รหัสโครงการ SUT3-304-51-12-62

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

(Screening Rhizobia that can Inhibit the Growth of Plant Pathogenic Microorganisms)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-51-12-62

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

(Screening Rhizobia that can Inhibit the Growth of Plant Pathogenic Microorganisms)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจาก ดร.อัจฉรา นันทกิจ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร ในการให้ความอนุเคราะห์เชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณ อ. ดร. โสภณ วงศ์แก้ว สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ม. เทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์มอบเชื้อราก่อโรครากเน่าชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดลอง รวมทั้งให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบอาการโรคของพืช และขอขอบคุณ ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด และ รศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ม. เทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดระยะวลาในการดำเนินงานวิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณ นายวัชรินทร์ ยุทธวานิชกุล สำหรับความช่วยเหลือในการดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดเชื้อราโรครากเน่าในการปลูกพืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในถั่วลิสง ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น อีกทั้งสารเคมียังส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เชื้อไรโซเบียมหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครากเน่าในพืช และเพื่อให้ทราบคุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการใช้เป็นหัวเชื้อ หรือเป็นหัวเชื้อร่วมกับเชื้อไรโซเบียมในการปลูกพืชตระกูลถั่ว ในงานวิจัยจึงได้ทำการรวบรวมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคบริเวณรากพืช และรวบรวมเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR เพื่อคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช แล้วทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อใช้กับพืชตระกูลถั่วต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งก่อโรครากเน่าในถั่วลิสงเป็นต้นแบบในการศึกษา จากการทดสอบไม่พบเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า แต่อย่างไรก็ดีพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท A20, A45, A62 และ A106 สามารถยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ในถั่วลิสงได้ และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลท A20, A45, A62 และ A106 เป็นเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus megaterium* strain AM1C7, *Bacillus subtilis* strain Setapak 8, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130 และ *Pseudomonas* sp. NJ-61 ตามลำดับ เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อไรโซเบียม TAL173 และสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่าในถั่วลิสงที่เกิดจาก *A. niger* และส่งเสริมการเจริญของพืชได้ในระดับกระถางที่ปลูกภายในห้องทดลอง ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อไรโซเบียมทางการค้า ให้มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน และยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Root rot disease in peanut is widely eliminated by using fungicide during cultivation, it leads to increase in the cost of production as well as affect to human health and environment. This research aimed to obtain rhizobia or other microorganisms that can inhibit the growth of root rot pathogen, and characterize their properties for using as legume inoculant. Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) were collected and performed antagonistic activity testing against fungi that cause root rot disease, and their ability to be used as legume inoculant. *Aspergillus niger* that caused root rot disease in peanut root was selected as a model in this study. Non of rhizobial isolates could inhibit the growth of *A. niger*, while 4 isolates of PGPR, A20, A45, A62, and A106 were able to inhibit the growth of *A. niger*. The nucleotide sequence of 16S rRNA of isolates A20, A45, A62, and A106 was highly homology to *Bacillus megaterium* strain AM1C7, *Bacillus subtilis* strain Setapak 8, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130, and *Pseudomonas* sp. NJ-61, respectively. These 4 PGPR strains did not antagonize the growth of commercial peanut *Bradyrhizobim* sp. TAL173. Co-inoculation of TAL173 with selected PGPR to peanut plant could control root rot disease caused by *A. niger*, as well as promote the growth of plant in pot experiments. Therefore, these selected PGPR could be developed by co-inoculation with rhizobia as efficient legume inoculant for promoting the nitrogen fixation and controlling root rot disease in plant.

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ไรโซเบียม และการอาศัยในปมรากของพืชตระกูลถั่ว	1
หัวเชื้อไรโซเบียม	2
เชื้อราก่อโรคที่ติดมากับเมล็ดและโรครากเน่าในพืช	3
การควบคุมทางชีวภาพ	4
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	14
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31
ประวัติผู้วิจัย	35

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 เชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด..... 14

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* และความสามารถในการเกาะติดกับรากของถั่วลิสงของเชื้อแบคทีเรีย (PGPB) ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger*..... 18

ตารางที่ 3 ระบุชนิดของเชื้อ PGPR โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA... 21

ตารางที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ในการผลิตไบโอฟิล์ม การสร้างสาร IAA และการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายการเจริญของเชื้อราก่อโรค..... 23

ตารางที่ 5 การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่จะก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช..... 25

ตารางที่ 6 การทดสอบการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อราสาเหตุ *Aspergillus niger* ในความเข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรครากเน่าในหนึ่งสัปดาห์..... 27

ตารางที่ 7 ผลของการใช้เชื้อ PGPR ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการใช้หัวเชื้อไรโซเบียม TAL173 ต่อการเจริญของถั่วลิสง..... 29

สารบัญภาพ

รูปภาพ **หน้า**

รูปที่ 1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 114..... 15

รูปที่ 2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 240..... 16

รูปที่ 3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 242..... 16

รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ โดยการการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 17

รูปที่ 5 การทดสอบการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์กับรากถั่วลิสง..... 20

รูปที่ 6 การยับยั้งเชื้อราของเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับ Control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)..... 20

รูปที่ 7 การทดสอบการอยู่ร่วมกันได้ของเชื้อ PGPR และ เชื้อไรโซเบียม TAL173..... 22

รูปที่ 8 การทดสอบการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสงจากเชื้อสาเหตุ *Aspergillus niger* ในความเข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรครากเน่าในหนึ่งสัปดาห์..... 28

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันนี้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยชีวภาพ หรือหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีอื่น ๆ ในการเกษตร เช่น สารเคมีกำจัดแมลง โรคพืช หรือสารเคมีกำจัดวัชพืช เป็นต้น จึงเป็นเหตุให้ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ หรือปุ๋ยชีวภาพจะต้องมีการพัฒนาเพื่อให้เกิดประโยชน์กับเกษตรกรสูงสุดเมื่อนำไปใช้ ในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อใช้ในการต่อยอดสู่การพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพทั้งในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืช และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช โดยเฉพาะโรคที่ติดมากับเมล็ดของพืชและโรคที่เกิดกับรากพืชต่อไป โดยในบทนี้ได้อธิบายถึงเชื้อไรโซเบียม การใช้เชื้อไรโซเบียมในรูปหัวเชื้อ สาเหตุการเกิดโรครากเน่าและโรคที่ติดมากับเมล็ดพืช รวมทั้งวิธีการควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งใช้เป็นแนวคิดในการทำงานวิจัยนี้

ไรโซเบียม และการอาศัยในปมรากของพืชตระกูลถั่ว

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบในดิน รวมทั้งภายในปมรากพืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมมีความสามารถในการเข้าสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่วได้ โดยไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ในปมแล้วนี้จะถูกเรียกว่า แบคทีรอยด์ (bacteroid) (Alexander, 1962; Sahgal and Johri, 2003) ซึ่งแบคทีรอยด์ภายในปมรากพืชตระกูลถั่วจะสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจน (N_2) จากบรรยากาศมาเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเป็นรูปแบบของไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ภายในแบคทีรอยด์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีธาตุโมลิบดินัม (Mo) และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein) และโปรตีนที่มีเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบหลัก (iron protein) ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนสนี้ เรียกว่า การตรึงไนโตรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation หรือ BNF) โดยมีสมการของการตรึงไนโตรเจนดังนี้ (Somasegaran and Hoben, 1994)

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว ไรโซเบียมยังสามารถผลิตสารเคมีชนิดอื่นที่เป็นประโยชน์แก่พืชได้อีก เช่น phytohormones, lipo-chito-oligosaccharide (nod factors), lumichrome, riboflavin และ H_2 เป็นต้น โดยสารเคมีเหล่านี้ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตของพืช และเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช ทั้งในพืชตระกูลถั่วและไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว (Dakora and Phillips, 2002) ไรโซเบียมหลายสายพันธุ์สามารถผลิต siderophores, indole acetic acid (IAA) และ organic acids ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Antoun et al., 1998) ส่งผลให้ไรโซเบียมสามารถเพิ่มแหล่งธาตุ และสารอาหารให้แก่พืชได้แม้ปลูกพืชภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือสภาพดินเสื่อมโทรม (Dakora and Phillips, 2005) จากประโยชน์ของไรโซเบียมที่กล่าวมาข้างต้น ไรโซเบียมจึงถูกนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ในรูปหัวเชื้อไรโซเบียม (rhizobial inoculant) โดยนำมาใช้กับพืชตระกูลถั่วชนิดที่จำเพาะกับเชื้อไรโซเบียม ซึ่งสามารถช่วยให้เกษตรกรลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน สารเคมี และต้นทุนในการผลิตได้

หัวเชื้อไรโซเบียม

หัวเชื้อไรโซเบียม (rhizobial inoculant) คือ การนำเชื้อไรโซเบียมที่คัดเลือกได้มาผสมกับวัสดุพาหะ (carrier) เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมสามารถเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่ได้นาน รวมทั้งสะดวกในการนำไปใช้ในสภาพไร่ (Somasegaran and Hoben, 1994) หัวเชื้อไรโซเบียมสามารถนำมาใช้กับพืชได้โดยการคลุกกับเมล็ดโดยตรง หรือหว่านลงไปในดินก่อนทำการเพาะปลูก เพื่อทำให้แน่ใจว่าเชื้อไรโซเบียมที่ต้องการจะเข้าสร้างปมกับพืชขณะที่รากขนอ่อนงอกออกมา (Hynes et al., 1995) ในปัจจุบันนิยมใช้ พีท (peat) เป็นวัสดุพาหะ เพราะช่วยให้ไรโซเบียมสามารถเพิ่มปริมาณ และมีชีวิตอยู่ได้นานในขณะที่เก็บรักษา (Stephens and Rask, 2000) อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพหลังการผลิต เช่น จำนวนของเชื้อไรโซเบียม การเข้าปมกับรากพืช ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น (Lupwayi et al., 2000) หัวเชื้อไรโซเบียมถูกนำมาใช้กับถั่วหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชถั่วเศรษฐกิจ ถั่วอาหารสัตว์ รวมทั้งพืชตระกูลถั่วที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในดิน หรือเพื่อการอนุรักษ์ดิน เช่น ใช้ในการปลูกเป็นพืชคลุมดิน ปลูกสลับหรือปลูกเป็นพืชหมุนเวียนกับพืชผักชนิดอื่น นอกจากพืชตระกูลถั่วช่วยบำรุงดินแล้ว ยังสามารถเก็บผลผลิตของถั่วที่ปลูกไว้เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการเลือกใช้หัวเชื้อไรโซเบียมที่เหมาะสมกับพืชตระกูลถั่วนั้น ๆ แต่ประสิทธิภาพที่ได้อาจจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยแวดล้อม เช่น

ปริมาณธาตุอาหารในดิน ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ ความชื้น หรือโรคพืช เป็นต้น ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของไรโซเบียมและการเจริญของพืช ดังนั้นหากทำการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีศักยภาพมากขึ้นก็จะทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรได้ และจากคุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมที่มีความหลากหลายนี้ ทำให้การปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมในปัจจุบันมีรูปแบบของการผลิตอยู่ในรูปหัวเชื้อไรโซเบียมรวมหลายสายพันธุ์ (multiple strains inoculation) หรือรูปแบบของการใช้ไรโซเบียมร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (co-inoculation) เพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีคุณสมบัติดีที่สุดตามความต้องการ (Stephens and Rask, 2000)

เชื้อราก่อโรคที่ติดมากับเมล็ดและโรครากเน่าในพืช

โรครากเน่าที่มีเชื้อราเป็นสาเหตุสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรที่ทำการเพาะปลูกในแปลง และผลผลิตสดในท้องตลาด ทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหายอย่างมาก เกษตรกรจึงต้องหาวิธีในการกำจัดเชื้อราก่อโรคดังกล่าว เช่น การใช้สารเคมี หรือในทางเกษตรอินทรีย์ อาจใช้การควบคุมโรคพืชโดยการปลูกพืชหมุนเวียน หรือการปลูกพืชผสมผสาน เป็นแนวทางในการลดความรุนแรง และการระบาดของโรคพืช รวมทั้งสามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด อาทิเช่น โรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani*, และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในพืชจำพวกถั่วเหลือง ถั่วเขียว ทานตะวัน ผัก ผลไม้ และกระเจี๊ยบ เป็นต้น (Ehteshamul-Haque and Ghaffar, 1992) แต่อย่างไรก็ตามโรคที่เกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด (seed-borne diseases) ไม่สามารถควบคุมด้วยวิธีการเหล่านี้ เพราะเชื้อราเหล่านี้ไม่ได้แพร่อยู่เฉพาะในดินเท่านั้น แต่ยังสามารถเกาะติดไปกับเมล็ดพืชได้ (Borgen, 2004) ซึ่ง Ingold (1953) พบว่าการที่เชื้อราสามารถแพร่ไปกับเมล็ดได้จะต้องมีความจำเพาะหรือมีความสัมพันธ์กับพืชในแต่ละชนิด โดยเชื้อราบางตัวสามารถเกาะติดกับเมล็ดพืชได้มากกว่าหนึ่งชนิด (Maude, 1996) ทั้งนี้พบว่าในเมล็ดถั่วลิสงมีเชื้อราก่อโรคที่ติดมากับเมล็ดในปริมาณสูง (Elwakil and Metwally, 2001) โดยเชื้อที่พบมากที่สุดคือ เชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคโคนเน่าขาด (Seeding Blight or Crown rot) และโรคแคระใบลีบ (Yellow Mold or Afla-root Disease) ทั้งนี้ Pitt และคณะ (1993) ได้รายงานว่า จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วลิสงจากกลุ่มพ่อค้าคนกลางและจากเกษตรกร พบเมล็ดถั่วลิสงที่ติดเชื้อรา *A. flavus* ในปริมาณ 95% และ *A. niger* ในปริมาณ 86% จากกลุ่มตัวอย่างถั่วลิสงที่สุ่มมาทดสอบเชื้อราสองชนิดนี้สามารถเกาะติดกับเมล็ดถั่วลิสงและยังสามารถอาศัยอยู่ในดินได้ โดยเมล็ดถั่วลิสงที่

มีความชื้นมักพบเชื้อราสองชนิดนี้อยู่บนเมล็ดถั่วลิสง อาจสังเกตได้จาก *A. niger* จะมีสปอร์สีดำและสามารถผลิตสาร “Ochratoxin” ส่วน *A. flavus* จะมีสปอร์สีเขียวอมเหลือง ส่วนมากจะพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตสาร “Aflatoxin” (Jan and Robert, 2007) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้ เชื้อราเหล่านี้สร้างความเสียหายในไร่นาและยังส่งผลเสียหายต่อผลผลิตที่ทำการเก็บรักษาไว้เพื่อบริโภคและการค้าเป็นอย่างมาก ส่งผลให้เกษตรกรหันมาใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันการเกิดโรคในปริมาณที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ดีสารเคมีเหล่านี้อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกร และผู้บริโภคได้ ดังนั้นจะเป็นผลดีมากกว่า ถ้าใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพที่สามารถป้องกันการเกิดโรคทดแทนการใช้สารเคมีได้

การควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) หมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อควบคุมสิ่งมีชีวิตด้วยกันเองซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน สำหรับในด้านโรคพืช การควบคุมทางชีวภาพเป็นการใช้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือควบคุมโรคพืชได้ หรือใช้โรคพืชบางชนิดควบคุมวัชพืชได้ สิ่งมีชีวิตดังกล่าวถูกเรียกว่า Biological Control Agent (BCA) (Pal et al., 2000) มีรายงานที่แสดงการใช้แบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถควบคุมโรคพืชได้ เช่น *Acremonium alternatum, Acrodontium crateriforme* และ *Cladosporium oxysporum* สามารถควบคุมโรคราน้ำค้างได้ (Kiss, 2003) ในขณะที่ *Trichoderma* spp. , *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas* sp. สามารถควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราได้หลายชนิด (Harman et al., 2004; Homma et al., 1989) รวมถึงเชื้อที่ติดมากับเมล็ด เช่น *Aspergillus* spp. , *A. niger* and *A. flavus* (Lashin et al., 1989; Dileep et al., 1999, และ Podile 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไรโซเบียมก็สามารถใช้เป็น BCA ได้เช่นกัน โดยไรโซเบียมสายพันธุ์ *Bradyrhizobium japonicum* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Phytophthora megasperma, Pythium ultimum, Fusarium oxysporum* และ *Ascochyta imperfecta* ในขณะที่ไรโซเบียมสายพันธุ์ *Sinorhizobium meliloti* สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลกระถิน (*Acacia pulchella*) สามารถลดจำนวนเชื้อรา *Phytophthora cinnamoni* ในการทดสอบในห้องทดลองได้ (Malajczuk et al., 1984) และเมื่อทำการทดสอบในสภาพไร่ก็พบว่าเชื้อไรโซเบียมสามารถยับยั้งเชื้อ *Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani* และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุที่

ทำให้เกิดโรครากเน่าในพืชจำพวกถั่วเหลือง ถั่วเขียว ดอกทานตะวัน และกระเจี๊ยบได้ (Ehteshamul-Haque and Ghaffar, 1992) สำหรับกลไกการควบคุมที่ไรโซเบียมใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคนั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามได้เคยมีการรายงานว่าไรโซเบียมเป็นปรสิตในเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช และสามารถลดอาการของโรคในพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราได้ (Dakora et al., 1993) กลไกการควบคุมอื่น ๆ เช่น การกระตุ้นให้พืชผลิตสาร isoflavonoid phytoalexins ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชตระกูลถั่ว (Savoure et al., 1994) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถพบเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ส่งเสริมการเจริญของพืช โดยสามารถควบคุมเชื้อราก่อโรค โดยเฉพาะโรครากเน่าในพืช และพัฒนาให้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมเดี่ยวหรือหัวเชื้อไรโซเบียมผสมเพื่อส่งเสริมการตรึงไนโตรเจน และควบคุมเชื้อราก่อโรครากเน่าแก่พืชได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่พบอยู่ในดินมีหลายชนิด ซึ่งส่งผลให้พืชที่ปลูกในดินบริเวณนั้นมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ มีอาการอ่อนแอ หรือตายลงในที่สุด ส่งผลให้เกษตรกรไม่ได้ผลผลิตจากพืชนั้นตามต้องการ ดังนั้นเกษตรกรจึงใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันการเข้าทำลายพืช ทำให้เกษตรกรต้องมีต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น รวมทั้งสารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพิษต่อทั้งมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้สามารถปนเปื้อนไปในดินและแหล่งน้ำได้ นอกจากนี้การใช้สารเคมีเพื่อเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคยังเป็นการแก้ปัญหาภายหลังจากที่พืชเริ่มแสดงอาการแล้ว ซึ่งอาจไม่ทันต่อการฟื้นฟูสภาพของพืชให้แข็งแรงดังเดิม ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงจะทำการคัดเลือกหาเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมต่อไป

ทั้งนี้การควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธีการทางชีวภาพจึงถูกศึกษามากขึ้นเพื่อลดการใช้สารเคมี โดยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Plant gowth-promoting bacteria (PGPB) ถูกนำมาศึกษาถึงศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืช รวมทั้งการควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืช (Glick 1995; Compant et al. 2005) ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่ถูกนำมาศึกษามีทั้งที่ใช้เป็นเชื้อเดี่ยว และการใช้เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน เช่น *Pseudomonas* sp. ช่วยในการกระตุ้นให้ต้นอ่อนมีความต้านทานต่อเชื้อ *Botrytis cinerea* (Barka et al. 2000), *Pseudomonas chlororaphis* ใช้ในการควบคุม *Pythium aphanidermatum* และ *Pythium dissotocum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าใน pepper

(Chatterton et al. 2004) หรือการศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม เช่น *Bacillus pumilus, Bacillus subtil และ Curtobacterium flaccumfaciens* เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคหลายชนิดในแตงกวา เช่น *Colletotrichum orbiculare* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค anthracnose, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุด (angular leaf spot) และ *Erwinia tracheiphila* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค cucurbit wilt disease (Raupach and Kloepper 1998) ทั้งนี้ในกลุ่มของเชื้อไรโซเบียมเองก็เคยมีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ เช่น *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* มีความสามรถในการควบคุมโรคในถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) และใน sugar beet (*Beta vulgaris* L.) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pythium* sp. (Bardin et al. 2004), *Bradyrhizobium* sp. มีผลในการควบคุมโรค charcoal rot ในถั่วลิสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Macrophomina phaseomina* (Deshwal et al. 2003) หรือ *Rhizobium meliloti* ที่มีผลในการควบคุมโรคนี้ในถั่วลิสง (Arora et al. 2001) ดังนั้นหากสามารถคัดเลือกเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช แล้วมาใช้ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียมในการปลูกพืชตระกูลถั่วก็น่าจะทำให้สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชตระกูลถั่วให้มีความแข็งแรงมากขึ้น ทั้งนี้หลังจากเก็บเกี่ยวผลิตแล้ว เมื่อไถกลบต้นถั่วลงไปในดินก็จะทำให้ดินในบริเวณนั้นมีความอุดมสมบูรณ์ โดยมีเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่เจริญอยู่ในดินเหล่านี้เป็นกลไกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งทำให้พืชหลักที่ปลูกในดินบริเวณนั้นมีความแข็งแรง และสามารถลดการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ได้ในที่สุด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อให้ได้เชื้อไรโซเบียมหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

2) เพื่อให้ทราบคุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่คัดเลือกได้ในการใช้เป็นหัวเชื้อหรือเป็นหัวเชื้อร่วมกับเชื้อไรโซเบียมในการปลูกพืชตระกูลถั่ว

ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชโดยเฉพาะเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคที่บริเวณรากพืชจากนั้นรวบรวมเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPB แล้วทำการทดสอบเพื่อ

คัดเลือกหาเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPB ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียม เพื่อใช้กับพืชตระกูลถั่ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1) ได้เชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า เพื่อนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อไรโซเบียมใช้กับพืชตระกูลถั่วต่อไป

2) สามารถเผยแพร่ความรู้นี้ในวารสาร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม หรือหัวเชื้อ PGPB เพื่อใช้กับพืชในตระกูลอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 1 เพื่อให้ได้เชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 1 ได้ดำเนินการดังนี้

1. รวบรวมเชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB เพื่อทำการทดสอบ

1.1 การรวบรวมและเก็บตัวอย่าง

เชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ได้ถูกรวบรวมเพื่อทำการทดสอบจากสองแนวทาง โดยแนวทางที่หนึ่งได้รวบรวมจากเชื้อไรโซเบียมที่ได้ถูกคัดแยกไว้แล้วจากปมของพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ซึ่งรวบรวมโดยกรมวิชาการเกษตร ในขณะที่กลุ่ม PGPB นั้นได้จากเชื้อที่รวบรวมไว้โดยสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี และแนวทางที่สอง คือ การสุ่มเก็บตัวอย่างปม และรากพืชตระกูลถั่วจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปม หรือคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช

1.2 การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

แยกเชื้อไรโซเบียม ตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (1994) โดยทำการฆ่าเชื้อบนผิวปมก่อน จากนั้นนำปมที่ได้มาผ่าแล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อเผาไฟ แตะภายในปมรากพืช นำมา streak บนอาหาร yeast extract mannito agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส จำนวน 3-7 วัน เลือกเก็บโคโลนีของไรโซเบียมเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

1.3 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จากบริเวณรอบรากพืช

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB นี้หากเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช จะสามารถเรียกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ว่าเป็น Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ซึ่งสามารถคัดแยกได้โดยนำรากพืชที่ต้องการแยกเชื้อมาล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างดินและเชื้อจุลินทรีย์ที่จับอยู่กับรากพืชแบบหลวม ๆ ออกไปก่อน จากนั้นทำการ vortex รากพืชในน้ำกลั่นปลอดเชื้อนาน 10 นาที เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ยึดจับกับผิวรากได้ดีออกมา แล้วนำไป spread บนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน Burk's **N**-free agar medium (100 ไมโครลิตร ต่อ 1 plate) บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส จำนวน 2-4 วัน เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้เชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช

2. คัดเลือกเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

ทดสอบความสามารถของเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่รวบรวมได้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าที่สำคัญ คือ *Fusarium* spp., *Didymella* spp., *Aspergillus niger* และ *Rhizoctonia* sp. ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราฝังอยู่มาทดสอบบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยวางชิ้นวุ้นเชื้อราบริเวณกลาง plate จากนั้นเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่ต้องการทดสอบใน plate เดียวกันกับเชื้อรานั้น ๆ โดยเว้นระยะห่างจากเชื้อราเท่า ๆ กัน จำนวน 4 ซ้ำ แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อราว่าถูกยับยั้งโดยเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่นำมาทดสอบหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับชิ้นวุ้นเชื้อราที่ปล่อยให้เจริญเป็นอิสระ (control) จากนั้นประเมินศักยภาพเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Percent Inhibition of Diameter Growth = PIDG) ตามวิธีของ Verma and Kharwar (2006) ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 2 เพื่อให้ทราบปริมาณของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 2 ได้ดำเนินการดังนี้

3. การหาปริมาณของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง

เนื่องจากโรครากเน่าที่พบในถั่วลิสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไป และสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมากเนื่องจากเชื้อรานี้สามารถแพร่กระจายได้ง่ายในดิน และยังสามารถฝังตัวติดอยู่ในเมล็ดถั่วลิสงได้ ทำให้การนำเมล็ดถั่วลิสงไปปลูกในครั้งต่อไปยังคงพบปัญหาโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้โรครากเน่าที่พบในถั่วลิสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *A. niger* เป็นต้นแบบในการศึกษา ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง โดยนำเมล็ดถั่วลิสงมาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวเมล็ด ด้วยแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 6% แคลเซียมไฮโปคลอไลด์ เป็นเวลา 3 นาที เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่ง

ฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพาะในภาชนะปิดปลอดเชื้อเป็นเวลา 2-3 วัน ที่ความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จนสังเกตเห็นรากของต้นถั่วงอกออกมา จากนั้นนำเมล็ดที่งอกรากแล้วเล็กน้อยไปเพาะต่อใน หลอดทดลอง ขนาด 2 × 15 นิ้ว โดยภายในหลอดบรรจุ N- Free Nutrient Solution ที่มีการเติม 0.5% KNO_3 ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (1994) และตาข่ายเจาะรู้กว้างพอที่จะให้รากถั่วเจริญแต่เมล็ดไม่สามารถรอดตาข่ายได้โดยวางสูงห่างจากระดับผิวน้ำภายในหลอด 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำเมล็ดที่งอกแล้ว วางบนตาข่ายโดยให้รากผ่านรูที่เจาะไว้ และทำการหยอดเชื้อ PGPR ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญมีจำนวน เชื้อที่ 10^8 เซลล์ ลงไปบนเมล็ดในแต่ละหลอด ปิดฝาหลอดทดลองด้วยอะลูมิเนียมฟอย เลี้ยงในห้องทึบแสง เป็นเวลา 7 วัน ทำการตัดรากแก้ว ขนาด 1 เซนติเมตร มาทำการล้างด้วย 0.05% Tween 20 และล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง นำรากถั่วที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บรรจุน้ำฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำรากไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และหาน้ำหนักแห้ง นำน้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ไปทำการเจือจางเพื่อนับจับจำนวนโคโลนีด้วยวิธี Plate count (10 folds dilution) แล้วนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับจำนวนเชื้อในแต่ละการเจือจาง คำนวณหาค่า Colony Forming Unit (CFU) จากนั้นคำนวณเป็นค่า log CFU ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของรากถั่ว

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 3 เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือก

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 3 ได้ดำเนินการดังนี้

4. ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

4.1 การสกัด genomic DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว Nutrient broth medium (NB) จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นสกัด genomic DNA ตามวิธีการของ Somasegaran และ Hoben (1994) จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1 % agarose gel จากนั้นเก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ – 20°C เพื่อทำการศึกษาต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์มาเพิ่มปริมาณในส่วนของลำดับเบสของ ribosomal DNA ในบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ RP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 3นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 วินาที จำวนวน 30 รอบ, และ 72 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1 % agarose gel และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลในเว็บไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้ในระดับ genus และ specie

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 4 เพื่อให้ทราบถึงการอยู่ร่วมกันได้ของเชื้อ PGPR กับ เชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* sp. TAL173)

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 4 ได้ดำเนินการดังนี้

5. การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ PGPR กับ เชื้อไรโซเบียม

เชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* sp. TAL173) เป็นเชื้อที่ทางกรมวิชาการเกษตรแนะนำแก่เกษตรกรในการใช้คลุกกับเมล็ดถั่วลิสงก่อนการเพาะปลูก จึงได้นำมาใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่วลิสง และเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในถั่วลิสง *(Aspergillus niger)* มาใช้ในรูปแบบหัวเชื้อผสม ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบการเจริญร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิด โดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในจานเลี้ยงเชื้อ ที่บรรจุอาหาร NA โดย spread เชื้อให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นประมาณ 3 -4 วัน ทำการปลูกเชื้อ PGPR ลงภายหลัง บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วตรวจการยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมโดยเชื้อ PGPR ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณใสรอบโคโลนีของ PGPR (Inhibition Zone)

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 5 เพื่อให้ทราบปริมาณของเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าในพืช และปริมาณของเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ได้

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 5 ได้ดำเนินการดังนี้

6. การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

เชื้อราก่อโรครากเน่าขาดที่มีสาเหตุมาจาก *A. niger* ได้นำไปทดสอบกับถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 เพื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าในพืช โดยนำเมล็ดถั่วลิสงที่ต้องการทดสอบมาทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด ทำการใส่เชื้อราที่ต้องการทดสอบให้กับพืช โดยเชื้อราจะถูกเตรียมให้อยู่ในรูป cell suspension ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนเชื้อราเจริญเต็ม plate จากนั้นนำเซลล์ของเชื้อราที่ได้ทั้งหมดใน plate ผสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (5 ml ต่อ plate) แล้วขูดเบา ๆ เพื่อคัดแยกเฉพาะส่วนของสปอร์ จากนั้นนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วลิสงในจำนวนสปอร์ปริมาณต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^7 conidia ต่อ มิลลิลิตร แล้วเพาะเมล็ดถั่วลิสงที่คลุกกับสปอร์ของเชื้อราแล้วในดินปลอดเชื้อที่บรรจุในกระถางทดสอบ เพื่อทำการบันทึกการเจริญของพืช อาการโรคของพืช และบันทึกปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการโรคพืช เพื่อใช้เป็นปริมาณของเชื้อราที่จะทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ทั้งนี้อาการติดเชื้อได้แบ่งเป็นเปอร์เซ็นต์การติดโรคจากการสังเกตสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ที่มีลักษณะเป็นสีดำ (Black mold) เทียบกับจำนวนต้นที่ปลูก และให้คะแนนการเกิดโรคตามวิธีการของ Ziedan (2006) ดังนี้

0 = ไม่แสดงการเป็นโรคใด ๆ (No symptoms (healthy plant)),

1 = ใบพืชมีสีเหลือง ¼ ของใบ

2 = ใบพืชมีสีเหลือง ½ ของใบ

3 = ใบพืชมีสีเหลือง ¾ ของใบ และมีจุดสีน้ำตาลไหม้บนใบ

4 = พืชเหี่ยวแห้งและตาย

7. การทดสอบหาปริมาณของเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้

ทำการเลี้ยงเชื้อ PGPR ในอาหาร NB จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ late log phase ทำการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อ PGPR โดยวิธี Total plate count จากนั้นเตรียมเชื้อ PGPR ทั้งหมด 5 ระดับความ

เข้มข้น คือ เชื้อ PGPR ปริมาณความเข้มข้นจาก 10^4 ถึง 10^8 cells/ml จากนั้นเตรียมเมล็ดถั่วลิสงโดยทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด แล้วคลุกเมล็ดด้วยปริมาณเชื้อราที่ได้จากข้อ 6 แล้วทำการหยอดเชื้อ PGPR ในปริมาณต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ (1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด) โดยปลูกถั่วลิสง 2-3 เมล็ดต่อกระถางทดสอบ สังเกตการเจริญของถั่วลิสงที่ใส่เชื้อ PGPR ในการควบคุมโรค จากนั้นบันทึกระดับอาการของโรคพืช และปริมาณเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคได้

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 6 เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผสมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 6 จะดำเนินการดังนี้

8. การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผสมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลิสง

จากการตรวจสอบในข้อ 7 ตรวจสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชได้จากการนับจำนวนปม การหาน้ำหนักปมแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง และน้ำหนักรากแห้ง และคำนวณทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมเชื้อไรโซเบียม และเชื้อกลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

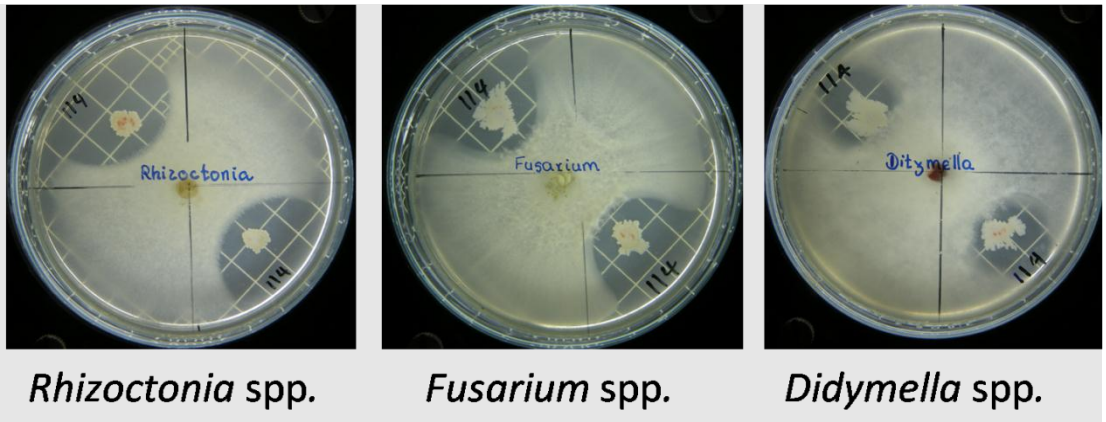
ทำการรวบรวมเชื้อไรโซเบียมจากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 277 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกมาจากปมพืชอาศัย (host) ในแต่ละชนิด รวมทั้งเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากการคัดแยกเองจากการศึกษาครั้งนี้ภายในห้องปฏิบัติการจากปมพืชตระกูลถั่วจำนวน 350 ไอโซเลท ดังแสดงจำนวนของเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด

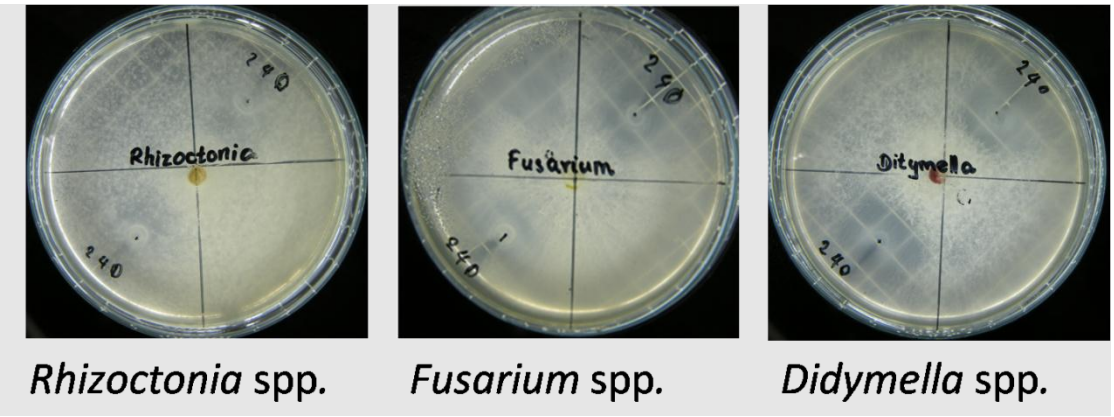
ลำดับ	แหล่งที่มาจากพืชอาศัย	เชื้อโตเร็ว	เชื้อโตช้า
1-10	กระถินณรงค์ *(Acacia auriculiformis Cunn.)*	10	0
11-20	สาธร *(Millettia leucantha Kurz)*	10	0
21-40	ไมยราพไร้หนาม *(Mimosa invisa)*	19	1
41-60	กราวเครือ *(Pueraria mirifica)*	17	3
61-80	ถั่วเขียวป่า *(Phaseolus lathyroides Linn.)*	20	0
81-100	ถั่วฝักยาว *(Vigna sinensis.)*	16	4
101-120	ไมยรา *(Desmanthus virgatus)*	20	0
121-140	คราม่ป่า *(Tephrosia purpurea Pers.)*	17	3
141-150	ประดู่ *(Pterocarpus macrocarpus Kurz.)*	7	3
151-160	กระถินเทพา *(Accacia mangium Wild)*	7	3
161-180	หางไหล *(Derris elliptica (Roxb.) Benth.)*	16	4
181-200	ถั่วเหลือง *(Glycine max (L.) Merrill)*	20	0
101-210	ถั่วพุ่ม *(Vigna unguiculata (L.))*	8	2
211-222	เพอร์ลาเรีย *(Pueraria phaseoloides)*	9	3
233-234	โสน *(Sesbania aculeata.)*	7	5

235-243	ถั่วลิสง *(Arachis hypogaea)*	0	9
244-254	ปอเทือง *(Crotalaria juncea)*	8	3
255-263	ถั่วลาย *(Centosema pubescens)*	9	1
264-265	ซีลูเลียม *(Calopgonium Caeruleum)*	2	0
266-277	ถั่วพร้า *(Canavalia ensiformis.)*	0	10
278-627	พืชตระกูลถั่วต่างๆ *(Leguminosae)*	28	322
รวม		251	376

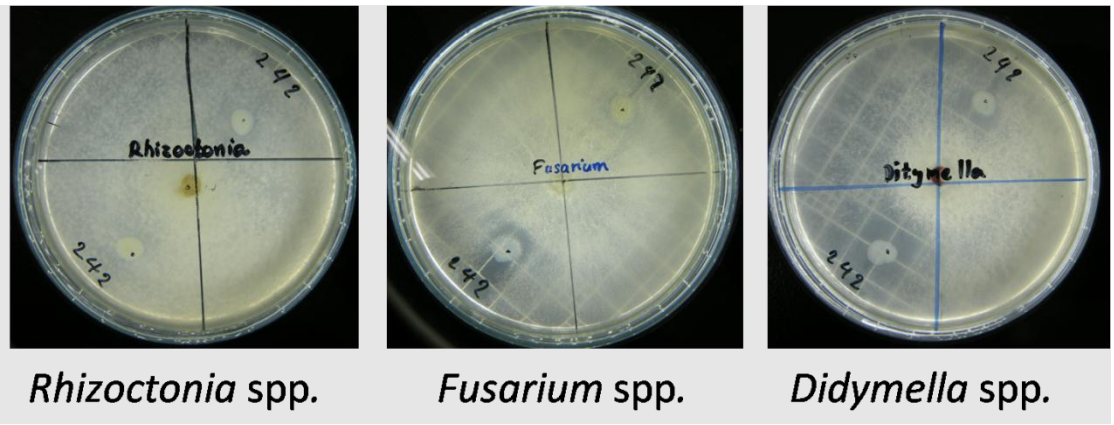
หลังจากนั้นทำการทดสอบความสามารถของเชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าจำนวน 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Didymella* spp. และ *Aspergillus niger* ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 114 ที่ได้จากกรมวิชาการเกษตรโดยคัดเลือกจากพืชอาศัย ไมยรา *(Desmanthus virgatus)* จำนวน 1 เชื้อ ไอโซเลทที่ 240 และ 242 คัดเลือกจากพืชอาศัย ถั่วลิสง *(Arachis hypogaea)* จำนวน 2 เชื้อ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ โดย ไอโซเลทที่ 114 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ดังรูปที่ 1 ไอโซเลทที่ 240 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อราก่อโรครากเน่า *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ดังรูปที่ 2 และ ไอโซเลทที่ 242 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อราก่อโรครากเน่า *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ดังรูปที่ 3



รูปที่ 1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 114



รูปที่ 2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 240



รูปที่ 3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. และ *Didymella* spp. ของเชื้อไอโซเลทที่ 242

จากนั้นได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการความคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ โดยการการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ทั้งนี้จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าไอโซเลทที่ 114, 240 และ 242 พบว่า เชื้อทั้งสามชนิดที่แยกได้จากปมรากพืชไม่ใช่เชื้อไรโซเบียม เนื่องจากการศึกษาของ Somasegaran และ Hoben (1994) ระบุไว้ว่าไรโซเบียมมีผนังเซลล์ที่ติดสีแกรมลบ (ติดสีแดง) และมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น (Rod Shape) ปลายโค้งมน แต่เชื้อไอโซเลทที่ 114 ติดสีแกรมบวก (ติดสีน้ำเงิน) และมีลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นแบบรูปแท่งปลายตัด ในขณะที่ไอโซเลทที่ 240 ติดสีแกรมลบ แต่มีลักษณะเป็นรูปร่างเซลล์เป็นแบบรูปแท่งปลายตัด และเชื้อไอโซเลทที่ 242 ติดสีแกรมลบ แต่มีลักษณะเป็นรูปร่างเซลล์เป็นแบบรูปกลมรี โดยเชื้อเหล่านี้อาจมาจากการปนเปื้อน ระหว่างการทดลอง หรือการล้างฆ่าเชื้อทำความสะอาดปมรากพืชได้ไม่ดี

ดังนั้นจากการทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปมพืชตระกูลถั่วจำนวน 627 ไอโซเลท ไม่มีเชื้อไรโซเบียมใดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า ดังนั้นจึงจะนำเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) มาดำเนินการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในพืช แล้วใช้เชื้อกลุ่ม PGPB นี้ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบหัวเชื้อผสมต่อไป ทั้งนี้ได้นำเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่รวบรวมไว้แล้ว จากห้องทดลองของสาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ มาทดสอบเพิ่มเติม เพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าโดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในถั่วลิสง และเป็นโรคที่สามารถติดไปกับเมล็ดถั่วได้ ซึ่งเป็นปัญหาเชื้อราก่อโรครากเน่าที่สำคัญในการเพาะปลูกถั่วลิสง ดังนั้นจึงได้นำเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จำนวน 350 เชื้อ มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในถั่วลิสง ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ได้ จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ A62, A45, A69, A106, A20, A25, A81, A43, A48, A67 และ A44 ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าของเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลทนี้ และทดสอบการเกาะติดกับรากของถั่วลิสง ดังแสดงผลในตารางที่ 2

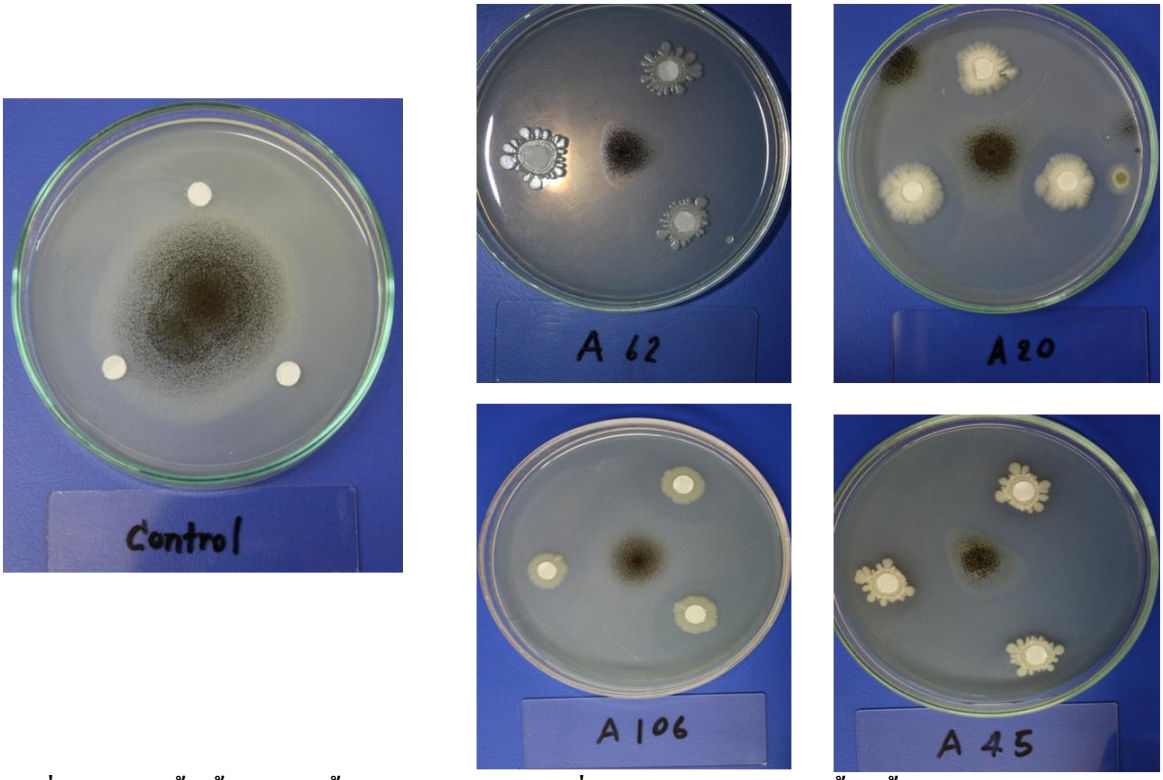
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* และ ความสามารถในการเกาะติดกับรากของถั่วลิสงของเชื้อแบคทีเรีย (PGPB) ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger*

เชื้อแบคทีเรีย (PGPB)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger*	การเกาะติดกับรากถั่วลิสง (log CFU/g roots ± SE)
A106	44.53%^{bc}	10.12 ± 0.28^{b}
A20	42.52%^{bc}	10.16 ± 0.43^{b}
A25	41.58%^{bc}	8.93 ± 0.15^{d}
A43	36.52%^{bc}	9.71 ± 0.53b^{c}
A44	17.98%^{e}	8.26 ± 0.18^{e}
A45	51.42%^{b}	10.84 ± 0.25^{a}
A48	35.94%^{bc}	9.46 ± 0.04^{cd}
A62	67.81%^{a}	9.46 ± 0.04^{cd}
A67	33.77%^{d}	9.36 ± 0.17^{cd}
A69	46.00%^{bc}	8.17 ± 0.26^{e}
A81	39.71%^{bc}	9.53 ± 0.12^{cd}

จากการทดสอบพบว่า เชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ได้แตกต่างกันตั้งแต่ 17.98-67.81% โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท A62 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ได้สูงที่สุด และเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. niger* รองลงมาสี่อันดับ คือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท A45, A69, A106 และ A20 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท A44 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ได้น้อยที่สุด 17.98% ส่วนความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเกาะติดกับรากถั่วลิสงนั้น (รูปที่ 5) เชื้อแบคทีเรียที่มีการเกาะติดกับรากถั่วลิสงได้สูงสุดคือ เชื้อไอโซเลท 45 มีการเกาะติดของเชื้อกับรากถั่วลิสงได้ 10.84 log CFU/g roots และเชื้อที่มีความสามารถในการเกาะติดกับรากถั่วลิสงรองลงมาสี่อันดับ คือ ไอโซเลท A20 มีการเกาะติดกับรากถั่วลิสงได้ 10.16 log CFU/g roots, ไอโซเลท A106 มีการเกาะติดกับรากถั่วลิสงได้ 10.12 log CFU/g roots, ไอโซเลท A43 มีการเกาะติดของเชื้อกับรากถั่วลิสงได้ 9.71 log CFU/g roots และ ไอโซเลท A81 มีการเกาะติดของเชื้อกับรากถั่วลิสงได้ 9.53 log CFU/g roots และไอโซเลท A81 มีการเกาะติดของเชื้อกับรากถั่วลิสงได้น้อยที่สุดคือ 8.26 log CFU/g roots (ตารางที่ 2)

จากข้อมูลดังกล่าวได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB โดยพิจารณาจากฐานคิด คือ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดี จะให้ประโยชน์กับพืชได้มากขึ้นหากเชื้อจุลินทรีย์นั้นสามารถยึดเกาะกับรากพืชได้ดี ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชและให้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่จะเข้ามาทำลายพืชในบริเวณราก อีกทั้งเชื้อที่ยึดเกาะกับรากได้ดีนี้จะให้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญแก่พืชในด้านอื่น ๆ ได้อีกด้วย หรือเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า Plany growth promoting rhizobacteria (PGPR) ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถทั้งในการยับยั้งเชื้อรากก่อโรครากเน่า และมีความสามารถในการยึดเกาะกับรากถั่วลิสงได้ดีจะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบต่อไป โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเกาะติดกับรากของถั่วลิสงจากตารางที่ 2 แล้วจึงได้คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถทั้งสองอย่างที่ดีที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลทได้แก่ เชื้อไอโซเลท A20, A45, A62, และ A106 ดังรูปที่ 6 เพื่อทำการทดสอบต่อไป

รูปที่ 5 การทดสอบการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์กับรากถั่วลิสง



รูปที่ 6 การยับยั้งเชื้อราของเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับ Control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

2. การระบุชนิดของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำเชื้อในกลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ไอโซเลท A20, A45, A62, และ A106 มาสกัด genomic DNA แล้วเพิ่มปริมาณ ได้แก่ DNA ในส่วนของ ribosomal DNA บริเวณ 16 SrDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลผลที่ได้พบว่า เชื้อ PGPR ไอโซเลท A20 ระบุเป็นเชื้อ *Bacillus megaterium* strain AM1C7 ที่มีความเหมือนของระดับนิวคลีโอไทด์ 99% สำหรับเชื้อ PGPR ไอโซเลท A45 ระบุเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* strain Setapak 8 ที่มีความเหมือนของระดับนิวคลีโอไทด์ 99% ส่วนเชื้อ PGPR ไอโซเลท A62 ระบุเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130 ที่มีความเหมือนของระดับนิวคลีโอไทด์ 99% และเชื้อ PGPR ไอโซเลท A62 ระบุเป็น เชื้อ *Pseudomonas* sp. NJ-61 ที่มีความเหมือนของระดับนิวคลีโอไทด์ 95% (ตารางที่ 3)

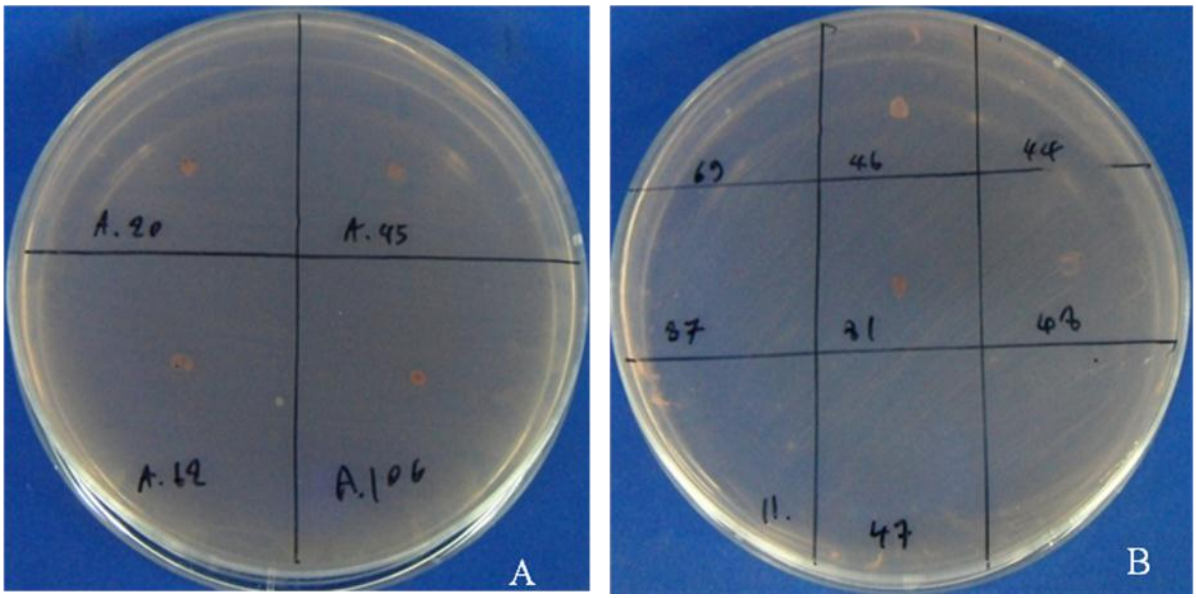
ตารางที่ 3 ระบุชนิดของเชื้อ PGPR โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

เชื้อ PGPR	เชื้อที่ระบุในฐานข้อมูล	ความเหมือน (%)
A20	*Bacillus megaterium* strain AM1C7	99%
A45	*Bacillus subtilis* strain Setapak 8	99%
A62	*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130	99%
A106	*Pseudomonas* sp. NJ-61	95%

3. การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้กับเชื้อไรโซเบียม

ในการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบหัวเชื้อผสมนั้นจำเป็นจะต้องทำการตรวจสอบว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้จะยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ร่วมกันหรือไม่ ดังนั้นเชื้อในกลุ่ม PGPR ทั้ง 4 ชนิด ได้ทดสอบการอยู่ร่วมกันได้กับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. TAL173 ซึ่งเป็นหัวเชื้อทางการค้าที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรใช้คลุกกับเมล็ดถั่วลิสงก่อนการปลูก โดยเชื้อไรโซเบียม TAL173 นี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงกับถั่วลิสง แต่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ได้ โดยผลการทดลองการอยู่

ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้กับเชื้อไรโซเบียม TAL173 พบว่าเชื้อ PGPR ทั้ง 4 ชนิด สามารถอยู่ร่วมกันได้กับเชื้อไรโซเบียม TAL 173 ทั้งนี้ทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ PGPR จำนวน 10 ไมโครลิตร (10^8 cell) บนอาหาร (NA) ที่เลี้ยงเชื้อไรโซเบียมไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจสอบการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด ผลการทดสอบพบว่าไม่พบเชื้อใดมีการยับยั้งการเจริญของกันและกัน และสามารถเพาะเลี้ยงร่วมกันได้ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การทดสอบการอยู่ร่วมกันได้ของเชื้อ PGPR และ เชื้อไรโซเบียม TAL173

A : เชื้อ PGPR ที่คัดเลือก

B : เชื้อ PGPR อื่นๆ

4. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบความสามารถอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนกลุ่มออกซิน หรือ Indole acetic acid (IAA) และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครากเน่า เช่น เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เซลลูเลส รวมทั้งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยทำให้เชื้อจุลินทรีย์ยึด

เกาะกับรากพืชได้ดี และป้องกันการเข้ายึดเกาะ (colonization) ของเชื้อราก่อโรคที่บริเวณรากพืช ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ในการผลิตไบโอฟิล์ม การสร้างสาร IAA และการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายการเจริญของเชื้อราก่อโรค

จุลินทรีย์	การสร้างไบโอฟิล์ม	การสังเคราะห์ IAA	Protease	Chitinase	Cellulase
A20	2.6631 ± 0.36^{a}	17.75 ± 0.01^{bc}	+	-	-
A45	1.3566 ± 0.14^{b}	28.86 ± 0.04^{b}	+	-	-
A62	1.3090 ± 0.48^{b}	65.50 ± 0.03^{a}	+	-	-
A106	1.3859 ± 0.31^{b}	13.30 ± 0.01^{c}	-	-	-

การตรวจวัดปริมาณไบโอฟิล์มจะวัดจากค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 595 nm

หน่วยการวัดปริมาณ IAA, ppm ต่อ 1×10^{8} cfu

\+ มีกิจกรรมของเอนไซม์

\- ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อทุกไอโซเลทมีการสร้างไบโอฟิล์ม และมีการสังเคราะห์ IAA โดยไอโซเลท A20 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเชื้ออื่น ๆ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท A62 มีการสังเคราะห์ IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมการเจริญของรากพืช แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้เหล่านี้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี แต่อย่างไรก็ดีเมื่อทดสอบการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่อาจเกี่ยวข้องในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า พบว่าเชื้อ PGPR ทุกไอโซเลทยกเว้น A106 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่มีเชื้อใดเลยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเซลลูเลส แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ไอโซเลท A20, A45 และ A62 อาจสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลาย

โปรตีนบนผนังเซลล์ของเชื้อราและส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในขณะที่เชื้อไอโซเลท A106 อาจมีกลไกอื่นในการเข้ายับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

อย่างไรก็ดีเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้นำเชื้อทั้ง 4 ชนิดไปใช้ในการทดสอบระดับกระถางต่อไป เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช และยังมีความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่าในพืชได้ (Biological control) โดยจะทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรค *A. niger* ที่สร้างความเสียหายรุนแรงทั้งต่อเกษตรกร ผู้บริโภค อุตสาหกรรม และการส่งออกผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

5. การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

เชื้อราก่อโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *A. niger* จะถูกนำไปทดสอบกับถั่วลิสง เพื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่จะก่อให้เกิดอาการโรคในพืช โดยนำเมล็ดถั่วลิสงที่ต้องการทดสอบมาทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด จากนั้นเตรียมสปอร์ของเชื้อราในจำนวนสปอร์ปริมาณต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^7 conidia ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปคลุกกับเมล็ด และเพาะในทรายปลอดเชื้อที่บรรจุในกระถางทดสอบ ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสงถึง 100 % ในขณะที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^6 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 91.33 %, ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^5 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 87 %, ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^4 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 77 %, ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^3 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 68 %, ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^2 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 52% และที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10 สปอร์ให้ผลการเกิดโรครากเน่าต่อเมล็ดถั่วลิสง 47 % ในขณะที่ Control ซึ่งไม่ได้ใส่สปอร์ของเชื้อราในการทดสอบ พบว่ามีการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดโดยมีเชื้อ *A. niger* เป็นสาเหตุอยู่ถึง 32% ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่จะก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

ความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา *A. niger* (สปอร์/มิลลิลิตร)	การเกิดโรครากเน่า (%)			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
Control	36%	28%	32%	32%
10^1	55%	37%	50%	47%
10^2	61%	47%	50%	52%
10^3	68%	71%	65%	68%
10^4	71%	72%	88%	77%
10^5	89%	86%	87%	87%
10^6	86%	100%	88%	91.33%
10^7	100%	100%	100%	100%

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อราที่ 10^5 ถึง 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ถั่วลิสงมีอาการโรคพืชมากกว่า ที่ 80 % ดังนั้นปริมาณเชื้อราในช่วง ที่ 10^5 ถึง 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะนำไปทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพของหัวเชื้อในรูปแบบผสมระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ ในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าซึ่งเกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสงต่อไป

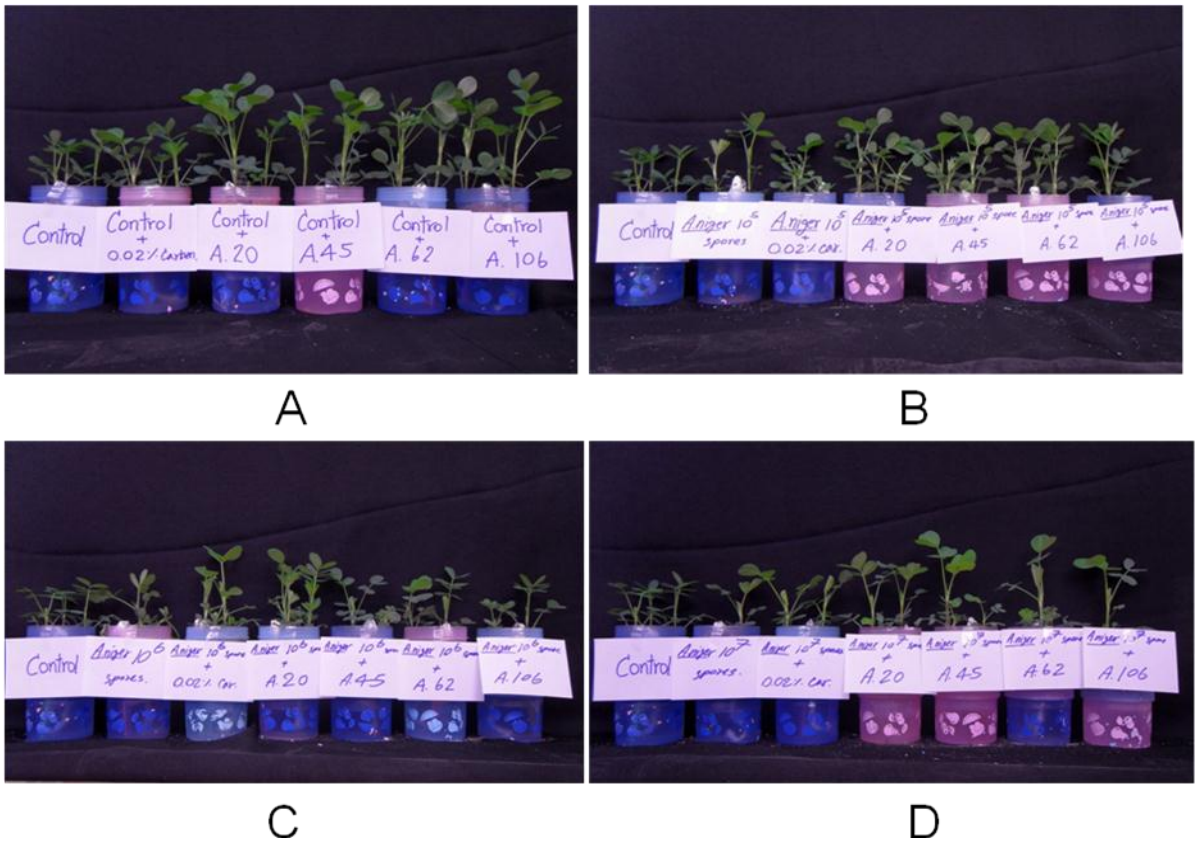
6. การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อในรูปแบบผสมระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และการส่งเสริมการเจริญของพืช

ทำการทดสอบโดยนำเมล็ดถั่วลิสงมาทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด แล้วคลุกเมล็ดด้วยเชื้อราในปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^5 ถึง 10^7 แล้วทำการหยอดเชื้อ PGPR ในปริมาณ 10^8 เซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด เพื่อให้พืชแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *A. niger* โดยปลูกในวัสดุปลูกจำนวน 3 เมล็ดต่อกระถางทดสอบ ผลการทดลองพบว่า เชื้อ PGPR ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อสาเหตุ *A. niger* ได้ในทุกความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อรา เมื่อเปรียบเทียบกับการที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 6

โดยเชื้อที่มีผลในการควบคุมโรครากเน่าได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PGPR ไอโซเลท A20 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นสปอร์ของเชื้อราที่ 10^5 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่าเพียง 8.33% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราไปเป็นที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 16.66% และที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 54.16% สำหรับเชื้อ PGPR ไอโซเลท A45 พบว่าที่ความเข้มข้นสปอร์เชื้อราที่ 10^5 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่าเพียง 16.66% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อราที่ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 54.16% และที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 64.58% ในขณะที่เชื้อ PGPR ไอโซเลท A62 มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ไม่คงที่ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นสปอร์เชื้อราที่ 10^5 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่าเพียง 25% และที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^6 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 66.66% ในขณะที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่า ลดลงจากเดิมโดยพบการแสดงอาการโรครากเน่าเพียง 58.33% และเชื้อ PGPR ไอโซเลท A106 พบว่าที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^5 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่าเพียง 25% และเมื่อความเข้มข้นของสปอร์เพิ่มขึ้นที่จำนวนสปอร์ 10^6 สปอร์ พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่า 41.66% และที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ มีการแสดงอาการของโรครากเน่า 66.66% ในขณะที่ถั่วลิสงที่ไม่ได้ใส่เชื้อ PGPR (control) พบว่ามีการแสดงอาการของโรครากเน่ามากกว่าถั่วลิสงที่ใส่เชื้อ PGPR ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ PGPR ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถใช้ร่วมกับเชื้อไรโซเบียม TAL173 เพื่อช่วยยับยั้งการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *A. niger* นอกจากนี้ยังช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยรวมดังแสดงในรูปที่ 8 แต่อย่างไรก็ดีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ของเชื้อ PGPR ยังไม่เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อรา (0.02% Carbendazim)

ตารางที่ 6 การทดสอบการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อราสาเหตุ *Aspergillus niger* ในความเข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรครากเน่าในหนึ่งสัปดาห์

ความเข้มข้นสปอร์ของเชื้อรา / การทดสอบเมล็ดถั่วลิสง	***A. niger* 10 ^{5} spore/ ml/seed**	***A. niger* 10 ^{6} spore/ ml/seed**	***A. niger* 10^7 spore/ ml/seed**
Control	41.66 %	68.75%	70.83%
ไรโซเบียม TAL173 + A20	8.33%	16.66%	54.16%
ไรโซเบียม TAL173 + A45	16.66%	54.16%	64.58%
ไรโซเบียม TAL173 + A62	25%	66.66%	58.33%
ไรโซเบียม TAL173 + A106	25%	41.66%	66.66%
0.02 % Carbendazim	0%	0%	0%



รูปที่ 8 การทดสอบการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสงจากเชื้อสาเหตุ *Aspergillus niger* ในความเข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรครากเน่าในหนึ่งสัปดาห์ A : Control (non fungus inoculation), B : *A. niger* 10^5 spore/ml/seed, C : *A. niger* 10^6 spore/ml/seed, D : *A. niger* 10^7 spore/ml/seed

จากผลการทดลองที่ได้ ทำการคัดเลือกเชื้อ PGPR ที่มีความสามารถในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสงได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท A20 และ A45 มาทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ PGPR ที่เหมาะสมในการใช้ร่วมกับเชื้อไรโซเบียม โดยเจือจางปริมาณของเชื้อ PGPR ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4 ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบกับถั่วลิสง ผลการทดสอบพบว่าการใช้เชื้อ PGPR ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสง รวมทั้งส่งเสริมการเจริญของพืช และการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมได้ดี ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของการใช้เชื้อ PGPR ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการใช้หัวเชื้อไรโซเบียม TAL173 ต่อการเจริญของถั่วลิสง

Treatment	Plant dry weight (g)	Root dry weight (g)	Nodule No.	Nodule dry weight (g)
Control (un-inoculate)	0.697 ^{b}	0.090 ^{c}	0.00 ^{d}	0.0000 ^{d}
TAL 173 alone	0.803 ^{ab}	0.142 ^{bc}	7.33 ^{bcd}	0.0096 ^{cd}
TAL173+A20 (10^{4})	0.883 ^{ab}	0.186 ^{ab}	8.67 ^{bcd}	0.0072 ^{abc}
TAL 173+A20 (10^{5})	0.890 ^{ab}	0.216 ^{a}	6.00 ^{bcd}	0.0186 ^{abc}
TAL 173+A20 (10^{6})	0.873 ^{ab}	0.215 ^{a}	16.67 ^{abc}	0.0340 ^{a}
TAL 173+A20 (10^{7})	1.137 ^{a}	0.205 ^{ab}	7.00 ^{abcd}	0.0219 ^{ab}
TAL 173+A20 (10^{8})	0.877 ^{ab}	0.184 ^{ab}	13.67 ^{abc}	0.0311 ^{a}
TAL173+A45 (10^{4})	0.883 ^{ab}	0.234 ^{a}	16.00 ^{abcd}	0.0178 ^{abc}
TAL173+A45 (10^{5})	0.823 ^{ab}	0.185 ^{ab}	18.00 ^{a}	0.0225 ^{ab}
TAL173+A45 (10^{6})	0.980 ^{ab}	0.206 ^{ab}	13.33 ^{abc}	0.0306 ^{a}
TAL173+A45 (10^{7})	0.910 ^{ab}	0.208 ^{ab}	13.33 ^{abc}	0.0276 ^{ab}
TAL173+A45 (10^{8})	0.810 ^{ab}	0.190 ^{ab}	17.00 ^{abc}	0.0224 ^{ab}

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมที่เดิมมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืชเพียงอย่างเดียว แต่ในงานวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะให้หัวเชื้อไรโซเบียมมีความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้อีกคุณสมบัติหนึ่งด้วย โดยเฉพาะโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากแหล่งต่าง ๆ และทำการทดสอบหาเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Didymella* spp. และ *Aspergillus niger* โดยเฉพาะเชื้อ *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาแก่เกษตรกรผู้ปลูกถั่วลิสงเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อรา *A. niger* สามารถแพร่กระจายได้ในดิน และยังสามารถติดไปกับเมล็ดของถั่วลิสง โดยเชื้อรานี้จะแทรกอยู่ในเมล็ดของถั่วลิสง และเข้าทำลายถั่วลิสงโดยเฉพาะที่บริเวณราก ก่อให้เกิดโรครากเน่า ซึ่งส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อพืช ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตลดลง ทั้งนี้จากการทดสอบพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท A20, A45, A62 และ A106 สามารถยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า *A. niger* ในถั่วลิสงได้ โดยเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อไอโซเลท A20, A45, A62 และ A106 เป็นเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* strain AM1C7, *Bacillus subtilis* strain Setapak 8, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130 และ *Pseudomonas* sp. NJ-61 ตามลำดับ จากนั้นได้ทำการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ร่วมกับไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ที่ใช้ในเชิงพานิชย์ TAL173 พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อไรโซเบียม TAL173 ได้ และเมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ร่วมกับการใช้เชื้อไรโซเบียม TAL173 มาทดสอบความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่าในถั่วลิสงที่เกิดจาก *A. niger* ในระดับกระถางในห้องทดลอง ผลที่ได้พบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อ PGPR ทั้ง 4 ชนิดสามารถควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *A. niger* และส่งเสริมการเจริญของพืชได้ ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อราในระบบการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย ในขั้นตอนต่อไปจะทำการทดลองโดยทำการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่มี PGPR ร่วมด้วย และนับการมีชีวิตรอดของไรโซเบียม และPGPR ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน

บรรณานุกรม

Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. and Audran J.C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* cocultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 186:91–95.

Alexander, M. (1962). Introduction of Soil Microbiology. Soil Science. 93(1): 74.

Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., and Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus L.*). Plant and Soil. 204(1): 57-67.

Arora N.K. , Kang S.C. and Maheshwari D.K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Sci. 81(6): 673-677.

Bardin S.D., Huang H.C., Pinto J., Amundsen E.J. and Erickson R.S. (2004). Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. Can. J. Bot. 82(3): 291–296.

Borgen, A. (2004). Control of seed borne diseases in organic seed propagation. Proceedings of the First World Conference on Organic Seed. July 5-7th, FAO Headquarters, Rome Itly. 1:170-171.

Chatterton S., Sutton J.C. and Boland G.J. (2004). Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. Biol. Control. 30:360–373.

Compant S., Duffy B., Nowak J., Cle´ment C. and Ait Barka E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71(9): 4951–4959.

Dakora, F. D., and Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil. 245: 35-47.

Dakora, F. D., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. (1993). Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. Molecular Plant-Microbe Interactions 6: 665-668.

Dakora, F. D., Kanu, S., and Matiru, V. N. (2005). Ecological singificance of lumichrome and riboflavin as signals in the rhizosphere of plants. Sustainable Agriculture and the Environment. 41(0924-1949): 253-256.

Deshwal V.K., Dubey R.C. and Maheshwari D.K. (2003). Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. Current Sci. 84(3): 443-448.

Dileep. C., Kumar, B. S. D. and Dube, H. C. (1999). Disease suppression and plant growth promotion of peanut by fluorescent pseudomonas strains, FPC 32 and FPO 4, in soil infected with collar-rot fungi, *Aspergillus niger*. Indian Phytopathology. 52: 415-416.

Ehteshamul-Haque, S., and Ghaffar, A. (1992). Effect of *Trichoderma* sp. and *Rhizobium meliloti* in the control of root rot fungus. Pakistan Journal of Botany. 24: 217-221.

Elwaki, M. A. and El-Metwally, M. A. (2001). Seed borne fungi of Peanut in Egypt: Pathogenicity and Transmission. Pakistan Journal of Biological Science. 4(1):63-68.

Glick B. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109–117.

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.

Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., and Suzui, T. (1989). Production of antibiotics by Pseudomonas cepacia as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. Soil Biology and Biochemistry**.** 21(5): 723-728.

Hynes, R. K., Craig, K. A., Covert, D., Smith, R. S., and Rennie, R. J. (1995). Liquind rhizobial inoculants for lentil and field pea. Journal of Production Agriculture 8: 547-552.

Ingold, C. T. (1953). Dispersal in fungi. Oxford University Press, London, UK, 197 pp.

Jan, D.,and Robert, A.S.(2007). A multifaceted approach to fungi and food. illustrated. CRC Press.138.

Kiss, L. (2003). A review of fungal antagonsis of powdery mildews and their potential as biocontrol agent. Pest Manag. Sci. 59: 475-483.

Lashin. S. M., El-Nasr, H. I. S., El-Nagar, M. A. A. and Nofal, M. A. (1989). Biological control of *Aspergillus niger* the causal organism of peanut crown rot by *Trichoderma harzianum*. Annual Agricultural Science. 34:795-803.

Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., and Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. Field Crops Research. 65: 259-270.

Malajczuk, N., Pearce, M., and Litchfield, R. T. (1984). Interactions between *Phytophthora cinnamomi* and *Rhizobium* isolates. Brazilian Journal of Microbiology. 82(3): 491-500.

Maude, R. B. (1996). Seed borne diseases and their control, Principles and Practice.CAB International. 280 pp.

Pal, K. K., Spadden, M., and Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The plant health Instructor. 10(10940): 2006-1117.

Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek, P.(1993). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. International journal of food microbiology. 20(4):211-226.

Podile, A. R., and Prakash, A. P. (1996) Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. Canadian Journal of Microbiology. 42:533-538.

Raupach G. S. and Kloepper J.W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology. 88: 1158–1164.

Sahgal, M., and Johri, B. N. (2003). The changing face of rhizobial systematics. Current Science. 84(1): 43.

Savoure, A., Magyar, Z., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. The EMBO Journal. 13(5): 1093.

Somasegaran, P., and Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia, Methods in Legume Rhizobium Technology. USA: Edwards Brothes.

Stephens, J. H. G., and Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. Field Crops Research. 65(2-3): 249-258.

Verma , V. C., and Kharwar, R. N. (2006). Efficacy of neem leaf extract against it's own fungal endophyte *Curvularia lunata*. Journal of Agricultural Technology 2(2): 329-335.

Ziedan, E.H.E. (2006). Manipulating Endophytic Bacteria for Biological Control to Soil Borne Diseases of Peanut. Journal of Applied Sciences Research 2(8): 497-502.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว พรรณลดา ติตตะบุตร ตำแหน่งปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2521 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2541 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2548 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ คือ เทคโนโลยีไรโซเบียม เทคโนโลยีการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ และเทคนิคทางจุลชีววิทยา และอณูชีววิทยา งานวิจัยที่กำลังดำเนินการในขณะนี้ได้แก่ ผลของเอทธิลีน และการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียม ต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดกับพืช การพัฒนากระบวนการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว เช่น

J. D. Awaya, Tittabutr P., Q. X. Li, and D. Borthakur. (2008). Pyruvate carboxylase is involved in metabolism of mimosine to 3-hydroxy-4-pyridone by Rhizobium sp. strain TAL1145. Archives in Microbiology 190: 409-415.

Tittabutr P., Q. X. Li, and D. Borthakur. (2008). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase in Rhizobium sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of Leucaena leucocephala. Systematic and Applied Microbiology 31: 141-150.

สามารถติดต่อได้ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โทรศัพท์ 044-224159 หรือโทรสาร 044-224154, email panlada@sut.ac.th