K. Khedhera, S.B. Dammak, M. Kamoun, A. Khiareddine, H.J. Remadi, M.D. Tounsi, S. 2016. “Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease.” *Biological Control*. 95 : 73-82.
- Felnagle, E.A., Jackson, E E. Chan, Y.A. Podevels, A.M. Berti, A.D. McMahon, M.D. and Thomas, M.G. 2011. “Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products.” *Molecular Pharmaceutics*. 5(2) : 191–211.
- Finking, R. and Marahiel, M.A. 2004. “Biosynthesis of nonribosomal peptides.” *Annual Review of Microbiology*. 58(1) : 453–488.
- Fira, D. Dimkic, I. Beri, T. Lozo, J. and Stankovi, S. 2018. “Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species.” *Journal of Biotechnology*.
- Fox, G.E. Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P. 1992. “How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(1) : 166–170.
- Frankland, G.C. Frankland, P.F. 1887. “Studies on some new microorganisms obtained from air.” *Biological Sciences*. 178 : 257-287.
- Gajera, H.P. Savaliya, D.D. Hirapara, D.G Patel, S.V. and Golakiya, B.A. 2016. “Biocontrol mechanism of *Bacillus* for Fusarium wilt anagement in Cumin (*Cuminum cyminum* L.)” *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices Fungal Biology*.

- Goris, J. Konstantinidis, K.T. Klappenbach, J.A. Coenye, T. Vandamme, P. and Tiedje, J.M. 2007. "DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 : 81–91.
- Grosch, R. Junge, H. and Kofeet, A. 2001. "Evaluation of isolates of *Bacillus*-group against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato plants in soilless culture." *Gartenbauwissenschaft*. 66 : 262–269.
- Ghumro, P.B. Shafique, M. Ali, M.I. Javed, I. Ahmad, B. Jamal, A. Ali, N. and Hameed A. 2012. "Isolation and screening of protease producing thermophilic *Bacillus* strains from different soil types of Pakistan" *African Journal of Microbiology Research*. 6(8) : 1663-1668.
- Hamer, J.E. Howard, R.J. Chumley, F.G. and Valent, B. 1988. "A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus." *Science*. 239(4837) : 288-90.
- Harman, G.E. 2000. "Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22." *Plant Disease*. 84(4) : 377–393.
- Harman, G.E. Howell, C.R. Viterbo, A. Chet, I. and Lorito, M. 2004. "*Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts." *Nature Reviews Microbiology*. 2(1) : 43–56.
- Hu, X. Roberts, D.P. Maul, J.E. Emche, S.E. Liao, X. Guo, X. Liu, Y. McKenna, L.F. Buyer, J.S. and Liu, S. 2011. "Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations." *Canadian Journal of Microbiology*. 57(7).
- Hu, X. Roberts, D.P. Xie, L. Maul, J.E. Yu, C. Li, Y. Jiang, M. Liao, X. Che, Z. and Liao, X. 2014. "Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field." *Biological Control*. 70 : 54–64.
- Huszcza, E. and Burczyk, B. 2006. "Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. Z." *Naturforsch*. 61 : 727–733.
- Ikeda, M. Imai, K. Tabata, S. Miyoshi, K. Murahara, N. Mizuno, T. Horiuchi, M. Kato, K.

- Imoto, Y. Iwata, M. Mimura, S. Ito, T. Tamura, K. Kato. Y. 2020. “Clinical evaluation of self-collected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19.” *Journal of Clinical Microbiology*.
- Isa, M.H.M. Shannaq, M. A.H. F. Mohamed, N. Hassan, A.R. Shorgani, N. K.N.A. and Hamid A.A. 2017. “Antibacterial Activity of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* MSH1.” *Transactions on Science and Technology* 4 : 402-407.
- Ishag, A.E.S.A. Abdelbagi, A.O. Hammad, A.M.A. Elsheikh, E.A.E. Mohammed, I.A. and Hur, J.H. 2020. “Molecular identification of indigenous bacteria isolated from pesticides heavily contaminated soils” *African Journal of Biotechnology*. 19(8) : 556-563.
- Jeong, H. Jeong, D. Kim, S.H. Song, G.C. Park, S. Ryu, C. Park, S. and Choi, S. 2012. “Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup>.” *American Society for Microbiology*. 194(15) : 4148 – 4149.
- Ju, R. Zhao, Y. Li, J. Jiang, H. Liu, P. Yang, T. Bao, Z. Zhou, B. Zhou, X. and Liu, X. 2014. “Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings.” *Annals of Microbiology*. 64(1) : 377–383.
- Kamle, M. and Kumar, P. 2016. “*Colletotrichum gloeosporioides*: pathogen of anthracnose disease in Mango (*Mangifera indica* L.)” *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*. 207-219.
- Kim, P.I. Ryu, J.W. Kim, Y.H. and Chi, Y.T. 2010. “Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(1) : 138-145.
- Kim, K. Lee, Y. Ha, A. Kim, J.I. Park, A.R. Yu, N.H. Son, H. Choi, G.J. Park, H.W. Lee, C.W. Lee, T. Lee, Y.W. Kim, J.C. 2017. “Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to Chemical Fungicides Using Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain JCK-12.” *Frontiers in Plant Science* 8.
- Koumoutsis, A., Chen X., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., and

- Borriss R. 2004. "Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42." *Journal of Bacteriology*. 186(4) : 1084–1096.
- Köhl, J. Kolnaar, R. and Ravensberg, W.J. 2019. "Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy." *Frontiers in Plant Science*. 10.
- Köhler, M. Leitsch, D. Müller, N. and Walochnik J. 2020. "Validation of reference genes for the normalization of Rt-qpcR gene expression in *Acanthamoeba* spp." *Scientific Reports*. 10 : 10362.
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1998. "Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato." *Plant Disease*. 82 : 1022-1028.
- Li, X. Zhang, Y. Wei, Z. Guan, Z. Cai, Y. and Liao, X. 2016. "Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of Peach Gummosis." *PLoS ONE*. 11(9).
- Ligon, J.M., Hill, D.S. Hamme, P.E. Torkewitz, N.R. Hofmann, D. Kempf, H.J. and Pée, K.H. 2000. "Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria." *Pest Management Science*. 56 : 688-695.
- Logan, N.A. and Vos, P.D. 2015. "*Bacillus*. Bergey's Manual of systematics of archaea and Bacteria." *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Ingrid Lobo, (2008) Environmental influences on gene expression. *Nature Education* 1(1) : 39.
- their applications in industry." *Chem Process*. 4 : 13.
- Mavrodi, D.V. Mavrodi, O.V. Parejko, J.A. Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 2011. "The role of 2,4-diacetylphloroglucinol- and phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. in natural protection of wheat from soilborne pathogens." *Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management*. 267–283
- Medema, M.H. Blin, K. Cimermancic, P. Jager, V. Zakrzewski, P. Fischbach, M.A. Weber, T.

- Takano, E. and Breitling, R. 2011. “antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences.” *Nucleic Acids Research*. 39 : 339–346.
- Miller, B.R. and Gulick, A.M. 2016. “Structural biology of Non-ribosomal peptide synthetases.” *Methods in Molecular Biology*. 1401 : 3–29.
- Mongkolthanasarak, W. 2012. “Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(12) : 1597–1604.
- Mullins, A.J. Li, Y. Qin, L. Hu, X. Xie, L. Gu, C. Mahenthiralingam, E. Liao, X. and Webster, G. 2020. “Reclassification of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* BY-2 and Tu-100 as *Bacillus velezensis* and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species.” *Journal of General Microbiology*. 166(12) : 1121–1128.
- Nagel, M. and Andreesen, J.R. 1991. “*Bacillus niacini* sp. nov., a nicotinate-metabolizing mesophile isolated from soil.” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1 : 134–139.
- Nel, B. Steinberg, C. Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006. “The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana.” *Plant Pathology*. 55 : 217–223.
- Newman, L. Duffus, A.L.J. and Lee, C. 2016. “Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data.” *The American Biology Teacher*. 78(7) : 608–612.
- Okigbo, R.N. and Osuinde, M.I. 2003. “Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica* L.) in Southeastern Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis*.” *Plant Protection Science*. 39(2) : 70–77.
- Oldenburg, E. Höppner, F. Ellner, F. and Weinert, J. 2017. “*Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed.” *Mycotoxin Research*. 33(3) : 167–182.
- Ongena, M. Jacques, P. Touré, Y. Destain, J. Jabrane, A. and Thonart, P. 2005.

- “Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69 : 29–38.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. “*Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.*” *Trends Microbiol.* 115-25.
- Ou, S.H. 1973. **Rice Diseases**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England. 368.
- Peirson, S.N. 2003. “Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis.” *Nucleic Acids Research*. 31(14) : 73e–73.
- Perelló, A. Martinez, I. and Molina, M. 2015. “First Report of Virulence and Effects of *Magnaporthe oryzae* Isolates Causing Wheat Blast in Argentina.” *Plant Disease*. 99(8) : 1177.
- Peypoux, F. Bonmatin, J.M. and Wallach, J. 1999 “Recent trends in the biochemistry of surfactin.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51 : 553–563.
- Piggot, P.J. 2009. “*Bacillus Subtilis*.” *Encyclopedia of Microbiology*. 45–56.
- Pocathikorn A. 2013. “Introduction to Real time-PCR and its applications.” หน้า 1-15 ใน **เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์**. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Pretorius, D. Rooyen, J. and Clarke, K.G. 2015. “Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease.” *New Biotechnology*. 32(2) : 243–252.
- Rahman, M.S. Akhter, S. and Maya, M.A. 2011. “Field resistance of chilli cultivars against anthracnose disease caused by *Colletotrichum capsica*.” *Thai Journal of Agricultural Science*. 44(4) : 243-250.
- Raja, H.A. Miller, A.N. Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. 2017. “Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community.” *Journal of Natural Products*. 80(3) : 756–770.
- Ramarathnam, R. Bo, S. Chen, Y. Fernando, W.G.D. Xuwen, G. and Kievit, T. 2007.

- “Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat.” *Canadian Journal of Microbiology*. 53 : 7.
- Reiter, L. Kolstø, A.B. and Piehler, A.P. 2011. “Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle.” *Journal of Microbiological*. 86 : 210–217.
- Richter, M. Rosselló-Móra, R. Glöckner, F.O. and Peplies, J. 2016. “JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison.” *Bioinformatics*. 32(6) : 929-31.
- Robledo, D. Hernández-Urcera, J. Cal, R.M. Pardo, B.G. Sánchez, L. Martínez P. and Viñas A. 2014. “Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset.” *BMC Genomics*. 15(1).
- Ruger, H.J. 1983. “Differentiation of *Bacillus globisporus*, *Bacillus marinus* comb. nov., *Bacillus aminovorans*, and *Bacillus insolitus*.” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33(2) : 157–161.
- Saccardo, P.A. 1880. “Conspectus generum fungorum italiae inferiorum.” *Michelia*. 2 : 1-135.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. 2008. “Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.” *Nature Protocols*. 3(6) : 1101–1108.
- Setlow, P. and Christie, G. 2020. “Bacterial spore mRNA – What’s Up with that?.” *Frontiers in Microbiology*. 11 : 596092.
- Snyder, W.C. and Hansen, H.N. 1940. “The species concept in *Fusarium*.” *American Journal of Botany*. 27(2) : 64–67.
- Srikhong, P. Lertmongkonthum, K. Sowanpreecha, R. and Rerngsamran, P. 2018. “*Bacillus* sp. strain M10 as a potential biocontrol agent protecting chili pepper and tomato fruits from anthracnose disease caused by *Colletotrichum capsica*.” *BioControl*. 63 : 833–842
- Sharma, G. and Shenoy, B.D. 2013. “*Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are

- involved in chilli anthracnose in India.” *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*. 47(10) : 1179–1194.
- Stein, T. 2005. “*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions.” *Molecular Microbiology*. 56 : 845–857.
- Sumpavapol, P. Tongyongk, L. Tanasupawat, S. Chokesajjawatee, N. Luxananil, P. and Visessanguan, W. 2010. “*Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60 : 2364-2370.
- Sun, J. Liu, Y. Lin, lu, z. and Lu Y. 2020. “CodY, ComA, DegU and Spo0A Controlling Lipopeptides Biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ.” *Authorea*.
- Sutton, B.C. 1992. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. International Mycological Institute, Colletotrichum: biology, pathology and control.
- Thompson, J. Higgins, D. and Gibson, T. 1994. “CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.” *Nucleic Acids Res*. 22: 4673–4690.
- Thornton, C.R. and Gilligan, C.A. 1999. “Quantification of the effect of the hyperparasite *Trichoderma harzianum* on the saprotrophic growth dynamics of *Rhizoctonia solani* in compost using a monoclonal antibody-based ELISA” *Mycological Research*. 103(4) : 443 – 448.
- Touré, Y. Ongena, M. Jacques, P. Guiro, A. and Thonart, P. 2004. “Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple.” *Journal of Applied Microbiology*. 96(5) : 1151-60.
- Vandesompele, J. Preter, K.D. Pattyn, F. Poppe, B. Roy, N.V. Paepe, A.D. and Speleman, F. 2002. “Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.” *Genome Biology* 3(7)
- Wang, P. Guo, Q. Ma, Y. Li, S. Lu, X. Zhang, X. Ma, P. 2015. “*degQ* regulates the production of fengycins and biofilm formation of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* NCD-2.” *Microbiological Research*. 178 : 42-50.

- Wong, M.L. and Medrano, J.F. 2005. “Real-time PCR for mRNA quantitation.” *BioTechniques*. 39(1) : 75–85.
- Xu, B.H. Ye, Z.W. Zheng, Q.W. Wei, T. Lin, J.F. and Guo, L.Q. 2018a. “Isolation and characterization of cyclic lipopeptides with broad-spectrum antimicrobial activity from *Bacillus siamensis* JFL15.” *Biotech*. 8 : 444.
- Xu, B.H. Lu, Y.Q. Ye, Z.W. Zheng, Q.W. Wei, T. Lin, J.F. and Guo, L.Q. 2018b. “Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15.” *PLOS ONE*. 13(8).
- Yaseen, Y. Gancel, F. Béchet, M. Drider D. and Jacques P. 2017. “Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production.” *Archives of Microbiology*. 199 : 1371–1382.
- Zhao, P. Quan, C. Wang, Y. Wang, J. and Fan, S. 2013. “*Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*.” *Journal of Basic Microbiology* 54(5) : 448–456.
- Zheng, Z.M. Wangb, T.P. and Wuc, Q. 2013. “Optimization of culture conditions for biosynthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* with starch.” *Applied Mechanics and Materials*. 291-294 : 225-229.
- Zhi, Y. Wu, Q. Xu, Y. 2017. “Production of surfactin from waste distillers’ grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains.” *Bioresource Technology*. 235 : 96–103.
- Zhu, Z. Peng, Q. Man, Y. Li, Z. Zhou, X. Bai, L. and Peng, D. 2020a. “Analysis of the antifungal properties of *Bacillus velezensis* B-4 through a bioassay and complete-genome sequencing.” *Frontiers in Genetics*. 11.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

##### 1.1 Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

##### 1.2 Nutrient broth (NB)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

##### 1.3 Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

##### 1.4 Mineral Salt Media (MSM)

Sucrose	20.0	กรัม
Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	2.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3.0	กรัม
Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10.0	กรัม
Magnesium Sulfate Heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.2	กรัม
Yeast extracts	0.2	กรัม
Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ )	50.0	ไมโครลิตร
Manganese (II) Sulfate Tetrahydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	50.0	ไมโครลิตร
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

โดยต้องเจือจาง Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) และ Manganese (II) Sulfate Tetrahydrate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ก่อน ดังนี้ ชั่งสารมา 0.01 กรัม ละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 10,000 เท่า จากนั้นดูดสารละลายมา 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร และผสม

ส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้เข้ากัน และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

## 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

### 2.2 Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	17.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้เข้ากัน และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววิญญา นวงษ์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ. 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	177 หมู่ 11 หมู่บ้านเพชรพลอย ซอย 8 ตำบล วังดาล อำเภอ กบินทร์บุรี จังหวัด ปราจีนบุรี รหัสไปรษณีย์ 25110
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2563 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.12 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษา ประเภททุนยกเว้นค่าธรรมเนียมแบบเหมาจ่าย คณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้