โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้ง *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าวโดยแอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย

ชื่อนิสิต นางสาวกุลจิรา จันแดง รหัสประจำตัว 6032304823

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้ง *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าวโดยแอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย

โดย

นางสาวกุลจิรา จันแดง

เลขประจำตัว 6032304823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้ง *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าวโดยแอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย
โดย	นางสาวกุลจิรา จันแดง รหัสนิสิต 6032304823
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2321499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความรู้ต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์มาตลอดการทำวิจัย รวมถึงอาจารย์ได้สอนใช้โปรแกรมอ้างอิงเอกสารที่ทำให้การทำงานสะดวกรวดเร็วมากขึ้น ตลอดจนให้กำลังใจ เอาใจใส่ ช่วยเหลือนิสิตในช่วงสถานการณ์โรคระบาด COVID-19 อย่างดีเสมอมา และกรุณาแก้ไขตรวจทาน ปรับปรุงให้โครงงานวิจัยนี้สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี-สิริศรัทธา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงงานวิจัย เพื่อให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน และคุณวัชรี จาดไร่ขิง เจ้าหน้าที่ที่คอยช่วยเหลือเตรียมสาร เตรียมอุปกรณ์ อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ สอนใช้งานอุปกรณ์ และช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ขอขอบคุณนางสาว ธัญณาพร สุนทรวารี และนางสาว นภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุขกันทำวิจัยมาในห้องปฏิบัติการ 1904/15 คอยเป็นกำลังใจให้กัน และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นมาโดยตลอด

ชื่อโครงการ สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้ง *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าวโดยแอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย

นิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวกุลจิรา จันแดง รหัสนิสิต 6032304823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle disease) ในข้าวส่งผลทำให้ผลผลิตเสียหายเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีสาเหตุจากราหลายชนิด วิธีควบคุมโรคเมล็ดด่างในข้าวด้วยสารเคมีส่งผลกระทบต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงนำเสนอวิธีควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แอนตะโกนิสติกแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ส่งเสริมการเจริญของพืช และยับยั้งราก่อโรคได้ โดยงานวิจัยประกอบด้วยการคัดแยกราก่อโรค, การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา และสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย จากการคัดแยกราก่อโรคจากตัวอย่างเมล็ดข้าวที่เป็นโรคเมล็ดด่าง แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าเป็น *Curvularia lunata* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดด่าง การทดสอบการยับยั้งโดยเทคนิคเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับราบนอาหารแข็ง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ 66.67% การทดสอบการยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรียและการยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ 100% และ 52.94% ตามลำดับ การยับยั้งราด้วยไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 สามารถผลิตไลเปสและโปรตีเอสได้ แต่ผลิตเซลลูเลสไม่ได้ การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แต่ไม่ผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA) และไม่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว พบว่า แบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มีความสามารถในการรักษา ป้องกัน และยับยั้งโรคเมล็ดด่างในข้าวได้ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นเชื้อควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างที่เกิดจาก *C. lunata* และช่วยตรึงไนโตรเจนให้กับข้าวได้

Project Title Plant growth promotion property and inhibition of *Curvularia lunata* that caused dirty panicle disease of rice by antagonistic bacteria

Student Name Miss Kuljira Chandang ID 6032304823

Advisor Assoc. Prof. Dr. Panan Rerngsamran

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Dirty panicle disease is the most significant factor limiting production of rice. It caused by several fungal phytopathogens results in damage of rice seeds. Controlling dirty panicle disease by synthetic chemical fungicides cause adverse impact on human health and public concern regarding environmental issues. This work proposed to use biological control method using antagonistic bacteria that is safe, able to promote plant growth, and can inhibit the fungal pathogen. The work composed of isolation of fungal pathogen, and determination of antifungal and plant growth promotion abilities by antagonistic bacteria. Isolation of fungal pathogen from rice with dirty panicle symptom, and then examination the basic morphology preliminary identified the fungus as *Curvularia lunata.* Dual culture method revealed that bacteria M25 MSCU 0242 exhibited potent *in vitro* inhibitory activity on mycelial growth against *C. lunata* at 66.67%. Fungal inhibition using extracellular metabolites and volatile compounds of bacteria showed that the pathogen growth inhibition was ranging from 100% and 52.94%, respectively. Bacteria M25 MSCU 0242 was able to produce lipase and protease, but not cellulase. The bacteria also showed ability to fix atmosphere nitrogen, but not ability to produce Indole-3- Acetic Acid (IAA) or to solubilize phosphate. By testing efficacy of bacteria strain M25 MSCU 0242 on rice seeds, the results demonstrated that the bacteria was able to treat, prevent, and inhibit dirty panicle disease on rice seeds. These results indicated that bacteria strain M25 MSCU 0242 has potential to be used as biological control agent to combat dirty panicle disease of rice caused by *C. lunata* and to assist nitrogen fixation for rice plant.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ข
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง.....10
2.1 แบคทีเรีย.....10
2.2 ราก่อโรคพืช.....10
2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยเทคนิค dual culture.....10
2.4 การทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา.....10
2.4.1 การยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย.....10
2.4.2 การยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย.....11
2.4.3 การยับยั้งราด้วยไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรีย.....11
2.4.3.1 การทดสอบการผลิตเซลลูเลส (cellulase).....11
2.4.3.2 การทดสอบการผลิตเพคทิเนส (pectinase).....11
2.4.3.3 การทดสอบการผลิตไลเปส (lipase).....11
2.4.3.4 การทดสอบการผลิตโปรตีเอส (protease).....12
2.4.3.5 การทดสอบการผลิตไคติเนส (chitinase).....12
2.5 การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย.....12
2.5.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA).....12
2.5.2 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต.....12
2.5.3 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน.....12
2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว.....12
2.6.1 การเตรียมเมล็ดข้าว.....12
2.6.2 การเตรียมราก่อโรค.....12
2.6.3 การทดสอบการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว.....13
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....14
3.1 การคัดแยกราก่อโรคพืช.....14
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยเทคนิค dual culture.....15

3.3 การทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา.....17
3.3.1 การยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย.....17
3.3.2 การยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย.....18
3.3.3 การยับยั้งราด้วยไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรีย.....18
3.3.3.1 การทดสอบการผลิตเซลลูเลส (cellulase).....18
3.3.3.2 การทดสอบการผลิตไลเปส (lipase).....19
3.3.3.3 การทดสอบการผลิตโปรตีเอส (protease).....19
3.4 การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย.....19
3.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA).....19
3.4.2 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต.....20
3.4.3 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน.....20
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว.....21
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....22
ภาคผนวก ก 25
ภาคผนวก ข 29
เอกสารอ้างอิง.....30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์.....15

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างในข้าวของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242...21

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 โรคเมล็ดด่างในข้าว.....2
รูปที่ 1.2 บทบาทของ IAA ต่อการพัฒนาของพืช.....6
รูปที่ 3.1 เมล็ดข้าวบน PDA ที่มีเตตร้าซัยคลิน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 9 วัน.....14
รูปที่ 3.2 ราที่แยกได้จนเป็นเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน.....14
รูปที่ 3.3 ราบริสุทธิ์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x40 เท่า.....15
รูปที่ 3.4 การเจริญของราในชุดควบคุม (ซ้าย) และชุดทดสอบ (ขวา) ด้วยเมแทบอไลต์ของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน.....17
รูปที่ 3.5 การเจริญของราด้านหลังเพลทในชุดควบคุม (ซ้าย) และชุดทดสอบ (ขวา) ด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน.....18
รูปที่ 3.6 การทดสอบการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC หลังจากราดด้วย 2 M HCl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน.....18
รูปที่ 3.7 การทดสอบการผลิตไลเปสบนอาหารแข็ง NA ที่ผสมน้ำมันพืชและมีนิวทรัลเรดเป็น pH indicator หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน.....19
รูปที่ 3.8 การทดสอบการผลิตโปรตีเอสบนอาหารแข็ง SA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน.....19
รูปที่ 3.9 การทดสอบการผลิต IAA ในชุดควบคุม (ซ้าย) และในชุดทดสอบ (ขวา) หลังผสมกับ สารละลาย Salkowski reagent และตั้งไว้ในที่มืด 5 นาที.....20
รูปที่ 3.10 การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน.....20
รูปที่ 3.11 การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NFM หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน.....20

บทที่ 1

ข้าวและโรคที่เกิดในข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย ซึ่งเกษตรกรปลูกข้าวทั้งเพื่อบริโภคในประเทศและเพื่อการส่งออก แต่อย่างไรก็ตาม เกษตรกรยังต้องเผชิญกับปัญหาโรคระบาดในต้นข้าวจากเชื้อที่ก่อโรคในต้นข้าวเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิต ต้นข้าวไม่แข็งแรง เมล็ดข้าวติดโรค ไม่สามารถรับประทานได้ รายได้ลดลงและผลผลิตไม่เพียงพอต่อผู้บริโภค (นิวัติ เจริญศิลป์ และคณะ, 2537) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกษตรกรต้องใช้การควบคุมโรคทางเคมี โดยใช้สารเคมีที่มีราคาแพง ส่งผลกระทบต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงต้องการควบคุมโรคระบาดในข้าวด้วยวิธีการทางชีวภาพ เพื่อทำให้ได้ข้าวที่มีคุณภาพ เพิ่มรายได้ของเกษตรกร

ข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* ซึ่งเป็นธัญพืชที่ประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย โดยจากข้อมูลเมื่อปีพุทธศักราช 2553 รายงานว่า ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองทั่วโลก รองจากข้าวโพด ต้นข้าวสามารถเจริญได้ถึง 1-1.8 เมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดินเป็นหลัก ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ใบข้าวมีลักษณะเรียว มีความยาว 50-100 เซนติเมตร และกว้าง 2-2.5 เซนติเมตร ช่อดอกห้อยยาว 30-50 เซนติเมตร และเมล็ดมีความยาว 5-12 มิลลิเมตร และหนา 2-3 มิลลิเมตร (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว, 2562) ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2470 เป็นต้นมา ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกข้าวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับ 2 ล้านตันต่อปี ในปีพุทธศักราช 2520 หรือมีอัตราเพิ่มเฉลี่ย 1 ล้านตันต่อปี ปีพุทธศักราช 2521-2545 การส่งออกข้าวเพิ่มขึ้นเป็น 5 ล้านตัน หรือเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 1 ล้านตันทุก ๆ 5 ปี โดยการส่งออกข้าวไทยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะนี้ดำเนินไปพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของประชากรจาก 11 ล้านคนในปีพุทธศักราช 2470 และพื้นที่ปลูกข้าวของไทยก็เพิ่มขึ้นจาก 16 ล้านไร่ในปีพุทธศักราช 2470 มาเป็น 61 ล้านไร่ในปีพุทธศักราช 2547 ซึ่งในปีพุทธศักราช 2546 ปริมาณการส่งออกข้าวไทยทำสถิติสูงที่สุด 7.597 ล้านตัน ทำรายได้ให้ประเทศไทย 76,368 ล้านบาท โดยส่งไปขายอยู่ในทวีปเอเชีย แอฟริกา ตะวันออกกลาง อเมริกา ยุโรป และโอเชียเนีย ตามลำดับ (มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2548)

โรคในข้าวเกิดได้จากหลายสาเหตุ สาเหตุของโรคในข้าวที่เกิดจากรา ได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot disease), โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown spot disease), โรคใบวงสีน้ำตาล (leaf scald disease), โรคกาบใบแห้ง (sheath blight disease), โรคกาบใบเน่า (sheath rot disease), โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle disease), โรคถอดฝักดาบ (bakanae disease), โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease), โรคกล้าเน่า (seedling rot disease), โรคลำต้นเน่า (stem rot disease) และโรคดอกกระถิน (false smut) สาเหตุของโรคในข้าวที่เกิดจากแบคทีเรียทำให้เกิดโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) และโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) สาเหตุของโรคในข้าวที่เกิดจากไวรัส ทำให้เกิดโรคใบหงิก (rice ragged stunt disease), โรคเขียวเตี้ย (grassy stunt

disease), โรคใบสีส้ม (rice tungro disease หรือ yellow orange leaf disease) และโรคหูด (gall dwarf) (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559a) ในงานวิจัยฉบับนี้สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคเมล็ดด่างในข้าว

โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle disease) พบมากในนาชลประทานในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยมีสาเหตุเกิดจากรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Curvularia lunata* (Wakk) Boed, *Cercospora oryzae* I. Miyake, *Bipolaris oryzae* Breda de Haan, *Fusarium semitectum* Berk & Rav, *Trichoconis padwickii* Ganguly ซึ่งมีชื่อเดิมคือ *Alternaria padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis และ *Sarocladium oryzae* Sawada อาการของโรคเมล็ดด่างแสดงในรูปที่ 1.1 ซึ่งจะปรากฏอาการในระยะออกรวงโดยจะเกิดแผลเป็นจุดสีน้ำตาลหรือดำที่เมล็ดบนรวงข้าว ซึ่งการเข้าทำลายของรามักจะเกิดในช่วงดอกข้าวเริ่มโผล่จากกาบหุ้มรวงจนถึงระยะเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนม และอาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัดในระยะใกล้เก็บเกี่ยว (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559b) และส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลง (นิวัติ เจริญศิลป์ และคณะ, 2537)

รูปที่ 1.1 โรคเมล็ดด่างในข้าว
ที่มา: (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559b)

การป้องกันโรคเมล็ดด่างในข้าว

วิธีการป้องกันโรคเมล็ดด่างในข้าวสามารถใช้สารเคมีคลุกหรือแช่เมล็ดข้าวก่อนนำไปปลูก เช่น แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน, สารละลายที่มีส่วนประกอบของปรอท, สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (กาญยานี โพนเบ้า, 2543) หรือฉีดพ่นสารฆ่าราเช่น โพรพิโคนาโซล โพรพิโคนาโซล + ไดฟีโนโคนาโซล หรือ โพรพิโคนาโซล + โพรคลอราซ หรือ คาร์เบนดาซิม + อีพ๊อกซี่โคนาโซล หรือ ฟูซิราซอล หรือ ทีบูโคนาโซล หรือ โพรคลอราซ + คาร์เบนดาซิม หรือ แมนโคเซบ หรือ คาร์เบนดาซิม + แมนโคเซบ (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559b) ซึ่งการใช้สารเคมีเหล่านี้จะส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนและตกค้างในข้าวทำให้เกิดปัญหาต่อผู้บริโภคได้ (Gupta, 2014) วิธีทางเลือกคือ การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียเพื่อยับยั้งจุลชีพก่อโรค แทนการใช้สารเคมีกำจัด (Jakobi และคณะ, 1996)

ตัวอย่างงานวิจัยของวิธีการควบคุมราโรคพืชโดยทางชีวภาพ เช่น งานวิจัยของ Ben Khedher และคณะ (2015) ใช้ *Bacillus subtilis* เพื่อยับยั้ง *Rhizoctonia* ซึ่งก่อโรคโคนเน่าและแผลสะเก็ดดำในมันฝรั่ง และพบว่าสามารถยับยั้งโรคได้ 63% และ 81% ตามลำดับ งานวิจัยของ Muthaiyan (2000) ใช้ *Pseudomonas fluorescens* เพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* :ซึ่งก่อโรคใบไหม้ในข้าว และพบว่ามีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งโรคได้ งานวิจัยของ Alsultan และคณะ (2019) ใช้ *Pseudomonas aeruginosa* กับ *Chryseobacterium proteolyticum* เพื่อยับยั้ง *Phytophthora palmivora* ซึ่งก่อโรคผลเน่าดำในโกโก้ และพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 100% และ 62.5% ตามลำดับ งานวิจัยของ Chen และคณะ (1995) ใช้ *Bacillus pumilus* JM-1128 ที่แยกได้จากต้นฝ้ายสามารถยับยั้งโรคเหี่ยวในฝ้ายได้ งานวิจัยของ Shimizu และคณะ (2009) พบว่า *Streptomyces* strain MBCu-56 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในแตงกวา ซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Colletotrichum orbiculare* ได้ถึง 93% งานวิจัยของ Rajamanickam และคณะ (2018) พบว่า *B. subtilis* CL3 มีฤทธิ์ยับยั้งโรคไรโซมเน่าในต้นกล้วยซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Pectobacterium carotovorum* ได้ งานวิจัยของ Vigani และคณะ (2013) พบว่า *Staphylococcus epidermidis* BC4 ที่แยกได้จากต้นมะเขือเทศสุขภาพดีสามารถลดโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศและช่วยเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศได้ งานวิจัยของ Chamani และคณะ (2020) พบว่าเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. สามารถใช้เป็นการควบคุมทางชีวภาพสำหรับโรครากเน่าในต้นเผือกที่มีสาเหตุจาก *Pythium myriotylum* ได้ งานวิจัยของ Chen และคณะ (2020) ใช้ *Bacillus velezensis* LHSB1 ซึ่งสามารถยับยั้งโรคลำต้นเน่าของต้นถั่วลิสงที่เกิดจาก *Sclerotium rolfsii* ได้ถึง 93.8% เป็นต้น

แอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย

แอนตะโกนิสติกแบคทีเรียคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญและแอกทิวิตีของอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง เช่น ยับยั้งราก่อโรคในพืช จึงสามารถใช้ในวิธีการควบคุมโรคทางชีวภาพได้ (Yaoting และคณะ, 2021)

กลไกที่แอนตะโกนิสติกแบคทีเรียใช้เพื่อยับยั้งราก่อโรคพืชมีหลายกลไก ได้แก่ การแข่งขัน การเป็นปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ และการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค การยับยั้งการเจริญด้วยกลไกต่าง ๆ เหล่านี้อาจเกิดจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะ เช่น 2,4-ไดอะซีทิลโฟโรกลูซินอล, ฟีนาซีน-1-คาร์บอกซิลิกแอซิด หรือเกิดจากเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของรา เช่น ไคติเนส โปรตีเอส เซลลูเลส เพคติเนส และไลเปส (Whipps, 2001)

1. กลไกการแข่งขัน เมื่อจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์มาอยู่ร่วมกันจะเกิดจากแข่งขันกันเพื่อแย่งทรัพยากรต่าง ๆ เช่น สารอาหาร ออกซิเจน น้ำ หรือแข่งขันกันครอบครองพื้นที่ โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อีกชนิดได้ เพราะทำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแข่งขันได้น้อยกว่า ครอบครองพื้นที่ได้น้อย เจริญเติบโตได้น้อยลง และก่อโรคไม่ได้ เช่น *Brevibacterium halotolerans* JZ7 ที่แยกได้จากรากของต้นพุทราจีนมีความสามารถในการครอบครองรากของต้นพุทราจีนได้ โดยพบว่ามีแบคทีเรีย

อยู่ถึง 4.9 X 10^5 CFU ต่อกรัมของน้ำหนักรากสด ซึ่งสามารถยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในต้นพุทราจีนได้ (Wang และคณะ, 2021)

2. กลไกการเป็นปรสิต คือ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเข้าไปทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่ง เช่น เข้าไปรุกรานเจริญภายในเซลล์ ทำลายโครงสร้างหรือส่วนประกอบต่าง ๆ ทำให้จุลินทรีย์ที่ถูกรุกรานไม่สามารถเจริญเติบโตหรือก่อโรคได้ เช่น *Streptomyces* J-2 สามารถเข้าไปยับยั้งการงอกและการเจริญของสายใย *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในต้นหัวผักกาดได้ 100% และ 80% ตามลำดับ (Errakhi และคณะ, 2009)
3. กลไกการสร้างสารปฏิชีวนะ คือ กลไกที่จุลินทรีย์สามารถผลิตสารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่งได้โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น งานวิจัยของ Huang และคณะ (2018) พบว่า *Pseudomonas chlororaphis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะไพร์โรลนิทริน (pyrrolnitrin) ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นราก่อโรคในพืชได้
4. การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค โดยจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถชักนำพืชให้ต้านทานโรคได้ โดยทำให้พืชผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค, สังเคราะห์ไลติกเอมไซม์, สะสมลิกนิน, สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และฆ่าตัวตายของเซลล์เมื่อเกิดการรุกราน ยกตัวอย่างเช่น *Penicillium simplicissimum* GP17-2 สามารถชักนำให้ใบของต้นแตงกวาทนทานต่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, การสร้างลิกนิน, การเก็บสะสมกรดซาลิไซลิก, การเพิ่มการถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไคติเนสและเพอร์ออกซิเดส (Shimizu และคณะ, 2013)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรไลซิสเอนไซม์ เช่น ไคติเนส, โปรตีเอส, เซลลูเลส, เพคติเนส, และไลเปส นอกจากจะช่วยย่อยสลายองค์ประกอบอินทรีย์วัตถุให้กลายเป็นอินทรีย์วัตถุที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ และอยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของพืชแล้ว ยังส่งเสริมการเจริญของพืชทางอ้อมโดยการทำลายเชื้อก่อโรคพืชพวกราที่มีโครงสร้างประกอบด้วยไคตินด้วย (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการย่อยไคติน ซึ่งเป็นชีวโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล *N*-อะซีทิลกลูโคซามีน ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก โดยไคติเนสจะเข้าไปสลายพันธะนี้ ซึ่งไคติเนสสามารถพบได้ในแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด (มณฑารพ ยมาภัย, 2554) งานวิจัยของ Sikorski และคณะ (2009) พบว่า *Bacillus cereus* มีความสามารถผลิตไคติเนสซึ่งใช้ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pythium ultimum* ได้ งานวิจัยของ Herring (1979) นำยีนที่ประมวลรหัสไคติเนสจากต้นข้าวโคลนเข้าไปที่ต้นแตงกวา พบว่าต้นแตงกวาที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมนี้สามารถต้านทาน *B. cinerea* ที่เป็นราก่อโรคในแตงกวาได้

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนและพอลิเปปไทด์สายสั้น ๆ โดยสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด เช่น แบคทีเรีย, รา, และพืช (Gupta และคณะ, 2002) แบคทีเรียในสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ปริมาณสูงกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น (พิมล จำนงค์, 2547) งานวิจัยของ Hammami และคณะ (2013) พบว่าฟลูออเรสเซนต์ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมะเขือเทศและต้นพริกไทยสามารถผลิตโปรตีเอสได้ และสามารถยับยั้ง *Sclerotinia sclerotiorum* ที่เป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าในต้นมะเขือเทศได้ งานวิจัยของ Du และคณะ (2017) พบว่า *Paenibacillus polymyxa* NSY50 ที่แยกได้จากของเสียที่เกิดจากการหมักน้ำสัมสายชูสามารถผลิตโปรตีเอสได้ และยับยั้งโรคเหี่ยวในต้นแตงกวาได้

เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase), เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเซลโลไบเอส (cellbiase) (Juturu และ Wu, 2014) โดยเอนโดกลูคาเนสจะย่อยเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างผลึกให้เป็นสายยาวของเซลลูโลส ต่อมาเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะย่อยสายเซลลูโลสให้เป็นเซลโลไบโอส และเซลโลไบเอสจะทำงานต่อโดยย่อยเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป (Lu และ Mosier, 2007) งานวิจัยของ Wang และคณะ (2020) พบว่า *P. aeruginosa* CQ-40 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชของต้นมะเขือเทศ มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ และมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cinerea* ซึ่งเป็นราก่อโรคที่ทำให้คุณภาพผลผลิตและน้ำหนักของมะเขือเทศลดลง

เพคติเนสคือ เอนไซม์ย่อยสลายเพคติน ซึ่งเพคติเนสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์และพืชชั้นสูงหลายชนิด โดยจะไปกระตุ้นการตัดพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก ในเพคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของพืชให้ได้เป็นพอลิเมอร์สายสั้น ๆ (Carpita และ Gibeaut, 1993)

ไลเปสคือ เอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยไขมัน โดยไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันมาต่อกัน (Sztrolovics และคณะ, 1997) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) (Mitsuhashi และคณะ, 1999) ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียไอโซเลต BAN53 ที่คัดแยกได้จากเกาะบาแรน ประเทศอินเดีย มีความสามารถในการผลิตเอมไซม์ไลเปส และมีฤทธิ์ยับยั้ง *Macrophomina* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นราก่อโรคในพืช (Amaresan และคณะ, 2014)

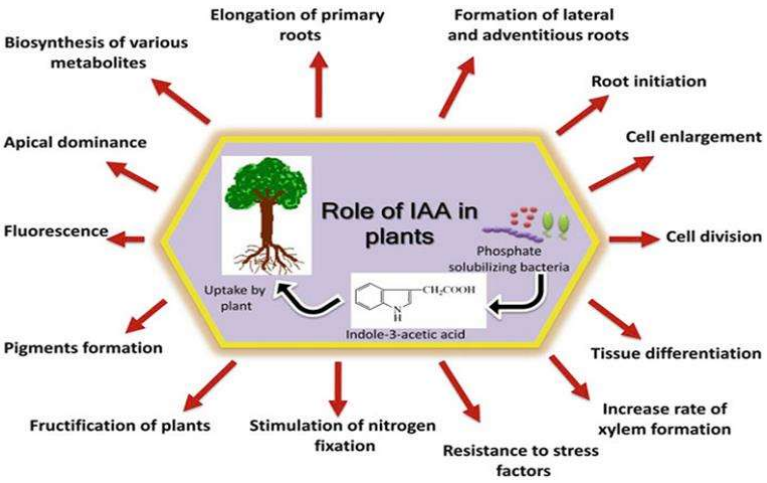
แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา สารระเหยที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ความดันไอสูง ระเหยในอากาศได้ง่ายและละลายน้ำได้น้อย โดยสารนี้สามารถใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 และ *Bacillus artrophaeus* LSSC22 สามารถผลิตสารระเหยได้ คือ เบนซัลดีไฮด์, 1,2-เบนซิโซไธอะซอล-3(2 H)-โอน และ 1,3-บิวทาไดอีน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Ralstonia solanacearum* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในต้นยาสูบได้ (Tahir และคณะ, 2017) *Chryseobacterium proteolyticum* และ *P. aeruginosa* สามารถผลิตสารระเหย เช่น อีโคแซน (eicosane), เฮกซะไตรอะคอนเทน, เตตระเตตระคอนเทน ซึ่งไปยับยั้งโรคผลเน่าดำในต้นโกโก้ได้ (Alsultan และคณะ, 2019)

แบคทีเรียที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช

แบคทีเรียบางชนิดมีสมบัติที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เรียกว่า plant-growth-promoting bacteria (PGPB) ซึ่งคือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิตฮอร์โมนพืช, วิตามิน หรือกรดอะมิโน ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้พืชเจริญงอกงามได้ดี เช่น มีผลต่อการขยายขนาดของเซลล์ การเร่งเมล็ดให้งอก การก่อให้เนื้อเยื่อผลิตราก ช่วยการแบ่งเซลล์ของพืช ช่วยการออกดอก พัฒนาดอก และการเจริญของผลจนกระทั่งการแก่และสุก การชะลอความแก่ของใบ เพิ่มความต้านทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมของพืช และช่วยรักษาสมดุลของการเจริญเติบโต (Russell, 1977) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ PGPB กลุ่มที่ดำรงชีวิตอิสระ (free-living bacteria หรือ extracellular PGPR, ePGPR) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างอิสระภายนอกเซลล์พืช (วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ, 2561) และ PGPB กลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช (intracellular PGPR, iPGPR) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในรากโดยเฉพาะปมราก (Figueiredo และคณะ, 2010) หรืออาจจะแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อพืช เช่น อาศัยในชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) (Taghavi และคณะ, 2009) หรือในท่อลำเลียงน้ำของพืช (xylem) (Hayat และคณะ, 2010) สมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีดังนี้

<u>สมบัติการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)</u>

indole-3-acetic acid (IAA) เป็นฮอร์โมนพืช (phytohormone) ในกลุ่มออกซิน (auxin) ที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งช่วยในการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) การแบ่งเซลล์ (cell division) การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (differentiation) และการงอกของเมล็ด (germination) และบทบาทอื่นดังแสดงในรูปที่ 1.2 ตำแหน่งของพืชที่มีการสังเคราะห์ออกซินได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดและปลายราก ใบอ่อน ช่อดอกที่กำลังเจริญ เมล็ดที่กำลังงอก เอ็มบริโอ และผลที่กำลังเจริญ (วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ, 2561)



รูปที่ 1.2 บทบาทของ IAA ต่อการพัฒนาของพืช

ที่มา: (Oves และคณะ, 2013)

จุลินทรีย์มากกว่า 80% ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียจะเริ่มจากในช่วงที่พืชกำลังเจริญเติบโต โดยพืชจะปล่อยสารประกอบอินทรีย์ออกจากรากพืช สารนั้นจะมีความหลากหลายของสารประกอบทางเคมี ขึ้นอยู่กับลักษณะสายพันธุ์ของพืชและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เข้าไปอาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช สารประกอบอินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ, กรดอะมิโน, น้ำตาลชนิดต่าง ๆ, พอลิแซ็กคาไรด์ และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ, 2561) สารประกอบเหล่านี้มีสมบัติเป็นแหล่งพลังงานและสารกระตุ้นการเติบโต (growth factor) เมื่อพืชปล่อยสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ออกมา แบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบรากพืชก็จะใช้ทริปโตแฟนที่ถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกันเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน IAA ให้แก่พืช (Bernard, 1995) งานวิจัยของ เนตรนภา อินสลุด และคณะ (2558) นำแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้ ซึ่งได้แก่ *Brevibacillus* borstelensis, *Bacillus megaterium* และ *Brevicacillus agri* มาทดสอบสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว โดยปลูกข้าวในดินผสมกับแบคทีเรีย พบว่าข้าวมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 59%-415% งานวิจัยของ จีราภรณ์ อินทสาร และคณะ (2560) คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ จังหวัดเชียงราย พบแบคทีเรียทั้งหมด 57 ไอโซเลต ซึ่งมีแบคทีเรีย 15 ไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้อยู่ในช่วง 20-126 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร โดย *Brevicacillus agri* สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุด จึงนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญในต้นพริกขี้หนู พบว่าต้นพริกขี้หนูสูงขึ้น ความยากรากมากขึ้น จำนวนใบมากขึ้น และน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยของ Suzuki และคณะ (2003) พบว่า *P. fluorescens* HP72 สามารถผลิต IAA ได้ ทำให้ยับยั้งโรคลำต้นสีน้ำตาลในต้นหญ้าได้ งานวิจัยของ Gautam และคณะ (2019) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิต IAA ได้ 27 μg ml^{-1} และไปยับยั้ง *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะเขือเทศ

<u>สมบัติการละลายฟอสเฟต</u>

แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้โดยการละลายฟอสเฟต หรือ phosphate solubilizing bacteria (PSB) เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ ทั้งนี้เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับธาตุไนโตรเจนและโพแทสเซียม โดยฟอสฟอรัสจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ซึ่งทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอต่างมีหน้าที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของพืช เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์และผลิตโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเมล็ดพืช รวมถึงการงอกของเมล็ด (Nair, 2002) และยังเกี่ยวข้องตั้งแต่การเจริญเติบโตของรากจนถึงการออกดอกออกผลด้วย (วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ, 2561) โดยส่วนใหญ่แล้ว ธาตุฟอสฟอรัสมีปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช เพราะในดินมีฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมได้ในปริมาณน้อยมาก โดยมีเพียงประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อดิน 1 กิโลกรัม (Richardson และคณะ, 2009) รูปของฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปฟอสเฟตที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้

ซึ่งถ้าพืชได้รับฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ จะส่งผลให้พืชเป็นโรคง่าย แคระแกร็น โตช้า ปล้องสั้น แตกหน่อลดลง ใบกลายเป็นสีม่วง ขอบใบแห้ง (ณัฐนรี ไวมาตย์ และคณะ, 2563) และคุณภาพของเมล็ดลดต่ำลง การติดดอกติดผลต่ำ ซึ่งอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้น เมื่อพืชมีปริมาณฟอสฟอรัสน้อยกว่า 0.2% (Nair, 2002) ถ้ามีแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต เปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้กลายเป็นฟอสฟอรัส พืชจะนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น และส่งผลทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น การแก้ปัญหาพืชขาดฟอสฟอรัสโดยการใส่ปุ๋ย ทำให้เกิดปัญหาตามมา เพราะฟอสฟอรัสจะไปทำปฏิกิริยากับแร่ในดิน ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้น้อยมาก ส่งผลให้พืชนำธาตุนี้ไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ (White, 2009) เพราะเกิดการตรึงฟอสเฟตในดิน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ การตรึงฟอสเฟตทางชีวภาพ (biologically phosphate fixation) และการตรึงฟอสเฟตทางเคมี (chemically phosphate fixation) (ชัยฤกษ์ สุวรรณรัตน์, 2531) การตรึงฟอสเฟตทางชีวภาพ หมายถึง การเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตจากรูปฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชไปสู่รูปฟอสฟอรัสอินทรีย์ในสิ่งมีชีวิต เช่น ฟอสฟอรัสไปสะสมอยู่ในแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียตาย ฟอสฟอรัสจึงถูกปล่อยออกมา ดังนั้นวิธีทางชีวภาพนี้ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อพืช แต่จะเป็นแหล่งสำรองของฟอสเฟตที่จะปลดปล่อยออกมาภายหลัง การตรึงฟอสเฟตทางเคมี หมายถึง ฟอสฟอรัสเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับกับแร่ธาตุอื่น เช่น เหล็กและแคลเซียม หลังจากนั้นจะจับกันตกตะกอน ซึ่งวิธีการทางเคมีนี้ส่งผลเสียต่อพืช (วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ, 2561)

กลไกในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน งานวิจัยของ Sadia และคณะ (2002) พบว่าบริเวณรากข้าวโพดมีแบคทีเรียที่มีสมบัติในการละลายฟอสเฟตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการผลิตกรดซิตริกและกรดออกซะลิก งานวิจัยของ Yu และคณะ (2011) แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* และ *Burkhoderia* มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ งานวิจัยของ Tilak และคณะ (2005) พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรอบรากพืช (rhizosphere) ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Bacillus* มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณอื่น (non-rhizosphere) งานวิจัยของ เกตน์ณนิภา วันชัย (2556) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินในนาข้าว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ pikovskaya agar พบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต ทั้งหมด 45 ไอโซเลต โดยสายพันธุ์ที่ดีที่สุด สามารถละลายฟอสเฟตได้ถึง 187.0 มิลลิกรัมฟอสเฟต/ลิตร งานวิจัยของ Schoebitz และคณะ (2013) นำแบคทีเรียที่ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการละลายฟอสเฟตมาตรึงบนเม็ดบีดอัลจิเนต และนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับต้นข้าวสาลี พบว่าต้นข้าวสาลีเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีปริมาณการดูดซึมฟอสเฟตสูงถึง 64% งานวิจัยของ Zhao และคณะ (2014) นำดินบริเวณรอบรากข้าวโพดมาคัดแยกหาแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ พบว่ามี 12 ไอโซเลตที่ละลายฟอสเฟตได้ โดยมีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตที่ละลายฟอสเฟตได้มากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ถึง 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมานำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ระบุได้ว่าเป็น *Burkholderia cepucia* งานวิจัยของ Chamani และคณะ (2015) ได้นำ *P. fluorescens* และ *Pseudomonas putida* มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว โดยที่เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการ

ละลายฟอสเฟตได้ พบว่าเมื่อนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไปทำการทดสอบร่วมกัน จะละลายฟอสเฟตให้ต้นข้าวได้มากขึ้น งานวิจัยของ Stephen และคณะ (2015) คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Glucona cetobacter* sp. และ *Burkholderia* sp. ได้จากดินบริเวณรอบรากพืช แล้วนำมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในระดับกระถาง เมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแปลงฟอสเฟตจากรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ และข้าวสามารถนำฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ทำให้ได้ผลผลิตข้าวที่มีน้ำหนักมากขึ้น

<u>สมบัติการตรึงไนโตรเจน</u>

สมบัติอีกประการที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชคือ การตรึงไนโตรเจน พืชที่ได้รับปริมาณธาตุไนโตรเจนอย่างเพียงพอจะมีใบสีเขียวสด แข็งแรง และโตเร็ว แต่เมื่อขาดธาตุไนโตรเจนจะส่งผลให้ลำต้นแคระแกร็นและผลผลิตลดลง โดยในข้าวจะพบอาการขาดธาตุไนโตรเจนในระยะข้าวแตกกอ และระยะกำเนิดช่อดอกซึ่งเป็นระยะที่ข้าวมีความต้องการธาตุไนโตรเจนสูง จึงเป็นสาเหตุให้ผลผลิตข้าวลดลง การแก้ปัญหาด้วยวิธีการทางเคมี โดยการใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณสูงจะส่งผลให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสภาพแวดล้อม ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ถ้าข้าวได้รับปริมาณไนโตรเจนในปริมาณมากเกินไปจะทำให้ลำต้นของต้นอ่อนข้าวล้มและราก่อโรคเข้าทำลายได้ง่าย (เฉลิมเกียรติ อุนะพานัก และคณะ, 2557) แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชที่เจริญในภาวะที่ขาดไนโตรเจนได้

งานวิจัยของ Peng และคณะ (2006) คัดแยกแบคทีเรียจากส่วนรากและลำต้นของหญ้าได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต โดยใช้อาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน และใช้การสอบวิเคราะห์การรีดักชันของอะเซทิลีนในการตรวจสอบว่าแบคทีเรียเหล่านั้นมีสายพันธุ์ใดบ้างที่ตรึงไนโตรเจนได้ และรวมทั้งตรวจสอบยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างไนโตรจีเนสของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน พบว่าเป็นแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Azospirillum* งานวิจัยของ ประไพ ทองระอาและสมปอง หมื่นแจ้ง (2548) ได้คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากข้าวนาสวนของประเทศไทยด้วยวิธี microbial community structure จากยีน *nifH* พบว่าได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 8 สกุลคือ *Clostridium, Rhizobium, Vibrio, Methylomonas, Nostoc, Azoarcus, Klebsiella* และ *Desulfobacter* งานวิจัยของ Pham และคณะ (2017) พบว่า *Pseudomonas stutzeri* A15 มีสมบัติในการช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช โดยการตรึงไนโตรเจน เมื่อนำแบคทีเรีย *P. stutzeri* A15 ใส่ลงในเมล็ดข้าว ข้าวจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับแบคทีเรียนี้

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อแยก *C. lunata* จากเมล็ดข้าวที่เป็นโรคเมล็ดด่าง จากนั้นทดสอบการยับยั้งราโดยใช้แบคทีเรียที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถยับยั้งราหลายชนิดที่ก่อโรคในพืชได้ (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549; ดรุณี จิวเจริญ, 2552) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อนำไปศึกษาสมบัติในการยับยั้งราและสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งแบบ *in vitro* และ *in planta* โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้แอนตะโกนิสติกแบคทีเรียซึ่งยับยั้ง *C. lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในเมล็ดข้าว และสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวได้

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 แบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์จากคลังเก็บเชื้อจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 ราก่อโรคพืช

แยกราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว ด้วยเทคนิค direct plating โดยเริ่มจากนำเมล็ดข้าวที่เป็นโรคเมล็ดด่างมาล้างด้วย 70% เอธานอล เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นวางเมล็ดข้าวบนอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก3) ที่มีเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 9 วัน แล้วแยกราจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของราด้วยเทคนิค cellotape flag (Agut, 2001) โดยเริ่มจากหยด lacto phenol cotton blue 1 หยด ลงบนสไลด์ แล้วนำเทปใสที่มีความยาว 2 เซนติเมตร มาพันที่ปลายด้านหนึ่งของแท่งไม้ (wooden applicator stick) จากนั้นนำเทปใสด้านที่มีกาวแตะลงบนผิวหน้าของราบนเพลทอาหารแข็ง PDA เพื่อให้เส้นใยและสปอร์ติดบนเทปใส หลังจากนั้นหยด 95% เอธานอล 1 หยด ลงบนเทปใสด้านที่มีราเพื่อลดแรงตึงผิว แล้วนำเทปใสวางลงบนสไสด์ที่หยด lacto phenol cotton blue ไว้ จากนั้นดึงแท่งไม้ออกจากเทปใส ต่อมาหยด lacto phenol cotton blue อีก 1 หยด ลงบนเทปใส แล้วปิดด้วย cover slip นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของราเพื่อระบุสายพันธุ์เบื้องต้น

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยเทคนิค dual culture

เลี้ยงราบนอาหารแข็ง PDA จากนั้นเจาะวุ้นบริเวณที่มีราเจริญด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำมาวางบนอาหารแข็ง PDA จากนั้นขีดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จากข้อ 1 ลงไป โดยให้มีระยะห่างจากรา 3 เซนติเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-9 วัน แล้วสังเกตผลการยับยั้ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ขีดแบคทีเรีย และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา (Skidmore และ Dickinson, 1976)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา} = \frac{\text{รัศมีการเจริญของราในชุดควบคุม} - \text{รัศมีการเจริญของราในชุดทดสอบ}}{\text{รัศมีการเจริญของราในชุดควบคุม}} \times 100$$

2.4 การทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา

2.4.1 การยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุดจากการทดลองโดยเทคนิค dual culture จากข้อ 3 แล้วเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่ 1% ของแบคทีเรียที่เตรียมไว้นี้ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำส่วนใสมากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงผสมส่วนใสที่ได้ลงในอาหาร PDA ที่มีความเข้มข้น 2 เท่าในขณะที่ PDA ยังหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส โดยผสมที่สัดส่วน 1:1 หลังจากนั้นเทเพลท รอให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงนำชิ้นวุ้นของราก่อโรคเมล็ดด่างที่เจาะด้วย cork borer วางลงบนตรงกลางเพลท ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมส่วนใสจากแบคทีเรีย บันทึกผลการทดลองและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา

2.4.2 การยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย

นำชิ้นวุ้นของราก่อโรคเมล็ดด่างที่เจาะด้วย cork borer วางลงบนตรงกลางเพลทอาหารแข็ง PDA ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง LB แล้วนำเพลททั้งสองมาประกบกัน หลังจากนั้นพันเพลททั้งคู่ด้วยพาราฟฟิล์ม บ่ม 11 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้เพลทที่มีราอยู่ด้านบน ส่วนเพลทที่มีแบคทีเรียอยู่ด้านล่าง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุมที่ประกบกับเพลทอาหารแข็ง LB ที่ไม่มีแบคทีเรีย บันทึกผลการทดลอง และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา

2.4.3 การยับยั้งราด้วยไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรีย

2.4.3.1 การทดสอบการผลิตเซลลูเลส (cellulase)

ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Carboxy Methyl Cellulose (CMC) (ภาคผนวก ก4) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วราดด้วย 2M HCl จากนั้นสังเกตโซนใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนี

2.4.3.2 การทดสอบการผลิตเพคทิเนส (pectinase)

ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Crystal Violet Pectate (CVP) (ภาคผนวก ก5) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตโซนใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนี

2.4.3.3 การทดสอบการผลิตไลเปส (lipase)

ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Lipase Agar (LA) (ภาคผนวก ก6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ neutral red บริเวณหยดน้ำมันใต้โคโลนีของแบคทีเรีย

2.4.3.4 การทดสอบการผลิตโปรตีเอส (protease)

ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Skim Milk Agar (SA) (ภาคผนวก ก7) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตโซนใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนี

2.4.3.5 การทดสอบการผลิตไคติเนส (chitinase)

ขีดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Chitin Agar (CA) (ภาคผนวก ก8) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตโซนใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนี

2.5 การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย

2.5.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA)

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เพื่อนำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย Salkowski reagent (ภาคผนวก ข1) 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืด 25 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้น แสดงว่ามีการสร้าง IAA ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.5.2 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Pikovskaya agar (PVK) (ภาคผนวก ก9) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตโซนใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนี

2.5.3 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็งที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน Nitrogen free medium (NFM) (ภาคผนวก ก10) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วสังเกตการเจริญของแบคทีเรีย

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว

2.6.1 การเตรียมเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์สังข์หยด พัทลุง มาล้างด้วย 70% เอธานอล เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งเมล็ดข้าวให้แห้งในจานแก้วปลอดเชื้อ

2.6.2 การเตรียมราก่อโรค

เลี้ยงราก่อโรคบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน แล้วเก็บสปอร์ราโดยใส่น้ำกลั่นลงในเพลท จากนั้นขูดสปอร์ของราด้วยลูปเพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ของราสำหรับนำไปใช้ต่อไป

2.6.3 การทดสอบการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว

ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคในเพลทแบบ 24 หลุม โดยใส่เมล็ดข้าว 1 เมล็ด ลงในแต่ละหลุม และมีทรีทเมนต์ต่าง ๆ (อย่างละ 4 ซ้ำ) ดังนี้

- ชุดควบคุมผลลบ: ใส่น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร
- ชุดควบคุมการเกิดโรค: ใส่ราก่อโรค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ชุดควบคุมโดยใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย: ใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ชุดทดสอบการรักษาการเกิดโรค: ใส่ราก่อโรค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ชุดทดสอบการป้องกันการเกิดโรค: ใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่ราก่อโรค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ชุดทดสอบการยับยั้งการเกิดโรค: ใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และราก่อโรค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมกัน

บ่มเพลท 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสังเกตการเกิดโรคเมล็ดด่างบนเมล็ดข้าว

บทที่ 3

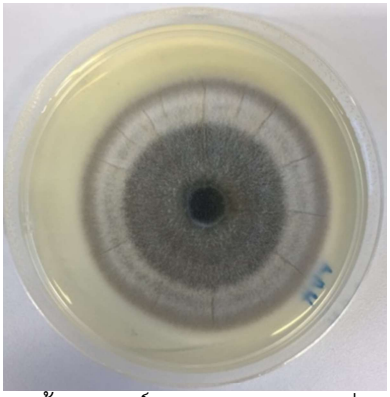
ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกราก่อโรคพืช

เมื่อแยกราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าวด้วยเทคนิค direct plating โดยเริ่มจากนำเมล็ดข้าว 5 เมล็ด ที่เป็นโรคเมล็ดด่างมาทำให้ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นวางเมล็ดข้าวบนอาหารแข็ง PDA ที่มีเตตร้าซัยคลิน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 9 วัน ได้ผลดังรูปที่ 3.1 พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีเทาและโคโลนีสีดำเป็นวงกว้าง มีโคโลนีสีเขียวเป็นจุดเล็ก ๆ มีราสีขาวปนสีส้มฟุ้งกระจาย

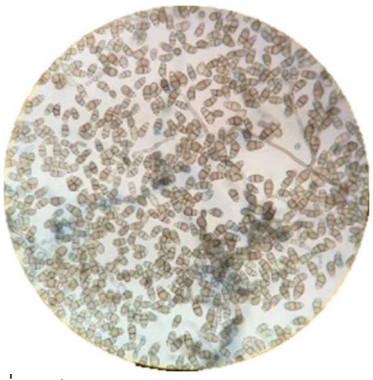
รูปที่ 3.1 เมล็ดข้าวบน PDA ที่มีเตตร้าซัยคลิน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 9 วัน

หลังจากนั้นแยกราจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ พบว่าลักษณะโคโลนีมีสีเทา ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ราที่แยกได้จนเป็นเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

จากนั้นระบุสายพันธุ์โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x40 เท่า ได้ผลดังรูปที่ 3.3 ซึ่งพบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นสีดำ ขอบเทา ความหนาของเส้นใยมีความสม่ำเสมอกัน คอนิเดียมีลักษณะเฉพาะของ *Curvularia* คือ มีลักษณะเป็นสปอร์สีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง ภายในมี 3-5 เซลล์ ซึ่งเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น ๆ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้ จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าเป็น *Curvularia lunata*



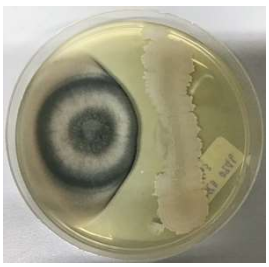
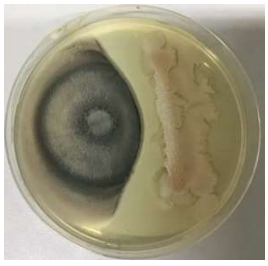
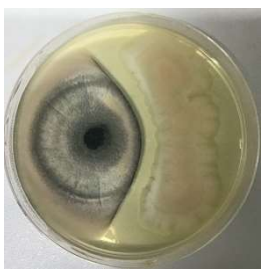
รูปที่ 3.3 ราบริสุทธิ์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x40 เท่า

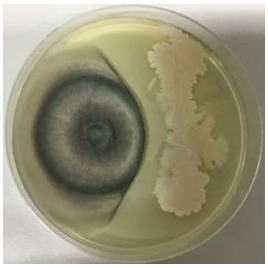
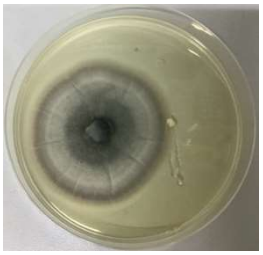
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยเทคนิค dual culture

เมื่อวางชิ้นวุ้นของราก่อโรคให้มีระยะห่างจากรอยขีดของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ 3 เซนติเมตร แล้วสังเกตผลการยับยั้ง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ใช้ทดสอบการยับยั้งด้านที่แคบที่สุดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ขีดแบคทีเรียทดสอบ แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 โดยให้ค่าการยับยั้งอยู่ที่ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้มี 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคพืชได้ โดยให้ค่าการยับยั้ง 0.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ TU13-9 MSCU 0693 และ N9 MSCU 0237

ตารางที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา	การยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยแบคทีเรีย
1. M27 MSCU 0244	60.00%	
2. TW1-1 ng MSCU 0694	38.89%	
3. M10 MSCU 0695	64.44%	

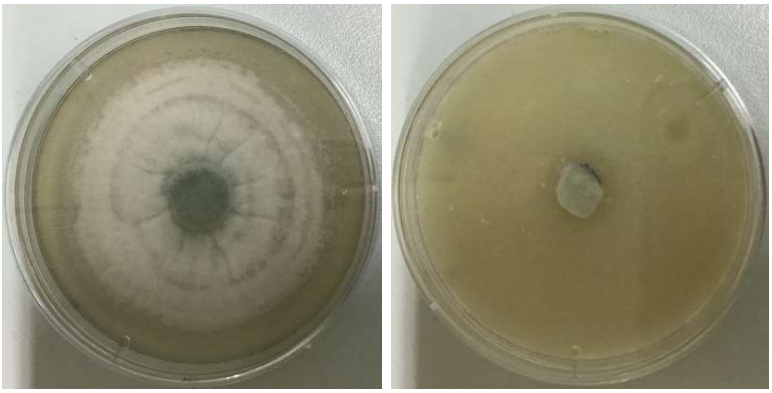
สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา	การยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยแบคทีเรีย
4. M25 MSCU 0242	66.67%	
5. M26 MSCU 0243	55.56%	
6. N3 MSCU 0236	65.56%	
7. M22 MSCU 0246	60.00%	
8. TD12-11 MSCU 0692	41.56%	
9. N1 MSCU 0235	59.33%	

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา	การยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยแบคทีเรีย
10. M23 MSCU 0241	62.22%	
11. TU13-9 MSCU 0693	0.00%	
12. N9 MSCU 0237	0.00%	

3.3 การทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา

3.3.1 การยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย

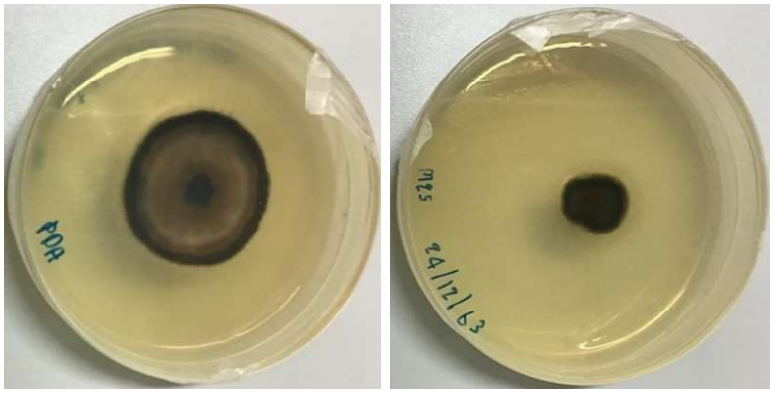
เมื่อนำชิ้นวุ้นของราวางลงตรงกลางเพลทอาหารแข็ง PDA ที่ผสมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 พบว่ามีค่าการยับยั้งรา 100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ *C. lunata* ไม่สามารถเจริญได้ ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การเจริญของราในชุดควบคุม (ซ้าย) และชุดทดสอบ (ขวา) ด้วยเมแทบอไลต์ของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน

3.3.2 การยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย

เมื่อนำชิ้นวุ้นของราวางลงบนตรงกลางเพลทอาหารแข็ง PDA และขีดแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 ลงบนอาหารแข็ง LB จากนั้นนำเพลททั้งสองมาประกบกัน หลังจากบ่มที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน ได้ผลดังรูปที่ 3.5 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งราได้ 52.94 เปอร์เซ็นต์

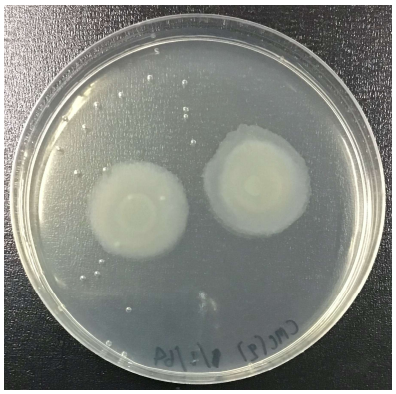


รูปที่ 3.5 การเจริญของราด้านหลังเพลทในชุดควบคุม (ซ้าย) และชุดทดสอบ (ขวา) ด้วยสารระเหยของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน

3.3.3 การยับยั้งราด้วยไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรีย

3.3.3.1 การทดสอบการผลิตเซลลูเลส (cellulase)

เมื่อนำแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Carboxy Methyl Cellulose (CMC) แล้วราดด้วย 2 M HCl พบว่าไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถผลิตเซลลูเลส ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การทดสอบการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC หลังจากราดด้วย 2 M HCl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน

3.3.3.2 การทดสอบการผลิตไลเปส (lipase)

เมื่อนำแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA ที่ผสมน้ำมันพืชและมีนิวทรัลเรดเป็น pH indicator พบว่าเกิดจุดสีแดงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 3.7 ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสได้

รูปที่ 3.7 การทดสอบการผลิตไลเปสบนอาหารแข็ง NA ที่ผสมน้ำมันพืชและมีนิวทรัลเรดเป็น pH indicator หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน

3.3.3.3 การทดสอบการผลิตโปรตีเอส (protease)

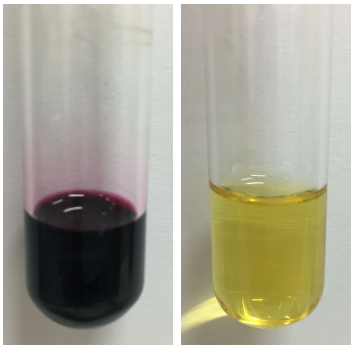
เมื่อนำแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Skim Milk Agar (SA) พบว่าเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี ดังรูปที่ 3.8 ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีเอสได้

รูปที่ 3.8 การทดสอบการผลิตโปรตีเอสบนอาหารแข็ง SA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน

3.4 การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA)

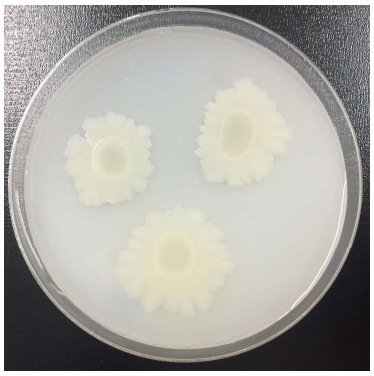
เมื่อผสมน้ำเลี้ยงแบคทีเรียกับสารละลาย Salkowski reagent พบว่าไม่มีสีชมพูเกิดขึ้น ดังรูปที่ 3.9 แสดงว่าแบคทีเรียไม่ผลิต IAA โดยถ้าแบคทีเรียมีการผลิต IAA น้ำเลี้ยงแบคทีเรียจะกลายเป็นสีชมพูเมื่อผสมกับ Salkowski reagent



รูปที่ 3.9 การทดสอบการผลิต IAA ในชุดควบคุม (ซ้าย) และในชุดทดสอบ (ขวา) หลังผสมกับสารละลาย Salkowski reagent และตั้งไว้ในที่มืด 5 นาที

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

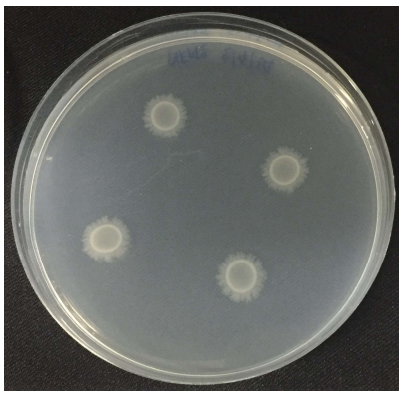
เมื่อนำแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Pikovskaya agar (PVK) พบว่าไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี ดังรูปที่ 3.10 ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต



รูปที่ 3.10 การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

เมื่อนำแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nitrogen free medium (NFM) พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ ดังรูปที่ 3.11 ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในอากาศจึงสามารถเจริญบนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนได้

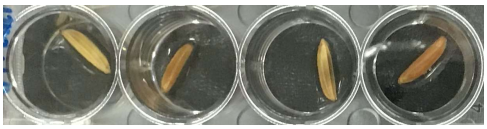


รูปที่ 3.11 การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NFM หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว

การทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างซึ่งทำการทดลองในเพลทแบบ 24 หลุม โดยใส่เมล็ดข้าว 1 เมล็ด ลงในแต่ละหลุม อย่างละ 4 ซ้ำ ในทรีทเมนต์ต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งพบว่าน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 มีสามารถในการรักษา ป้องกัน และยับยั้งโรคเมล็ดด่างในข้าวได้

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างในข้าวของแบคทีเรีย M25 MSCU 0242

ทรีทเมนต์	ประกอบด้วย	ผลการทดลอง	
ชุดควบคุมผลลบ	น้ำกลั่น	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเมล็ดข้าว	
ชุดควบคุมการเกิดโรค	ราก่อโรค	เกิดโรคเมล็ดด่างบนเมล็ดข้าว	
ชุดควบคุม	น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเมล็ดข้าว	
ชุดทดสอบการรักษาการเกิดโรค	ใส่ราก่อโรคล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย	เมล็ดข้าวมีอาการเมล็ดด่างเล็กน้อย แต่ราที่พบไม่กระจาย	
ชุดทดสอบการป้องกันการเกิดโรค	ใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่ราก่อโรค	ไม่มีราเจริญที่เมล็ดและไม่มีอาการของโรคเมล็ดด่าง	
ชุดทดสอบการยับยั้งการเกิดโรค	ใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย และราก่อโรค พร้อมกัน	เมล็ดข้าวไม่มีอาการของโรคเมล็ดด่าง	

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แยก *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว และศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้ง *C. lunata* โดยแอนตะโกนิสติกแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยแบคทีเรียที่ให้การยับยั้งสูงสุดคือ แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 และแสดงสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช รวมทั้งมีความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคเมล็ดด่างในข้าวได้

จากการนำเมล็ดข้าวที่มีอาการเมล็ดด่างจากพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการมาแยกราสาเหตุของโรค โดยใช้เทคนิค direct plating และแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่า เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA ผิวหน้าของโคโลนีมีสีเทา เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าราสร้างสายใยที่มีผนังกั้น และสร้างคอนิเดียที่มีลักษณะเฉพาะของ *Curvularia* คือ มีลักษณะเป็นสปอร์สีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง ภายในมี 3-5 เซลล์ ซึ่งเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น ๆ (Huyly และ Soytong, 2017) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าเป็นราสายพันธุ์ *Curvularia lunata* ที่ก่อโรคเมล็ดด่างในข้าว

เมื่อนำแอนตะโกนิสติกแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์จากคลังจุลินทรีย์ของภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คัดกรองแล้วว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ยับยั้งราได้หลายชนิด มีแอกทิวิตีสูงและไม่ก่อโรค มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยเทคนิค dual culture โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ร่วมกับ *C. lunata* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 0-66.67% โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้มากที่สุดคือ 66.67% ซึ่งจากรายงานของนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ (2564) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 มีความเหมือน 100% กับหลายสายพันธุ์ของ *Bacillus amyloliquefaciens* งานวิจัยของ Saechow และคณะ (2018) ระบุว่า *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้งโรคเมล็ดด่างในต้นข้าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae* อยู่ที่ 92.7 เปอร์เซ็นต์, 68.9 เปอร์เซ็นต์ และ 75.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งราด้วยฤทธิ์ของเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแยกน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มาผสมกับอาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ที่สัดส่วน 1:1 แล้วนำชิ้นวุ้นของราก่อโรคเมล็ดด่างวางตรงกลางเพลท พบว่าสามารถยับยั้งราได้ถึง 100% ซึ่งแสดงว่าเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญของราทำให้ราไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้มีรายงานมากมายที่แสดงการยับยั้งราด้วยเมแทบอไลต์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น Alsultan และคณะ (2019) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากกิ่งของต้นโกโก้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าดำในโกโก้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ He และคณะ (2020) พบว่า *Streptomyces lienomycini* สามารถผลิตสาร 1H-ไพร์โรล-2-คาร์บอกซิลิกแอซิด และ 1H-ไพร์โรล-2-คาร์บอกซะไมด์ ซึ่ง

หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยที่สารเหล่านี้ไปยับยั้งโรคจุดดำบนใบและกิ่งของต้นถั่วอลนัทได้ถึง 79.33 เปอร์เซ็นต์ และ 81.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ งานวิจัยของ Saechow และคณะ (2018) ยังระบุว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้งการเจริญของราหลายชนิดได้ 75-92% ซึ่งเมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมพบว่าเป็นสารกลุ่มลิโพเพปไทด์

จากการทดสอบการยับยั้งราด้วยสารระเหยของแบคทีเรียโดยนำเพลทที่มีชิ้นวุ้นของ *C. lunata* บนอาหารแข็ง PDA ประกบกับเพลทที่ขีดแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 บนอาหารแข็ง LB แล้วพันเพลททั้งสองด้วยพาราฟิล์ม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราอยู่ที่ 52.94% ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 สามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ งานวิจัยของ Gotor-Vila และคณะ (2017) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้ง *Monilinia laxa*, *M. fructicola* และ *Botrytis cinera* ที่ก่อโรคในเชอรี่ โดยผลิตสารระเหยซึ่งได้แก่ 1,3 เพนตะไดอีน, อะซีโทอิน (3-ไฮดรอกซี-2-บิวทาโนน) และไธโอฟีน

เมื่อทดสอบการผลิตไฮโดรไลซิสเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 ซึ่งได้แก่ เซลลูเลส, เพคทิเนส, ไลเปส, โปรตีเอส และไคติเนส ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้งราได้ (Compant และคณะ, 2005) โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 บนอาหารที่มีซับสเตรตที่จำเพาะ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสและโปรตีเอสได้ โดยเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NA ที่ผสมน้ำมันพืช และอาหาร SA ที่มี skim milk ตามลำดับ แต่แบคทีเรียไม่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ เนื่องจากไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย ในอาหาร CMC

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 มาทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งได้แก่ การผลิตฮอร์โมนพืช Indole-3-Acetic Acid (IAA), การละลายฟอสเฟต และการการตรึงไนโตรเจน พบว่าสำหรับความสามารถในการผลิต Indole-3-Acetic Acid (IAA) นั้น แบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนสีสารละลาย Salkowski reagent จากสีเหลืองเป็นสีชมพูได้ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ สำหรับความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง PVK พบว่าไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ส่วนความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง NFM ที่ปราศจากไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 ในการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างในข้าวที่มีสาเหตุจาก *C. lunata* โดยใช้เมล็ดข้าวพันธุ์สังข์หยด พัทลุง พบว่าในชุดทดสอบการรักษาการเกิดโรค ซึ่งใส่ *C. lunata* ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่าที่เมล็ดข้าวมีอาการเมล็ดด่างเล็กน้อย แต่ราที่พบไม่กระจาย ซึ่งแสดงว่าน้ำเลี้ยงแบคทีเรียสามารถรักษาโรคเมล็ดด่างที่เกิดขึ้นได้ ส่วนชุดทดสอบการป้องกันการเกิดโรค ซึ่งใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นใส่ *C. lunata* พบว่าไม่มีราเจริญที่เมล็ด และไม่มีอาการของโรคเมล็ดด่าง ซึ่งแสดงว่าน้ำเลี้ยงแบคทีเรียสามารถป้องกันการเกิดโรคเมล็ดด่างได้ สำหรับชุดทดสอบการยับยั้งการเกิดโรค โดยใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรียและราก่อโรค

พร้อมกัน พบว่าเมล็ดข้าวไม่มีอาการของโรคเมล็ดด่าง แสดงว่าน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย M25 MSCU 0242 สามารถยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างได้

แบคทีเรียสายพันธุ์ M25 MSCU 0242 ซึ่งพบว่าคล้าย 100% กับ *Bacillus amyloliquefaciens* (นภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์, 2564) เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (Lopez-lsasmendi และคณะ, 2019) มีแอกทิวิตีในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด และสามารถยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดด่างในข้าวได้ดี จึงสามารถนำไปใช้เพื่อควบคุมการเกิดโรคพืชที่มีสาเหตุจากราได้ โดยการนำไปใช้อาจจะใช้วิธีฉีดเป็นสเปรย์ก่อนการเพาะปลูก เช่น *B. subtilis* GLB191 และ *B. pumilus* GLB197 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารออกมายับยั้ง *Plasmopara viticola* ที่เป็นสาเหตุของโรคราน้ำค้างในองุ่น โดยก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตจะฉีดสเปรย์น้ำเลี้ยงเชื้อลงบนใบองุ่น พบว่าสามารถควบคุมโรคราน้ำค้างได้ (Zhang และคณะ, 2017)

ภาคผนวก ก

ก1. อาหารแข็ง LB (Luria Bertani) Agar

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

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

ก2. อาหารเหลว LB (Luria Bertani) Broth

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

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

ก3. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

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

ก4. อาหารแข็ง CMC (Carboxy Methyl Cellulose) Agar

ส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	1	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$)	1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2

คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส	26	กรัม
ผงวุ้น	3	กรัม

ผสมส่วนผสมส่วนที่ 1 ในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร และในระหว่างที่ผสม นำส่วนผสมส่วนที่ 2 ค่อย ๆ เทลงไป จนสารละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก5. อาหารแข็ง CVP (Crystal Violet Pectate) Agar

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม
แพคติน	5	กรัม

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

ก6. อาหารแข็ง Lipase Agar (LA)

อาหารสำเร็จรูป Nutrient Broth (NB)	8	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
สีนิวทรัลเรด	0.0004	เปอร์เซ็นต์
น้ำมันพืช	1	เปอร์เซ็นต์

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

ก7. อาหารแข็ง Skim Milk (SM) Agar

Skim milk	28	กรัม
ทริปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2.5	กรัม
เดกซ์โทรส	1	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปราศจากไอออน 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ที่ 7.0 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก8. อาหารแข็ง Chitin Agar (CA)

เปปโตน	0.1	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต	0.1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
เฟอร์รัสกลูโคเนต	0.1	กรัม
สารประกอบคอลลอยด์ไคติน	7	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

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

ก9. อาหารแข็ง Pikovskaya agar (PVK)

สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
เดกซ์โทรส	10	กรัม
แคลเซียมฟอสเฟต $Ca_3(PO_4)_2$	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.0001	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.0001	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

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

ก10. อาหารแข็งที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน Nitrogen free medium (NFM) Agar

กลูโคส	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$)	0.02	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.22	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5	กรัม
แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$)	0.1	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	4.0	ppm
โซเดียมโมลิปเดต	2.0	ppm
ผงวุ้น	15	กรัม

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

ภาคผนวก ข

ข1. สารละลาย Salkowski reagent

0.5 M $FeCl_3$	1	มิลลิลิตร
35 % $HClO_4$	50	มิลลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในตู้ดูดควัน และรอให้เย็น เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

เอกสารอ้างอิง

Agut, M. (2001). Atlas of clinical fungi, 2nd ed. *International Microbiology, 4*, 51-52.

Alsultan, W., Vadamalai, G., Khairulmazmi, A., Saud, H. M., Al-Sadi, A. M., Rashed, O., . . . Nasehi, A. (2019). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. *European Journal of Plant Pathology, 155*(4), 1077-1091.

Amaresan, N., Kumar, K., Sureshbabu, K., & Madhuri, K. (2014). Plant growth-promoting potential of bacteria isolated from active volcano sites of Barren Island, India. *Letters in Applied Microbiology, 58*(2), 130-137.

Ben Khedher, S., Kilani-Feki, O., Dammak, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., & Tounsi, S. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies, 338*(12), 784-792.

Bernard, R. G. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology, 41*(2), 109-117.

Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal, 3*(1), 1-30.

Chamani, H., Yasari, E., & Pirdashti, H. (2015). Response of yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L. cv. Shiroodi) to different phosphate solubilizing microorganisms and mineral phosphorous. *International Journal of Biosciences, 6*, 70-75.

Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguezkabana, R., & Kloepper, J. W. (1995). Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control, 5*(1), 83-91.

Chen, L., Wu, Y. D., Chong, X. Y., Xin, Q. H., Wang, D. X., & Bian, K. (2020). Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Applied Microbiology, 128*(3), 803-813.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(9), 4951-4959.

Du, N., Shi, L., Yuan, Y., Sun, J., Shu, S., & Guo, S. (2017). Isolation of a potential biocontrol agent *Paenibacillus polymyxa* NSY50 from vinegar waste compost and its induction

of host defense responses against Fusarium wilt of cucumber. *Microbiological Research, 202*, 1-10.

Errakhi, R., Lebrihi, A., & Barakate, M. (2009). *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospherical soils against *Sclerotium rolfsii*: A causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology, 107*(2), 672-681.

Figueiredo, M. V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F., & Mariano, R. L. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: Fundamentals and applications. In D. Maheshwari (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs* (Vol. 18, pp. 21-43). Berlin: Springer.

Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R., & Shirkot, C. K. (2019). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbial Pathogenesis, 130*, 196-203.

Gotor-Vila, A., Teixido, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology, 64*, 219-225.

Gupta, P. K. (2014). Chapter 24 - Herbicides and fungicides. In R. C. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (pp. 409-431). USA: Academic Press.

Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology, 60*(4), 381-395.

Hammami, I., Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Gdoura, R., & Triki, M. A. (2013). Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *Comptes Rendus Biologies, 336*(11-12), 557-564.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology, 60*, 579-598.

He, H., Hao, X., Zhou, W., Shi, N., Feng, J., & Han, L. (2020). Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol *Actinomycete* strain A217. *Journal of Applied Microbiology, 128*(4), 1143-1152.

Herring, P. J. (1979). Marine ecology and natural products. *Pure and Applied Chemistry, 51*(9), 1901-1911.

Huang, R., Feng, Z., Chi, X., Sun, X., Lu, Y., Zhang, B., . . . Ge, Y. (2018). Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research, 215*, 55-64.

Huyly, T., & Soytong, K. (2017). Biological control of brown leaf spot disease caused by *Curvularia lunata* and field application method on rice variety IR66 in Cambodia. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science, 39*(1), 111-117.

Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempler, C., Jung, G., Berg, G., & Bahl, H. (1996). Maltophilin: A new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *Journal of Antibiotics, 49*(11), 1101-1104.

Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 33*, 188-203.

Lopez-Isasmendi, G., Alvarez, A. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2019). Aphicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strains in the peach-potato aphid (*Myzus persicae*). *Microbiological Research, 226*, 41-47.

Lu, Y., & Mosier, N. S. (2007). Biomimetic catalysis for hemicellulose hydrolysis in corn stover. *Biotechnology Progress, 23*(1), 116-123.

Mitsuhashi, K., Yamashita, M., Hwan, Y. S., Ihara, F., Nihira, T., & Yamada, Y. (1999). Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov. sp. strain KM109. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63*(11), 1959-1964.

Muthaiyan, M. C. (2000). Biocontrol of rice blast disease with *Pseudomonas fluorescens*. *Pestology, 24*, 20-22.

Nair, P. K. R. (2002). *The Nature and Properties of Soils* (N. C. Brady & R. R. Weil Eds. 13th ed. Vol. 54). USA: Pearson.

Oves, M., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2013). Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European Journal of Soil Biology, 56*, 72-83.

Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E. T., & Tan, Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*(Pt 6), 1263-1271.

Pham, V. T., Rediers, H., Ghequire, M. G., Nguyen, H. H., De Mot, R., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of Microbiology, 199*(3), 513-517.

Rajamanickam, S., Karthikeyan, G., Kavino, M., & Manoranjitham, S. K. (2018). Biohardening of micropropagated banana using endophytic bacteria to induce plant growth promotion and restrain rhizome rot disease caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum Scientia Horticulturae, 231*(32), 179-187.

Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil, 321*(1), 305-339.

Russell, R. S. (1977). Plant root systems: Their function and interaction with the soil. In C. C. Webster (Ed.), *Experimental Agriculture* (pp. 298). London: McGraw-Hill.

Sadia, A., Samina, K., Najma, A., & Maliha, R. (2002). *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology, 4*(4), 454-458.

Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittakoop, P., Prachya, S., & Thammasittirong, S. N. (2018). Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*(9), 1527-1535.

Schoebitz, M., Ceballos, C., & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 13*, 1-10.

Shimizu, K., Hossain, M. M., Kato, K., Kubota, M., & Hyakumachi, M. (2013). Induction of defense responses in cucumber plants by using the cell-free filtrate of the plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2. *Journal of Oleo Science, 62*(8), 613-621.

Shimizu, M., Yazawa, S., & Ushijima, Y. (2009). A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal of General Plant Pathology, 75*(1), 27-36.

Sikorski, P., Hori, R., & Wada, M. (2009). Revisit of **α**-chitin crystal structure using high resolution x-ray diffraction data. *Biomacromolecules, 10*(5), 1100-1105.

Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society, 66*(1), 57-64.

Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K. S., & Jisha, M. S. (2015). Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. *3 Biotech, 5*(5), 831-837.

Suzuki, S., He, Y., & Oyaizu, H. (2003). Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology, 47*(2), 138-143.

Sztrolovics, R., Wang, S. P., Lapierre, P., Chen, H. S., Robert, M. F., & Mitchell, G. A. (1997). Hormone-sensitive lipase (Lipe): Sequence analysis of the 129Sv mouse Lipe gene. *Mammalian Genome, 8*(2), 86-89.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., . . . van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(3), 748-757.

Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., & Gao, X. (2017). *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific Reports, 7*, 40481.

Tchameni, S. N., Cotârlet, M., Ghinea, I. O., Bedine, M. A. B., Sameza, M. L., Borda, D., . . . Dinică, R. M. (2020). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology, 23*(2), 179-188.

Tilak, K., Nandanavanam, R., Pal, K., De, R., Saxena, A., Nautiyal, C., . . . Johri, B. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science, 89*(1), 136-150.

Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., & Briat, J. F. (2013). Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends in Plant Science, 18*(6), 305-311.

Wang, X., Xiao, C., Ji, C., Liu, Z., Song, X., Liu, Y., . . . Liu, X. (2021). Isolation and characterization of endophytic bacteria for controlling root rot disease of Chinese jujube. *Journal of Applied Microbiology, 130*(3), 926-936.

Wang, X., Zhou, X., Cai, Z., Guo, L., Chen, X., Chen, X., . . . Wang, A. (2020). A biocontrol strain of *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40 promote growth and control *Botrytis cinerea* in tomato. *Pathogens, 10*(1), 22.

Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany, 52*(suppl_1), 487-511.

White, P. J. (2009). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: Reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information. In J. K. Syers, A. E. Johnston, & D. C. Rome (Eds.), *Experimental Agriculture* (Vol. 45, pp. 128). Cambridge University Press: London.

Yaoting, X., Yuetong, L., Fengxia, Z., Zhengliang, C., Liqun, T., Jianzhou, L., & Xiaohua, C. (2021). Antagonistic activities of *Pediococcus pentosaceus* against *Pseudomonas aeruginosa* growth. *North American Academic Research, 4*(4), 130-137.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., & Mao, C. (2011). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils, 47*(4), 437-446.

Zhang, X., Zhou, Y., Li, Y., Fu, X., & Wang, Q. (2017). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection, 96*, 173-179.

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research, 169*(1), 76-82.

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. (2559a). โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. Retrieved from http://www.ricethailand.go.th/rkb3/Disease.htm. 15 ตุลาคม 2563.

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. (2559b). โรคเมล็ดด่าง. Retrieved from http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=118-1.htm. 15 ตุลาคม 2563.

กาญยานี โพนเบ้า. (2543). การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว. ปัญหาพิเศษ, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกตน์ณนิภา วันชัย. (2556). การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ตรึงอยู่บนวัสดุชนิดต่างๆ ในการปรับปรุงคุณภาพดินนาข้าวที่เกิดอุทกภัย. Retrieved from มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา: http://rdi.aru.ac.th/e_journal/pdf/146.pdf.

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม. (2549). การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จีราภรณ์ อินทสาร, ฉัตรปวีณ์ เดชจริรัตนสิริ, & ประวิทย์ บุญมี. (2560). ผลของแบคทีเรียที่ผลิตสาร Indole-3-Acetic Acid (IAA) ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณธาตุอาหารของพริกขี้หนู. วารสารเกษตร, *33*(3), 333-344.

เฉลิมเกียรติ อุนะพานัก, จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, สุพจน์ กาเซ็ม, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, & สุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2557). การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสัมพันธุ์กับการยับยั้งการเกิดโรคข้าว. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52, 4-7 ก.พ. 2557, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

ชัยฤกษ์ สุวรรณรัตน์. (2531). ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐนรี ไวมาตย์, เพชรดา ปินใจ, & ณัฐพล จิตมาตย์. (2563). ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินและการเจริญเติบโตของอ้อยโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, *38*(4), 477-488.

ดรุณี จิวเจริญ. (2552). แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์. (2564). สารประกอบจากแอนตาโกนิสติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Maramius sp.* ที่ก่อโรคในปาล์ม. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิวัติ เจริญศิลป์, ประเวศน์ ศิริเดช, & เจริญธรรม, ป. (2537). ผลของโรคเมล็ดด่างที่มีต่อคุณภาพทางกายภาพและการหุงต้มรับประทานข้าวขึ้นน้ำและข้าวทนน้ำลึก (ระยะที่ 1). Retrieved from ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร: https://www.phtnet.org/research/view-abstract.asp?research_id=we275.

เนตรนภา อินสลุด, ปรียาภรณ์ แสงเรือน, & กานต์สิรี หลีชัยกูล. (2558). อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต IAA ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, *46*(3), 625-628.

ประไพ ทองระอา, & สมปอง หมื่นแจ้ง. (2548). การพิสูจน์หาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวนาสวน โดยวิธี microbial community structure. Retrieved from กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร: http://lib.doa.go.th/multim/BB01026.pdf.

พรเทพ ถนนแก้ว. (2538). ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์. วิทยานิพนธ์, ระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมล จำนงค์. (2547). อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 และการนำไปใช้ในสารซักล้าง. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ, *27*(2), 227-243.

มณฑารพ ยมาภัย. (2554). การผลิตและพัฒนาเอนไซม์ไคติเนสเพื่อใช้เป็นชีววัตถุในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในพืช. Retrieved from สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: https://core.ac.uk/download/pdf/70938077.pdf.

มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. (2548). การค้าข้าว. รู้เรื่องข้าว. Retrieved from https://thairice.org/?p=580. 15 ตุลาคม 2563.

วรรณทกาญจน์ เอียดเหตุ. (2561). ประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวหอมไชยา. วิทยานิพนธ์, ระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว. (2562). ข้าวคือชีวิต. Retrieved from https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/rsc-news/new-rsc-rgd/news/205-rice-for-life. 15 ตุลาคม 2563.