

ลักษณะสมบัติของ *Azospirillum* sp. ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์
ของ *Bacillus* sp. ต่อการติดเชื้อ *Rhizoctonia solani*



นางสาวลินดา อารีย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERISTICS OF *Azospirillum* sp. FOR RICE GROWTH PROMOTION ALONG WITH
ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *Bacillus* sp. AGAINST *Rhizoctonia solani* INFECTION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

5672071323 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: AZOSPIRILLUM, BIOCONTROL, MARINE BACTERIA, PGPR, RHIZOCTONIA, RICE SHEATH BLIGHT

LINDA AREE: CHARACTERISTICS OF *Azospirillum* sp. FOR RICE GROWTH PROMOTION ALONG WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *Bacillus* sp. AGAINST *Rhizoctonia solani* INFECTION. ADVISOR: ASST. PROF. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 158 pp.

This research focused on characterization of *Azospirillum* with great attribute on promoting rice growth, and also intended to test the ability of three isolates of marine bacteria to inhibit the growth of the fungus *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. In a biocontrol aspect using marine bacteria, *Bacillus subtilis* TD12-11 and *Bacillus aryabhattai* TW1-1N9 showed antifungal activity against *R. solani*. Although all isolates of *Azospirillum* were not able to inhibit *R. solani* on dual culture agar plate, however, plant growth promoting capabilities were found in almost all isolates of *Azospirillum*; for example, they could produce indole acetic acid (IAA) which is a plant growth hormone in the range of 0.70-200.19 µg/ml, were able to fix nitrogen, could solubilize phosphate, and could produce siderophore. *Azospirillum brasilense* TS24 showed the best candidate for using as plant growth promoting rhizobacteria. By investigating the effects of bacterial isolates on the growth of rice, it was found that most of *Azospirillum* isolates were able to fix nitrogen, able to increase the number of lateral root, plant height, and dry matter, significantly. For marine bacterial isolates, they were able to increase the strength of root, number of lateral root, plant height, and dry matter, significantly as well. Sheath blight of rice protection experiment revealed that co-utilization of *Azospirillum* sp. together with marine bacteria could reduce the symptoms of the rice sheath blight and had control efficacy accounting for 66.17-89.70%. *Azospirillum zeae* PNPB9 with *B. aryabhattai* TW1-1N9 were most effective in preventing this disease. Co-application of these two groups of bacteria as inoculants of biofertilizer is an efficient approach to replace chemical fertilizers and fungicides for sustainable agriculture.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Technology Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ทั้งความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนให้การอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงได้กรุณาช่วยแก้ไขและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. ภัศชญภณ หมั่นแจ่ม ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การอนุเคราะห์แบคทีเรีย และราสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และการอบรมสั่งสอน ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และการอำนวยความสะดวกต่างๆจนทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ทุนวิทยบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุน ทุนการศึกษา โดยยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาเป็นเวลา 1 ปีการศึกษา

ขอขอบคุณพี่และน้องๆในห้องวิจัย 1904/15 ทุกท่าน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนในการเรียนต่อระดับปริญญาโท รวมถึงความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

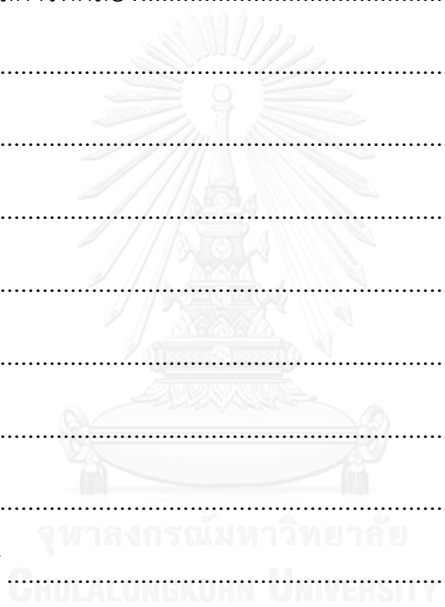
| | |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 7 |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 7 |
| บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม | 8 |
| 2.1 ข้อมูลทั่วไปของข้าว | 8 |
| 2.2 พื้นที่เพาะปลูกและปริมาณผลผลิตข้าวในประเทศไทย | 9 |
| 2.3 ความสำคัญของข้าวต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ..... | 9 |
| 2.4 โรคสำคัญที่เกิดในต้นข้าว | 10 |
| 2.5 <i>Rhizoctonia solani</i> ที่ก่อโรคในพืช | 12 |
| 2.6 โรคกาบใบแห้ง (Rice sheath blight)..... | 15 |
| 2.6.1 อาการของโรคกาบใบแห้ง..... | 15 |
| 2.6.2 การแพร่กระจายของ <i>R. solani</i> | 16 |
| 2.6.3 การป้องกันและกำจัดราที่ก่อโรคกาบใบแห้งในข้าว..... | 17 |
| 2.7 การควบคุมโรคทางชีวภาพ (biological control)..... | 18 |
| 2.7.1 กลไกการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 2.8 <i>Bacillus</i> | 22 |
| 2.8.1 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของ <i>Bacillus</i> | 22 |
| 2.8.2 แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเลกับการควบคุมทางชีวภาพ | 24 |
| 2.9 ไรโซแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช หรือพีจีพีอาร์ (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) | 26 |
| 2.9.1 <i>Azospirillum</i> | 27 |
| 2.9.2 สมบัติของการเป็นพีจีพีอาร์ | 28 |
| 2.9.3 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของ <i>Azospirillum</i> | 30 |
| 2.10 การจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการ..... | 33 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... | 34 |
| 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... | 34 |
| 3.2 เคมีภัณฑ์..... | 35 |
| 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์..... | 38 |
| 3.4 จุลินทรีย์และการเก็บรักษา | 38 |
| 3.4.1 แบคทีเรีย | 38 |
| 3.4.2 ราก่อโรคพืช | 38 |
| 3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย | 39 |
| 3.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราเบื้องต้น..... | 39 |
| 3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย | 40 |
| 3.6 การกำหนดปริมาณเชื้อโดยการถ่ายภาพมาตรฐาน | 41 |
| 3.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช... 41 | |
| 3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ..... | 41 |
| 3.7.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA)..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.7.3 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต | 42 |
| 3.7.4 การทดสอบการผลิตสารไซโตโครฟอรั..... | 42 |
| 3.7.5 การทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน..... | 43 |
| 3.8 การทดสอบการติดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว | 43 |
| 3.8.1 การเตรียมเมล็ดข้าว..... | 43 |
| 3.8.2 การทดสอบการเกิดโรคโดยราในต้นข้าว | 43 |
| 3.9 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลในต้นข้าว..... | 44 |
| 3.9.1 การเตรียมเมล็ดข้าวและหัวเชื้อของแบคทีเรีย..... | 44 |
| 3.9.2 การส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของ <i>Azospirillum</i> sp. ในต้นข้าว..... | 44 |
| 3.9.3 การส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของแบคทีเรียจากน้ำทะเลในต้นข้าว..... | 45 |
| 3.10 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล | 45 |
| 3.11 การทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวที่เกิดจากรา..... | 46 |
| 3.11.1 การเตรียมเมล็ดข้าวและหัวเชื้อของแบคทีเรีย..... | 46 |
| 3.11.2 การทดสอบการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากรา..... | 46 |
| 3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย | 47 |
| 3.12.1 ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือก | 47 |
| 3.12.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา | 47 |
| 3.12.3 ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ <i>Azospirillum</i> sp..... | 47 |
| 3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 49 |
| 3.13.1 สถิติพรรณนา (descriptive statistics) | 49 |
| 3.13.2 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (covariance) | 49 |

| | |
|---|----|
| บทที่ 4 ผลการทดลอง..... | 50 |
| 4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช <i>R. solani</i> ของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล | 50 |
| 4.1.1 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยการเลี้ยงร่วมกัน (dual culture)..... | 50 |
| 4.1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย | 52 |
| 4.2 ผลการกำหนดปริมาณเชื้อโดยการถ่ายภาพมาตรฐาน..... | 54 |
| 4.3 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช..... | 56 |
| 4.3.1 ความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 56 |
| 4.3.2 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 57 |
| 4.3.3 ความสามารถในการผลิตสารไซโตไคน์ของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 58 |
| 4.3.4 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล | 59 |
| 4.4 ผลการทดสอบการติดเชื้อมาก่อโรคในต้นข้าว..... | 60 |
| 4.5 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อต้นข้าว..... | 61 |
| 4.5.1 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของ <i>Azospirillum</i> sp. ต่อต้นข้าว..... | 61 |
| 4.5.2 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อต้นข้าว..... | 68 |
| 4.6 ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| 4.7 ผลการทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวที่เกิดจากรา | 81 |
| 4.8 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย | 91 |
| 4.8.1 สมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 91 |
| 4.8.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา | 93 |
| 4.8.3 ข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ <i>Azospirillum</i> sp..... | 99 |
| บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 101 |
| รายการอ้างอิง | 109 |
| ภาคผนวก..... | 124 |
| ภาคผนวก ก | 125 |
| ภาคผนวก ข | 129 |
| ภาคผนวก ค | 132 |
| ภาคผนวก ง..... | 133 |
| ภาคผนวก จ | 145 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ | 158 |



สารบัญตาราง

หน้า

| | |
|---|-----|
| ตารางที่ 2.1: โรคของข้าวที่เกิดจากราสายพันธุ์ต่างๆ..... | 11 |
| ตารางที่ 4.1: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น, ความยาวของรากและต้น และระดับอาการ ใบเหลือง ของต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลตต่างๆ ที่เวลา 14 วัน..... | 62 |
| ตารางที่ 4.2: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น, ความยาวของรากและต้น และระดับอาการ ใบเหลือง ของต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลตต่างๆ ที่เวลา 14 วัน..... | 69 |
| ตารางที่ 4.3: ข้อมูลของ <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลแต่ละไอโซเลตในการผลิต ปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว และการอยู่ร่วมกันของ แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด..... | 77 |
| ตารางที่ 4.4: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น และความยาวของรากและต้นของต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล และติดเชื้อ <i>R. solani</i> ที่เวลา 14 วัน..... | 82 |
| ตารางที่ 4.5: ระดับการเกิดโรคที่เกิดจาก <i>R. solani</i> เมื่อมี <i>Azospirillum</i> sp. กับแบคทีเรียจาก น้ำทะเล ภายหลังติดเชื้อ <i>R. solani</i> 14 วัน..... | 83 |
| ตารางที่ 4.6: ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 92 |
| ตารางที่ 4.7: ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากน้ำทะเล | 95 |
| ตารางที่ 4.8 : ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>Azospirillum</i> sp..... | 97 |
| ตารางที่ 4.9: การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ <i>Azospirillum</i> sp. ทั้ง 6 ไอโซเลตกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank | 100 |

สารบัญรูปร่างภาพ

หน้า

| | |
|--|----|
| รูปที่ 2.1: ลักษณะของเมล็ดข้าวที่นิยมปลูกในทวีปเอเชีย | 9 |
| รูปที่ 2.2: ลักษณะเส้นใยของ <i>R. solani</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... | 13 |
| รูปที่ 2.3: (ก) การเจริญและลักษณะเส้นใยของ <i>R. solani</i> บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ข) การเจริญและลักษณะของสเคลอโรเทียมของ <i>R. solani</i> บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน..... | 13 |
| รูปที่ 2.4: วงชีวิตของ <i>R. solani</i> ที่ก่อโรคในพืช | 14 |
| รูปที่ 2.5: ลักษณะแผลบริเวณแผ่นใบ..... | 15 |
| รูปที่ 2.6: แผลตามกาบใบระยะเริ่มแรกของต้นข้าวระหว่างการเจริญของข้าวที่มีการยืดบริเวณข้อ . | 16 |
| รูปที่ 2.7: (ก) การติดเชื้อในธรรมชาติในบริเวณที่ต้นข้าวแตกกอกันอย่างเบียดเสียด (ข) การลดลงของผลผลิตข้าวจำนวนมากเนื่องจากโรคกาบใบแห้ง..... | 17 |
| รูปที่ 2.8: สเคลอโรเทียมของ <i>R. solani</i> ที่ยึดเกาะบนต้นข้าว..... | 17 |
| รูปที่ 2.9: ระบบการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันในพืช | 21 |
| รูปที่ 2.10: กลไกต่างๆของพีจีพีอาร์ในการส่งเสริมการเจริญต่อพืช | 27 |
| รูปที่ 2.11: แบคทีเรียในดินที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน | 29 |
| รูปที่ 3.1: วิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชด้วยเทคนิคการขีดแบคทีเรีย..... | 40 |
| รูปที่ 3.2: วิธีการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง <i>Azospirillum</i> sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล..... | 45 |
| รูปที่ 4.1: การไม่สามารถยับยั้ง <i>R. solani</i> ของ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลตต่างๆ (ก.-ง.)..... | 51 |
| รูปที่ 4.2: การยับยั้งรา <i>R. solani</i> ของแบคทีเรียจากน้ำทะเล (ก) ไอโซเลต TU13-9, (ข) ไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) ไอโซเลต TD12-11 | 51 |
| รูปที่ 4.3: การเจริญของ <i>R. solani</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า ลูกศรในแต่ละรูปแสดงผลการแตกแขนงที่ผิดปกติ และการบวมพองของเส้นใย (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ถูกเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย, (ข) เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต TD12-11 | 52 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 4.4: (ก) เพลทควบคุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB, (ข) เพลทที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) เพลทที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต TD12-11 | 53 |
| รูปที่ 4.5: เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>R. solani</i> โดยใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย TW1-1N9 และ TD12-11..... | 53 |
| รูปที่ 4.6: แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD ₆₆₀) กับ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียจากน้ำทะเล ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... | 54 |
| รูปที่ 4.7: แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (OD ₅₆₀) กับ ปริมาณเซลล์ <i>Azospirillum</i> sp. ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สำเร็จรูปสูตร NFb เป็นเวลา 5 วัน..... | 55 |
| รูปที่ 4.8: แผนภูมิแสดงความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติกของ <i>Azospirillum</i> sp. ที่ เวลา 3, 5 และ 7 วัน..... | 56 |
| รูปที่ 4.9: ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลตต่างๆบนอาหาร แข็ง NBRIIP ที่เวลา 20 วัน ลูกศรในแต่ละรูปแสดงผลจากไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ (ก) PNPBH3 และ PNPBH9, (ข) PNPBH5, (ค) SBUT6 และ (ง) TS24..... | 57 |
| รูปที่ 4.10: ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลตต่างๆ..... | 57 |
| รูปที่ 4.11: การผลิตไฮเดรโอโรฟอรัสของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome Azurol Sulphonate (CAS) (ก)-(ง) การผลิตไฮเดรโอโรฟอรัสของ <i>Azospirillum</i> sp. และ (จ) การผลิตไฮเดรโอโรฟอรัสของแบคทีเรียจากน้ำทะเล | 58 |
| รูปที่ 4.12: ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนของ <i>Azospirillum</i> sp. ที่ เวลา 7 วัน..... | 59 |
| รูปที่ 4.13: การทดสอบการติดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว (ก) ต้นข้าวชุดควบคุมที่ไม่ใส่ราที่เวลา 14 วัน, (ข) ต้นข้าวที่ใส่ <i>R. solani</i> ที่เวลา 7 วัน และ (ค) ต้นข้าวที่ใส่ <i>R. solani</i> ที่เวลา 14 วัน..... | 60 |
| รูปที่ 4.14: ต้นข้าวที่ไม่มีการใส่ <i>Azospirillum</i> sp. (ก) ต้นข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มี ไนโตรเจน และ (ข) ต้นข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน..... | 63 |
| รูปที่ 4.15: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต (ก) PNPBH3, (ข) PNPBH5 และ (ค) PNPBH6 | 64 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 4.16: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต (ก) PNPB7, (ข) PNPB9, (ค) PNCNX7 และ (ง) PNCNX8 | 65 |
| รูปที่ 4.17: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต (ก) SBUT6, (ข) SBUT9, (ค) PE8 และ (ง) PE9..... | 66 |
| รูปที่ 4.18: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต (ก) TS8, (ข) TS11, (ค) TS14 และ (ง) TS24 | 67 |
| รูปที่ 4.19: ต้นข้าวในชุดควบคุมในสารละลายที่มีไนโตรเจน (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ | 70 |
| รูปที่ 4.20: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TW1-1N9 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ | 71 |
| รูปที่ 4.21: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TD12-11 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ..... | 72 |
| รูปที่ 4.22: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TU13-9 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ | 73 |
| รูปที่ 4.23: การเป็นปฏิปักษ์ของ <i>Azospirillum</i> sp. บางไอโซเลตกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต คือ TW1-1N9 และ TD12-11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Azospirillum</i> agar medium (ก) PE8, (ข) PE9, (ค) PNCNX7, (ง) PNCNX8, (จ) SBUT6, (ฉ) SBUT9, (ช) TS8, (ซ) TS11, (ณ) TS14 และ (ญ) TS24 | 75 |
| รูปที่ 4.24: การอยู่ร่วมกันระหว่าง <i>Azospirillum</i> sp. แต่ละไอโซเลตกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต คือ TW1-1N9 และ TD12-11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Azospirillum</i> agar medium (ก) PNPB3, (ข) PNPB5, (ค) PNPB6, (ง) PNPB7 และ (จ) PNPB9 | 76 |
| รูปที่ 4.25: ต้นข้าวที่ใส่เฉพาะ <i>R. solani</i> เกิดโรคกาบใบแห้ง (ก) ผลที่บริเวณแผ่นใบ, (ข) ผลบริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อน และ (ค) ลักษณะอาการต้นข้าวที่ใส่ <i>R. solani</i> | 84 |
| รูปที่ 4.26: ผลของต้นข้าวที่ใส่เฉพาะรา <i>R. solani</i> เกิดโรคกาบใบแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ก) ผลที่ข้อและบริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อนของต้นข้าว และ (ข) ผลบริเวณแผ่นใบของต้นข้าว..... | 85 |

| | |
|---|----|
| รูปที่ 4.27: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB3 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน | 86 |
| รูปที่ 4.28: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB3 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน..... | 87 |
| รูปที่ 4.29: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB5 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน | 88 |
| รูปที่ 4.30: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB5 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน..... | 89 |
| รูปที่ 4.31: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB9 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน | 90 |
| รูปที่ 4.32: ต้นข้าวที่ใส่ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลต PNPB9 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน..... | 91 |
| รูปที่ 4.33: การทดสอบย่อยแป้ง (ก) ไอโซเลต TW1-1N9 สามารถย่อยแป้งได้, (ข) ไอโซเลต TD12-11 สามารถย่อยแป้งได้ และ (ค) ไอโซเลต TU13-9 ไม่มีความสามารถย่อยแป้ง | 93 |
| รูปที่ 4.34: การทดสอบย่อยเคซีน (ก) ไอโซเลต TW1-1N9 สามารถย่อยเคซีนในนมได้, (ข) ไอโซเลต TD12-11 สามารถย่อยเคซีนในนมได้ และ (ค) ไอโซเลต TU13-9 สามารถย่อยเคซีนในนมได้ | 93 |
| รูปที่ 4.35: อีอาร์เอสเจลอิเล็กโทรโพรเซสของผลิตภัณฑ์บริเวณ 16S rDNA จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของ <i>Azospirillum</i> sp. ไอโซเลตต่างๆ ซึ่งมีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส (1) PNPB3, (2) PNPB5, (3) PNPB6, (4) PNPB7, (5) PNPB9 และ (6) TS24 | 99 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีผลิตผลทางการเกษตรได้แก่ พืชอาหารและพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่ใช้ภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ก่อให้เกิดการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ดังจะเห็นได้จากการที่ผลผลิตและรายได้จากการเกษตรยังคงมีความสำคัญอันดับสูงสุด คือ เป็นสัดส่วนถึงร้อยละ 25 ของผลผลิตรวมทั้งประเทศ และการส่งออกผลิตผลทางการเกษตรไปจำหน่ายต่างประเทศทำรายได้ถึงร้อยละ 60 ของรายได้จากการส่งออกของไทยทั้งหมด (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2552) ปัจจุบันจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการเติบโตของชุมชนเมืองและโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งส่งผลให้ประเทศประสบกับปัญหาพื้นที่การเกษตรที่อุดมสมบูรณ์ลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้พื้นที่ทางการเกษตรที่มีอยู่ในการเพาะปลูกพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, 2553b) ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งที่พบในภาคการเกษตรคือ ปัญหาการทำลายของศัตรูพืช ซึ่งพืชได้รับความเสียหายจากโรคพืชที่เกิดขึ้น และส่งผลกระทบต่อทำให้ผลผลิตลดลงและผลผลิตไม่ได้คุณภาพตามต้องการ (Yang และคณะ, 2014)

ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักที่ให้คาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในการดำรงชีวิตของประชากรโลก โดยเฉพาะประชากรในแถบภูมิภาคเอเชีย (Sumanon และ Traiperm, 2013; Sweeney และ McCouch, 2007) ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยโดยสามารถทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายพันล้านบาท จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบว่า กำลังการผลิตข้าวในประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับ 6 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยผลผลิตประมาณ 30 ล้านตันต่อปีตั้งแต่ปี 2547-2556 และจากข้อมูลสถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2556 พบว่า ประเทศไทยมีแนวโน้มสำหรับผลผลิตข้าวที่ลดลง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ปัจจุบันข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ แต่ผลผลิตของข้าวที่ได้ต่อไร่สำหรับการปลูกในประเทศก็ยังมีต่ำอยู่ เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลกระทบต่อ โดยมีปัจจัยประการสำคัญคือ ศัตรูข้าว ได้แก่ รา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา แมลง และไส้เดือนฝอย (Win และคณะ, 2012) ศัตรูข้าวเหล่านี้ทำให้ต้นข้าวเป็นโรค เช่น โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani*, โรคถอดฝักดาบ (bakanae disease) ที่เกิดจาก *Fusarium moniliforme*, โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spots disease) ที่เกิดจาก *Bipolaris oryzae*, โรคไหม้ในข้าว (rice blast disease) ที่เกิดจาก *Magnaporthe grisea*, โรคกาบใบเน่า (sheath rot disease) ที่เกิดจาก

Sarocladium oryzae, โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) ที่เกิดจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, โรคข้าวจุดเหลือง (rice yellow mottle disease) ที่เกิดจากไวรัส rice yellow mottle virus และโรคใบหงิกหรือโรคจู้ (tungro disease) ที่เกิดจากไวรัส rice tungro virus เป็นต้น (Rosales และ Mew, 1997; Su'udi และคณะ, 2013; Wisser และคณะ, 2005) ศัตรูข้าวที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตข้าวต่ำมาจากเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ (Chaiharn และคณะ, 2009)

โรคกาบใบแห้งเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่มีผลกระทบต่อข้าว โดยราที่เป็นสาเหตุของโรคนี้คือ *R. solani* (ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ: *Thanetophorus cucumeris* (Frank) Donk) ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญในแต่ละปีทั่วโลก (Li และคณะ, 1995) รานี้จะแพร่กระจายอยู่ในดินและถูกพัดพาไปตามแหล่งน้ำ มักมีการแพร่ระบาดในแถบเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ที่ปลูกข้าวอย่างหนาแน่น อาการของโรคกาบใบแห้งจะมีลักษณะแผลสีเขียวนเทาปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ เริ่มพบโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว ยิ่งต้นข้าวเปื่อยเสียหายอาการของโรคจะยิ่งรุนแรงขึ้น เมื่อแผลลุกลามมากขึ้นจะทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ส่งผลให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก (Lee และ Ruch, 1983; Nandakumara และคณะ, 2001)

ปัจจุบันการควบคุมราที่ก่อโรคในข้าวนิยมใช้สารเคมี เช่น อะซ็อกซิสโตรบิน (azoxystrobin), โพรพิโคนาโซล (propiconazole), ทีบูโคนาโซล (tebuconazole) และไตรฟล็อกซิสโตรบิน (trifloxystrobin) เป็นต้น (Ghazanfar และคณะ, 2009) แม้ว่าการใช้สารเคมีจะมีประสิทธิภาพและให้ผลที่รวดเร็ว แต่ก็ก่อให้เกิดผลกระทบที่ร้ายแรงตามมา อาทิ การสะสมของสารเคมีเกิดเป็นมลพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยส่งผลกระทบต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน กล่าวคือ จะทำลายแร่ธาตุในดิน และทำให้จำนวนจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่อาศัยอยู่ในดินลดลง ส่งผลให้ดินเสื่อมคุณภาพ และมลพิษเหล่านี้ยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์และสัตว์ และยังมีผลทำให้ราที่ก่อโรคทนทานต่อสารเคมีเพิ่มขึ้น รวมถึงเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตในการใช้สารเคมีด้วย (Emmert และ Handelsman, 1999)

เพื่อลดผลกระทบจากอัตราการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้นจึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ๆ วิธีหนึ่งที่น่าสนใจและได้มีการศึกษาถึงกลไกและระบบการควบคุมโรคด้วยวิธีที่หลากหลายคือ การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งหมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยหรือไม่ได้อาศัยอยู่ในพืช มายับยั้งกิจกรรมหรือประชากรของศัตรูพืช และสิ่งมีชีวิตนี้จะต้องไม่ก่อโรคหรือสร้างความเสียหายกับพืช (Pal และ Gardener, 2006) ผลดีของการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพคือ ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะเนื่องจากเป็นสิ่งที่อยู่ในธรรมชาติและมีความปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งมีชีวิตอื่นๆด้วย (Alabouvette และคณะ, 2009) การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพสามารถเลือกใช้สิ่งมีชีวิตได้หลากหลายให้เหมาะกับศัตรูพืช ได้แก่ ตัวห้ำ (predator) ตัวเบียน

(parasite) รวมถึงจุลินทรีย์ (microorganism) ที่ประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และไวรัส (Gerhardson, 2002; Handelsman และ Stabb, 1996) ในธรรมชาติทั่วไปจะมีแบคทีเรียที่มีสมบัติที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ มักนิยมเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยกลไกการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพของแบคทีเรียประกอบไปด้วย 1.) การแก่งแย่งแข่งขัน (competition) ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชเหล่านั้นไม่สามารถเจริญเติบโตและไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ 2.) การยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยตรง (antibiosis) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายเชื้อก่อโรค 3.) การเป็นปรสิต (parasitism) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัยในเชื้อก่อโรคพืช แล้วคอยดูดกินอาหารส่งผลให้เชื้อก่อโรคพืชอ่อนแอและตายในที่สุด 4.) การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (induced host resistance) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Chet และคณะ, 1990)

ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตพบได้ทุกที่ในธรรมชาติ ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยแหล่งที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์อาจเป็น ดินที่ทำการเกษตรและปนเปื้อนมลพิษ (Radtke และคณะ, 1994), ดินบริเวณรอบรากพืช (Naik และคณะ, 2008), ส่วนต่างๆของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ และผล (Aravind และคณะ, 2009; Cao และคณะ, 2004; Palumbo และคณะ, 2006), น้ำพุร้อน (Saikia และคณะ, 2011), แม่น้ำ (Vijayan และคณะ, 2006) ฯลฯ นอกจากนี้ น้ำทะเลก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการคัดแยกแบคทีเรียซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆที่มีความหลากหลายและมีประสิทธิภาพเนื่องจากสภาพแวดล้อมทางทะเลมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ไม่พบบนพื้นดิน ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชจึงอาจนำมาใช้ในการควบคุมโรคทางชีวภาพได้ (Kong และคณะ, 2010)

สำหรับงานวิจัยที่มีการศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งราโรคพืชได้นั้น มีดังนี้

Gohel และคณะ (2004) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไคตินจากน้ำทะเลบาฟนาการ์ (Bhavnagar) ในประเทศอินเดีย โดยแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้คือ *Pseudomonas* sp., *Pantoea dispersa* และ *Enterobacter amnigenus* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และโปรตีเอส (proteases) ในระดับสูง นอกจากนี้เอนไซม์เหล่านี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้อีกด้วยซึ่งราที่ถูกยับยั้งได้ ได้แก่ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich และ *Fusarium* sp.

Zhang และคณะ (2010) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลโดยแยกได้จากดินบริเวณรากของไม้น้ำชนิดหนึ่งซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Suaeda salsa* จากทะเลโปไห่ (Bohai) ในประเทศจีน โดยพบว่า *Bacillus marinus* สายพันธุ์ B-9987 สามารถผลิตสาร maribasins A และ B ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราที่ก่อโรคพืชได้มากมาย เช่น *Alternaria solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotium* sp., *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp. และ *R. solani*

นอกจากการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพแล้ว การส่งเสริมการเจริญให้แก่พืชก็เป็นอีกทางหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตและเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่พืช การส่งเสริมการเจริญให้แก่พืชนี้นิยมใช้ไรโซแบคทีเรียที่เรียกรวมๆว่าช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช หรือพีจีพีอาร์ (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) ที่คัดแยกได้จากดินหรือบริเวณรอบรากพืช เนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีแหล่งอาหารและพลังงานที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งได้จากสารที่พืชหลั่งออกมาอันประกอบไปด้วย กรดอะมิโน และน้ำตาล (Beneduzi และคณะ, 2012) สกุลของแบคทีเรียที่มีรายงานว่าจัดอยู่ในกลุ่มพีจีพีอาร์ ได้แก่ *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* และ *Thiobacillus* โดยที่แบคทีเรียเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในระบบรากพืชหรือในดินบริเวณรอบรากพืช (Bouizgarne, 2013) การเจริญเติบโตของพีจีพีอาร์เกิดจากการกระตุ้นจากสารที่หลั่งมาจากราก และพีจีพีอาร์มีกลไกที่หลากหลายในการส่งเสริมการเจริญของพืช ตัวอย่างเช่น ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน, การเพิ่มธาตุอาหารพืชด้วยการละลายฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม, และการจับธาตุเหล็ก (Tortora และคณะ, 2011a) นอกจากนี้พีจีพีอาร์สามารถผลิตฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน (auxin), จิบเบอเรลลิน (gibberellin), และไซโตไคนิน (cytokinin) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (Bouizgarne, 2013; Chamam และคณะ, 2013) พีจีพีอาร์ไม่เพียงช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชเท่านั้น แต่ยังพบรายงานว่าพีจีพีอาร์สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมีเพื่อปกป้องพืชจากโรคได้โดยกลไกที่เรียกว่า การเหนี่ยวนำความต้านทานทั้งระบบในพืช (Induced Systemic Resistance; ISR) (Yang และคณะ, 2009b) โดยเป็นการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพซึ่งเกี่ยวข้องกับการแก่งแย่งแข่งขันของพีจีพีอาร์กับเชื้อก่อโรคในพืช หรือผลผลิตจากพีจีพีอาร์ที่เป็นสารเมแทบอไลต์ต่างๆ เช่น ตัวจับธาตุเหล็ก, ไฮโดรเจนไซยาไนด์, สารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ที่หลั่งมาภายนอกเซลล์เพื่อยับยั้งโรคพืช (Liu และคณะ, 1995) ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงการยับยั้งราที่ก่อโรคพืชและส่งเสริมการเจริญของพืชโดยใช้พีจีพีอาร์ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ มีดังนี้

Gupta และคณะ (1995) ศึกษาไรโซแบคทีเรียที่เรียกว่า *Azospirillum* sp., *Azotobacter chroococcum* และ *Pseudomonas fluorescens* ที่คัดแยกได้จากรากต้นมะเขือเทศ และพบว่า *A. chroococcum* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้โดยวัดจากน้ำหนักแห้ง ความยาวรากและลำต้นของมะเขือเทศ นอกจากนี้ *P. fluorescens* ยังช่วยลดการเกิดโรคจาก *R. solani* ได้สูงที่สุดอีกด้วย

Shobha และ Kumudini (2012) ศึกษาไรโซแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปลูกข้าว, พริก และถั่ว และพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีสมบัติเป็นฟิซีฟิอาร์คือ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ JUMB1, JUMB2, JUMB3, JUMB4, JUMB5, JUMB6 และ JUMB7 โดยพบว่าสามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก (indole acetic acid, IAA), แอมโมเนีย (NH₃), ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN), ไซเดอโรฟออร์ (siderophore) ซึ่งเป็นตัวจับธาตุเหล็ก และยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้อีกด้วย

Mishra และคณะ (2006) ได้คัดแยกและศึกษา *Rhizobium leguminosarum* ที่อยู่ภายในรากของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ RRE6 และ ANU843 และพบว่าสายพันธุ์ RRE6 มีการกระตุ้นให้ต้นข้าวมีการผลิตกรดฟีนอลิกสูงที่ถือเป็นสารตัวกลางที่เหนี่ยวนำความต้านทานแบบทั้งระบบในพืชและเป็นการปกป้องพืชจากการติดเชื้อโรคาบไอบาซึ่งมาจาก *R. solani* นอกจากนี้ *R. leguminosarum* ทั้งสองสายพันธุ์ยังช่วยส่งเสริมการเจริญและเพิ่มผลผลิตของต้นข้าวอีกด้วย

Spence และคณะ (2014) ศึกษาไรโซแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปลูกข้าวและพบว่า *Pseudomonas* สายพันธุ์ EA105 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอปเพรสซอเรีย (appressoria) ของ *Magnaporthe oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในข้าวผ่านการส่งสัญญาณโดยกรดจาสโมนิก (jasmonic acid) และเอธิลีน (ethylene) อีกด้วย

Azospirillum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยอยู่ร่วมกับพืชอย่างอิสระ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้อย่างหลากหลาย จึงทำให้มีการปรับตัวได้เป็นอย่างดีในสภาพแวดล้อมที่ต้องแข่งขัน เช่น บริเวณรอบรากพืชที่มีสิ่งมีชีวิตอยู่ร่วมกันมากมาย (Lian และคณะ, 2011) สมบัติที่สำคัญของ *Azospirillum* ที่ทำให้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของฟิซีฟิอาร์คือ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน, การผลิตฮอร์โมนพืช ซึ่งได้แก่ ออกซิน, จิบเบอเรลลิน, และไซโตไคนิน ซึ่งส่งผลถึงการปรับปรุงโครงสร้างของรากพืชให้แข็งแรงดีขึ้น รวมถึงส่งเสริมอัตราการดูดน้ำและแร่ธาตุของราก และยังสามารถในการละลายธาตุอาหารบางชนิดให้กับพืชด้วย (Okon และ Itzigsohn, 1995) *Azospirillum* ยังสามารถสร้างไซเดอโรฟออร์ที่เป็นตัวจับเหล็กเพื่อช่วยในการดึงธาตุเหล็กให้กับพืชในภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลนธาตุเหล็กอีกด้วย (Tortora และคณะ, 2011a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Azospirillum* สามารถเหนี่ยวนำความ

ต้านทานโรคแบบทั้งระบบในพืชได้ โดยพบว่าบางสายพันธุ์มีการสร้างกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ที่เป็นสารที่หลั่งมาและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคที่ตามมาได้ (Tortora และคณะ, 2011a)

Yasuda และคณะ (2009) ศึกษา *Azospirillum* สายพันธุ์ B510 และพบว่ามีการเหนี่ยวนำให้ต้นข้าวต้านทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจาก *M. oryzae* และ *X. oryzae* ได้ โดยมีการสะสมกรดซาลิไซลิกและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดโรค

Tortora และคณะ (2011b) ใช้ *Azospirillum brasilense* สายพันธุ์ REC3 ในการลดอาการของโรคแอนแทรกคโนส (anthracnose) ที่เกิดจาก *Colletotrichum acutatum* สายพันธุ์ M11 ในสตรอเบอรี่ การวิเคราะห์ในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุลพบว่า มีการสะสมของกรดซาลิไซลิก และมีการเหนี่ยวนำขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดโรค นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์กับระดับของสารฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากกลไกเหล่านี้เป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำความต้านทานแบบทั้งระบบในพืช (ISR) ที่กระตุ้นโดย *A. brasilense* สายพันธุ์ REC3

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพและการส่งเสริมการเจริญของพืชอย่างบูรณาการโดยใช้แบคทีเรียหลากหลายชนิดร่วมกันซึ่งอาจเป็นกลุ่มของพีจีพีอาร์เพื่อประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ดังตัวอย่างการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคในต้นแตงกวาซึ่งประกอบด้วย *Colletotrichum orbiculare* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกคโนส, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดเหลี่ยมและ *Erwinia tracheiphila* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของพืช จำพวกแตง โดยใช้พีจีพีอาร์ 3 สายพันธุ์ร่วมกันในการควบคุมโรค ได้แก่ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ INR7, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ GB03 และ *Curtobacterium flaccumfaciens* สายพันธุ์ ME1 โดยการคลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนนำไปปลูกในภาวะเรือนกระจก (Raupach และ Kloepper, 1998) และการใช้กลุ่มของแบคทีเรีย (consortia) ที่ประกอบด้วย *P. fluorescens* สายพันธุ์ PF1 + TDK1 + TV-5 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ TH10 ในการกำจัดโรคข้าวเน่าที่เกิดจาก *S. oryzae* (Sawada) (Sundaramoorthy และคณะ, 2013) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) และศึกษาความสามารถของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยวิเคราะห์จากความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช, การเจริญในสภาพที่ปราศจากไนโตรเจน, การผลิตสารที่เป็นตัวจับธาตุเหล็ก และการละลายธาตุอาหารในแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากนั้นศึกษาการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพในต้นข้าวของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล และ

ความสามารถของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลเมื่อเลี้ยงร่วมกันในการป้องกันโรคในต้นข้าวที่เกิดจากรา เพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนา และใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญและควบคุมโรคข้าวแบบบูรณาการได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล
2. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการส่งเสริมการเจริญของพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)
3. เพื่อศึกษาการส่งเสริมการเจริญในต้นข้าวของ *Azospirillum* spp.
4. เพื่อศึกษาความสามารถของ *Azospirillum* spp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลเมื่อเลี้ยงร่วมกันในการป้องกันโรคข้าวที่เกิดจากรา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดกรองและทราบลักษณะสมบัติของ *Azospirillum* spp. ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวและการใช้ *Azospirillum* spp. ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการป้องกันการเกิดโรคในข้าวที่เกิดจากรา

บทที่ 2

ปรีทรรคนัวรรณกรรม

2.1 ข้อมูลทั่วไปของข้าว

ข้าวถือเป็นแหล่งของวัฒนธรรม อาหาร และเศรษฐกิจของประชากรมากถึงพันล้านคน โดยเฉพาะประชากรในแถบภูมิภาคเอเชีย ข้าวจัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกับหญ้า โดยถูกจัดว่าเป็นหญ้าที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก และมีความหลากหลายทางชีวภาพ สามารถปลูกขึ้นได้ง่าย มีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศในโลก ไม่ว่าจะเป็นถิ่นแห้งแล้งแบบทะเลทราย พื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึง หรือแม้กระทั่งบนเทือกเขาที่หนาวเย็น (Gnanamanickam, 2009)

ข้าวจัดเป็นธัญพืชที่อยู่ในตระกูลของหญ้า (Family: Poaceae) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* (Sumanon และ Traiperm, 2013) สายพันธุ์ของพืชตระกูลข้าวมีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ข้าวที่รู้จัก และนำมาปลูกแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *O. sativa* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย และ *O. glaberrima* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปแอฟริกา ข้าวเหล่านี้มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและเขตอบอุ่นในแถบเอเชียใต้และแถบตะวันออกเฉียงใต้ของแอฟริกา (Gnanamanickam, 2009) ปัจจุบันข้าวที่นิยมปลูก และซื้อขายกันในตลาดโลกเป็นข้าวที่เพาะปลูกจากทวีปเอเชีย แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของข้าว และพื้นที่ปลูก (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2554) ได้ดังนี้

1. ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่นและหนาว เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา มีลักษณะของเมล็ดป้อม กลมรี (รูปที่ 1, ซ้าย) ลำต้นเตี้ย
2. ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า แหล่งที่ค้นพบครั้งแรกคือประเทศอินเดีย มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี (รูปที่ 1, กลาง) ลำต้นสูง เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา
3. ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวที่ปลูกในอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น มีลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่ (รูปที่ 1, ขวา) สันนิษฐานว่า เป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา แต่ไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากให้ผลผลิตน้อย



รูปที่ 2.1: ลักษณะของเมล็ดข้าวที่นิยมปลูกในทวีปเอเชีย

(ที่มา: http://www.plantsciences.ucdavis.edu/plantsciences_faculty/beckles/main/Rice.html)

2.2 พื้นที่เพาะปลูกและปริมาณผลผลิตข้าวในประเทศไทย

ข้าวมีการเพาะปลูกอยู่ทั่วประเทศไทย ข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการชื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า (2556) รายงานว่า พื้นที่ในการเพาะปลูกข้าวในปี 2549 มีประมาณ 67.6 ล้านไร่ แบ่งเป็นพื้นที่นาปี (ข้าวที่เพาะปลูกระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม ถึง 31 ตุลาคม) ร้อยละ 85 และพื้นที่นาปรัง (ข้าวที่เพาะปลูกระหว่างวันที่ 1 พฤศจิกายน ถึง 30 เมษายน) ร้อยละ 15 มีผลผลิตข้าวเปลือกรวม 26.9 ล้านตัน ในจำนวนนี้เป็นผลผลิตนาปีร้อยละ 77 และผลผลิตนาปรังร้อยละ 23 โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีพื้นที่ในการปลูกข้าวมากที่สุด หรือคิดเป็นครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปลูกข้าวในแต่ละภาครวมกัน ถึงแม้ภาคกลางจะมีพื้นที่ปลูกข้าวเพียงร้อยละ 23 แต่มีผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 31 เพราะมีการชลประทานที่ดี มีการปลูกข้าวพันธุ์ไม่ไวแสง ซึ่งเป็นข้าวที่ปลูกได้ทุกฤดูกาล รวมถึงมีพื้นที่ทำนาปรังมากกว่าภาคอื่นๆ ที่รองลงมาได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้

2.3 ความสำคัญของข้าวต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศและของโลก เนื่องจากความต้องการบริโภคข้าวของประชากรโลกสูงขึ้นในทุกๆปี จากข้อมูลของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์รายงานว่าเป็นปี 2550/51 - 2554/55 มีปริมาณความต้องการบริโภคข้าวเพิ่มขึ้นจาก 427.48 ล้านตันข้าวสาร เป็น 457.63 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.57 และในปี 2554/55 มีความต้องการบริโภคข้าว 457.63 ล้านตันข้าวสาร โดยเพิ่มขึ้นจาก 445.82 ล้านตันข้าวสารของปี 2553/54 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 2.65 (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) สำหรับข้อมูลของการส่งออกข้าวไปยังต่างประเทศ ในปี 2554/55 มีการส่งออกข้าวโลกที่ปริมาณ 38.21 ล้านตันข้าวสาร โดยเพิ่มขึ้นจาก 36.21 ล้านตันข้าวสารในปี 2553/54 คิดเป็นร้อยละ 5.52 โดยประเทศไทย

เป็นหนึ่งในประเทศที่มีการส่งออกข้าวที่ลดลง (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบว่า กำลังการผลิตข้าวในประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับ 6 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยผลผลิตประมาณ 30 ล้านตันต่อปีตั้งแต่ปี 2547-2556 และจากข้อมูลสถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2556 พบว่า ประเทศไทยมีแนวโน้มสำหรับผลผลิตข้าวที่ลดลง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ปัจจัยหนึ่งเป็นผลมาจากพื้นที่ในการเพาะปลูกข้าวมีจำนวนจำกัดอันเนื่องมาจากจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลถึงการเติบโตของชุมชนเมืองและโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้พื้นที่ที่มีอยู่อย่างจำกัดในการปลูกข้าวให้มีประสิทธิภาพมากที่สุดเพื่อให้ได้ผลผลิตจำนวนที่เพียงพอกับการบริโภคและเหลือเพื่อการส่งออกจำหน่าย ส่งผลให้มีรายได้เข้าประเทศมากขึ้น และอีกปัจจัยหนึ่งเป็นผลมาจากโรคที่เกิดกับข้าว

2.4 โรคสำคัญที่เกิดในต้นข้าว

ปัญหาการผลิตข้าวในภูมิภาคเอเชียที่เป็นปัจจัยจำกัดการผลิตที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ โรคข้าว ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่สามารถก่อให้เกิดโรคในข้าวมีหลากหลายชนิดได้แก่ รา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา แมลง และไส้เดือนฝอย และพบว่าศัตรูข้าวที่เป็นสาเหตุหลักมาจากรา (Chaiharn และคณะ, 2009) ราวางชนิดสามารถก่อโรคในต้นข้าวได้มากกว่าหนึ่งโรคโดยขึ้นอยู่กับระบบของต้นข้าวที่เกิดการติดเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว และโรคหนึ่งโรคยังสามารถเกิดจากราได้มากกว่าหนึ่งชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เช่น *R. solani* ที่ก่อให้เกิดโรคกล้าแห้งตายและโรคกาบใบแห้งได้ หรือโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากราหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *P. dissotocum* และ *P. spinosum* ดังนั้นหากเกษตรกรสามารถควบคุมราก่อโรคในข้าวได้อย่างถูกวิธี จะส่งผลให้การผลผลิตข้าวมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และทำให้มีปริมาณผลผลิตมากพอที่ส่งออกจำหน่ายไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.1: โรคของข้าวที่เกิดจากราสายพันธุ์ต่างๆ

| โรคของข้าว | ราที่ก่อโรคในต้นข้าว | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|------------------------------------|
| โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle disease) | <i>Curvularia lunata</i> <i>Cercospora oryzae</i> <i>Helminthosporium oryzae</i> <i>Fusarium semitectum</i> <i>Trichoconis padwickii</i> <i>Sarocladium oryzae</i> | (Prathuangwong และคณะ , 2011) |
| โรคดินปืนในเมล็ดข้าว (kernel smut) | <i>Neovossia horrida</i> | (Agarwal และคณะ, 1989) |
| โรคไหม้ (blast disease) | <i>Pyricularia grisea</i> (teleomorph: <i>Magnaporthe grisea</i>) | (Howard และ Valent, 1996) |
| โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown spot disease) | <i>Cercospora janseana</i> | (Agarwal และคณะ, 1989) |
| โรคใบวงสีน้ำตาล (leaf scald disease) | <i>Rhynchosporium oryzae</i> | (Verona, 1980) |
| โรครากเน่า (root rots) | <i>Fusarium</i> sp. <i>Pythium</i> sp. <i>P. dissotocum</i> <i>P. spinosum</i> | (Ho และคณะ, 2012) |
| โรคลำต้นเน่า (stem rot) | <i>Sclerotium oryzae</i> | (Cintas และ Webster, 2001) |
| โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot disease) | <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (anamorph: <i>Bipolaris oryzae</i>) | (De Vleeschauwer และ คณะ, 2010) |
| โรคต้นกล้าแห้งตาย (seedling blight) | <i>Cochliobolus miyabeanus</i> <i>Curvularia</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> | (Manidipa และคณะ, 2013) |
| โรคกาบใบเน่า (sheath rot) | <i>Sarocladium oryzae</i> | (Agarwal และคณะ, 1989) |
| โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) | <i>Rhizoctonia solani</i> (teleomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk) | (Lee และ Ruch, 1983) |
| โรคถอดฝักดาบ (bakanae disease) | <i>Fusarium fujikuroi</i> Nirenberg (anamorph: <i>Fusarium moniliforme</i> J. Sheld) | (Agarwal และคณะ, 1989) |

2.5 *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคในพืช

R. solani เป็นสปีชีส์ที่รู้จักอย่างกว้างขวางในสกุลของรา *Rhizoctonia* โดย Julius Kühn ได้ค้นพบและอธิบายลักษณะที่พบในมันฝรั่งเมื่อปี ค.ศ. 1858 (Mari, 2009) *R. solani* เป็นราในไฟลัม Basidiomycota ที่ไม่สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ แต่สร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งเป็นสปอร์จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในธรรมชาติ *R. solani* จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph phase) และดำรงชีวิตอยู่ในรูปของเส้นใยและ/หรือสเคลอโรเทีย (sclerotia) ในช่วงที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph phase) ของ *R. solani* มีชื่อเรียกว่า *Thanatephorus cucumeris* (Sneh และคณะ, 1996) การจัดจำแนกรานในสกุล *Rhizoctonia* สามารถจัดจำแนกได้ (Gonzalez และคณะ, 2011) ดังนี้

Kingdom: Fungi

Subkingdom: Dikarya

Phylum: Basidiomycota

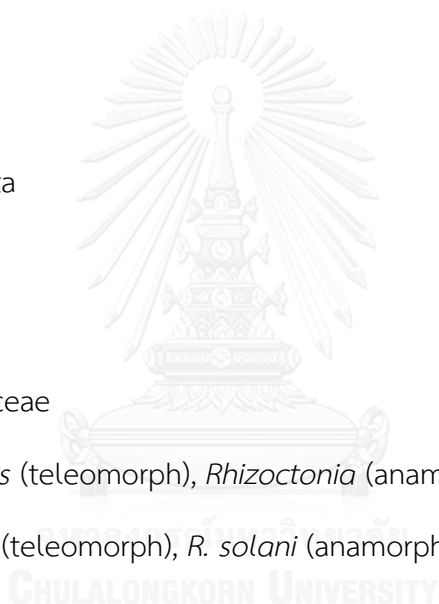
Class: Agaricomycetes

Order: Cantharellales

Family: Ceratobasidiaceae

Genus: *Thanatephorus* (teleomorph), *Rhizoctonia* (anamorph)

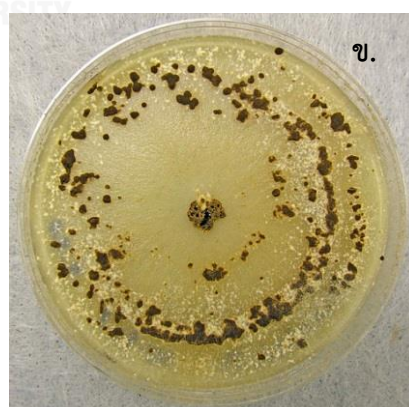
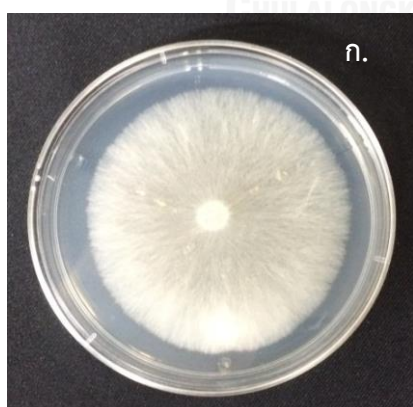
Species: *T. cucumeris* (teleomorph), *R. solani* (anamorph)



R. solani ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีน้ำตาล แตกแขนงออกเป็นมุมฉาก และมีผนังกัน (septum) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ลักษณะสำคัญที่พบในเส้นใยของรานี้ คือ เส้นใยที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจะมีสีขาวเมื่อมีอายุน้อย ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ก.) และเมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะมีสีน้ำตาล ไม่มีการสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และเส้นใยที่มีผนังกันจะประกอบด้วยหลายนิวเคลียสภายในหนึ่งเซลล์ (multinucleate cells) โดยปกติ *R. solani* สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว บางโฮสต์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ได้รัศมีถึง 90 มิลลิเมตรภายในเวลา 3 วัน เมื่ออายุมากหรือเมื่ออาหารเริ่มขาดแคลนจะมีการสร้างเซลล์กลมขนาดเล็กขึ้นที่บริเวณเส้นใย ซึ่งต่อมาเซลล์เหล่านี้จะมีผนังเซลล์หนากว่าเส้นใยปกติ และพัฒนาเป็นก้อนกลมสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มที่เรียกว่า สเคลอโรเทีย (sclerotia) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ข.) (Ogoshi, 1987)



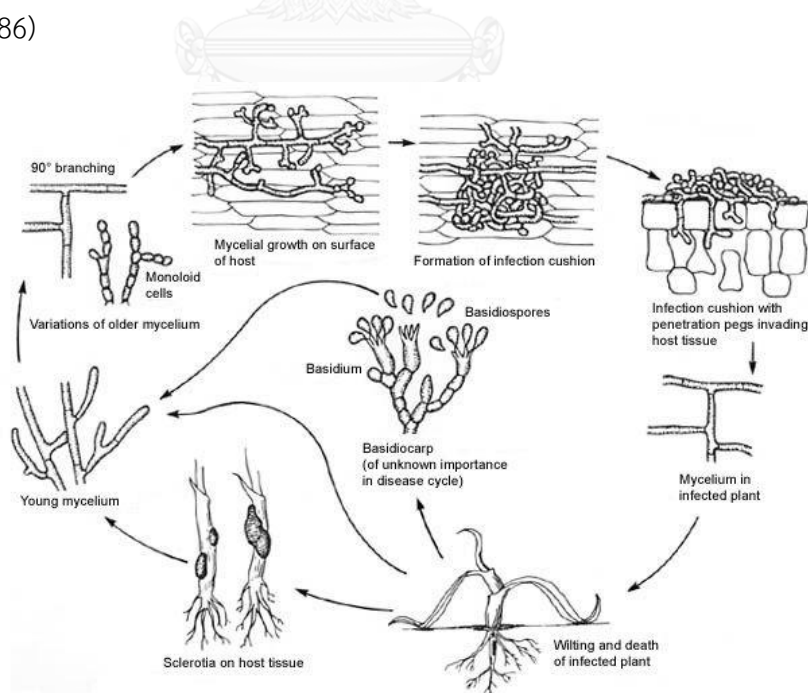
รูปที่ 2.2: ลักษณะเส้นใยของ *R. solani* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(ที่มา: <http://agridr.in/tnauEAgri/eagri50/PATH272/lecture01/005.html>)



รูปที่ 2.3: (ก) การเจริญและลักษณะเส้นใยของ *R. solani* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน
(ข) การเจริญและลักษณะของสเคลอโรเทียของ *R. solani* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน
(ที่มา: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2006/rsolani/>)

R. solani สามารถมีชีวิตรอดได้นานเป็นเวลาหลายปีโดยอาศัยโครงสร้างที่เรียกว่า สเคลอโรเทีย ซึ่งถูกพบอยู่ในดินหรืออยู่ในซากพืช *R. solani* ที่ก่อโรคในข้าวจะมีการพัฒนาสเคลอโรเทียให้มีผิวชั้นนอกที่หนาช่วยให้สามารถลอยและอยู่รอดได้ในน้ำ บางครั้งพบว่า *R. solani* สามารถมีชีวิตรอดในรูปของเส้นใยได้เช่นกันโดยการยึดเกาะบนอินทรีย์สารในดินและดำรงชีวิตอย่างอิสระโดยการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ (Ogoshi, 1987)

การแพร่กระจายของ *R. solani* ที่กระจายอยู่ในดินหรือที่อยู่ภายในพืชในรูปของเส้นใยหรือสเคลอโรเทียจะถูกพัดพาไปโดยแรงลมหรือกระแสน้ำ และเป็นหัวเชื้อเริ่มแรกในการติดโรคสเคลอโรเทียในนาข้าวมีแนวโน้มในการสะสมรอบๆ ต้นข้าวที่บริเวณรอยต่อของระดับน้ำกับพืชเมื่อรากถูกกระตุ้นโดยสารเคมีที่ปล่อยออกมาจากเซลล์พืชและ/หรือโดยสารที่ได้จากการย่อยสลายซากพืช สารเหล่านี้กระตุ้นให้สายใยรามาสัมผัสกับพืชและยึดเกาะที่บริเวณผิวด้านนอกของพืช จากนั้นรากจะเจริญที่พื้นผิวด้านนอกของพืช และทำให้พืชติดโรคโดยโครงสร้างพิเศษ เช่น แอปเพรสอร์เรียม (appressorium) ที่สามารถเจาะเข้าไปยังเซลล์พืชทำให้มีการปล่อยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการพัฒนาของราก รากจะปล่อยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เซลลูโลส คิวติน และเพกติน เพื่อทำลายองค์ประกอบผนังเซลล์ของพืช เมื่อรากฆ่าเซลล์พืชแล้ว เส้นใยรากก็ยังคงเจริญและยึดเกาะกับเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วและสร้างสเคลอโรเทีย หัวเชื้อใหม่จะถูกผลิตในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโฮสต์และวงชีวิตจะเกิดขึ้นซ้ำๆเมื่อมีโฮสต์ใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Hofman และ Jongbloed, 1988; Matsuura, 1986)



รูปที่ 2.4: วงชีวิตของ *R. solani* ที่ก่อโรคในพืช

(ที่มา: www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoctonia.aspx)

2.6 โรคกาบใบแห้ง (Rice sheath blight)

โรคกาบใบแห้งเป็นโรคหนึ่งซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจมากที่สุดต่อข้าว ราที่เป็นสาเหตุของโรคนี้คือ *R. solani* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคได้ทั้งในข้าวและถั่วเหลือง โดยในถั่วเหลืองจะก่อให้เกิดโรครากเน่า (root rot) และโรคใบติด (web blight) นอกจากนี้ *R. solani* ยังสามารถก่อโรคในข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อย เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมด้วย (Hollier และ Rush, 2012)

ปัจจัยที่ช่วยในการแพร่กระจายและพัฒนาของราที่ก่อโรคกาบใบแห้ง คือ โรคนี้มักแพร่กระจายได้ดีบริเวณที่ต้นข้าวแตกกอและเจริญกันอย่างหนาแน่น เมื่อใส่ปุ๋ยมากเกินไปทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างแออัดส่งผลให้เกิดความเสียหายจากโรคนี้ได้ การปลูกถั่วและข้าวแบบหมุนเวียนก็เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อในดินด้วยเช่นกัน นอกจากนี้สภาพภูมิอากาศแบบอบอุ่น และมีความชื้นสูงก็เป็นอีกปัจจัยที่ช่วยให้ราสามารถเจริญได้ดี (Hollier และ Rush, 2012)

2.6.1 อาการของโรคกาบใบแห้ง

อาการของโรคกาบใบแห้งจะมีจุดกลมขนาดใหญ่เกิดขึ้นตามกาบใบและแผ่นใบ (รูปที่ 2.5) การติดเชื้อมักจะเกิดในระยะการเจริญที่พืชมีการยืดตัวที่บริเวณปลายของข้อที่แตกหน่อ (รูปที่ 2.6) โดยแผลมีสีขาวปนเทาหรือตรงกลางเป็นสีเขียวและมีขอบสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดง มีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1-3 เซนติเมตร ที่บริเวณลำต้นที่ติดเชืهربนระดับน้ำในนา เมื่อเส้นใยของราเจริญไปตามกาบใบทำให้เกิดแผลใหม่ขึ้นเมื่อมีการติดเชืهربนบริเวณกาบใบ โรคสามารถแพร่กระจายไปยังแผ่นใบทำให้กาบใบและแผ่นใบกลายเป็นสีเหลือง เหี่ยวแห้ง และเมื่อพืชออกดอกโรคจะแพร่ไปยังใบธงที่มีความไวต่อโรค แล้วลุกลามไปยังกาบหุ้มรวงข้าว ส่งผลให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก (Hollier และ Rush, 2012; Lee และ Ruch, 1983)



รูปที่ 2.5: ลักษณะแผลบริเวณแผ่นใบ
ที่มา: (Hollier และ Rush, 2012)



รูปที่ 2.6: ผลตามกาบใบระยะเริ่มแรกของต้นข้าวระหว่างการเจริญของข้าวที่มีการยืดบริเวณข้อ
ที่มา: (Hollier และ Rush, 2012)

2.6.2 การแพร่กระจายของ *R. solani*

การแพร่กระจายของราในพื้นที่เพาะปลูกเกิดโดยการเจริญของราจากหน่อหนึ่งไปยังอีกหน่อหนึ่งในพืชที่มีการติดเชื้อโดยตรง หรือกระจายไปตามแหล่งน้ำ ส่งผลให้พืชต้นอื่นๆ ที่อยู่ใกล้กับแหล่งน้ำติดโรค นอกจากนี้เราสามารถเจริญข้ามไปยังส่วนของพืชที่มีการสัมผัสกัน เช่น การสัมผัสกันระหว่างใบซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในพืชที่อยู่ใกล้กัน รูปแบบการกระจายของพืชที่ติดเชื้อมักจะพบลักษณะเป็นวงกลม เนื่องจากราไม่ได้ผลิตสปอร์และต้องเจริญในต้นพืชแล้วแพร่ไปยังพืชต้นอื่นๆ และความเสียหายมักจะพบมากที่สุดบริเวณที่มีลมพัดหรือบริเวณที่มีการสะสมของซากพืช ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (ก. และ ข.) ที่เป็นพื้นที่นาข้าวที่ต้นข้าวแตกกอกันอย่างเบียดเสียดโดยเกิดการติดเชื้อในธรรมชาติ ซึ่งการติดเชื้อในลักษณะนี้ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงจำนวนมาก (Hollier และ Rush, 2012)

โรคกาบใบแห้งสามารถเกิดในหญ้าและวัชพืชอื่นๆที่ไม่ใช่ข้าวได้ โดยก่อให้เกิดอาการที่คล้ายกัน สเคลอโรเทียที่มีชีวิตรอดอยู่ในพืชจะทำให้เกิดแผลบนผิวของพืช ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ความรุนแรงของโรคจะลดลงโดยการจัดการแบบบูรณาการ คือ หลังการเก็บเกี่ยวและเริ่มฤดูการเพาะปลูกใหม่ ควรพลิกไถหน้าดินเพื่อลดจำนวนเชื้อและสเคลอโรเทียที่อยู่ในดิน กำจัดวัชพืชตามคันทนาและแหล่งน้ำ เพื่อลดการฟักตัวและแหล่งสะสมของราที่เป็นสาเหตุของโรค ปลูกพืชโดยเว้นระยะห่างเพื่อไม่ให้แออัดและไม่ใส่ปุ๋ยมากเกินไป (Hollier และ Rush, 2012)



รูปที่ 2.7: (ก) การติดเชื้อในธรรมชาติในบริเวณที่ต้นข้าวแตกกอกันอย่างเบียดเสียด
 (ข) การลดลงของผลผลิตข้าวจำนวนมากเนื่องจากโรคกาบใบแห้ง
 (ที่มา: Lee และ Ruch, 1983)



รูปที่ 2.8: สเคลอโรเทียของ *R. solani* ที่ยึดเกาะบนต้นข้าว
 (ที่มา: Lee และ Ruch, 1983)

2.6.3 การป้องกันและกำจัดราที่ก่อโรคกาบใบแห้งในข้าว

การควบคุมโรคกาบใบแห้งสามารถปฏิบัติตามข้อแนะนำดังต่อไปนี้ คือ ใช้พันธุ์พืชที่มีสมบัติต้านทานและเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูก ในการปลูกพืชควรเว้นระยะห่างพอประมาณให้ได้ 15-20 ต้นต่อตารางฟุต กำจัดวัชพืชตามคันนาและแหล่งน้ำ เพื่อลดโอกาสการฟักตัวและเป็นแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุโรค ปลูกพืชในระยะเวลาที่เหมาะสม หลีกเลี่ยงการปลูกพืชจำนวนมาก มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่ควรใส่มากเกินไป โดยปริมาณที่เหมาะสมคือ 13.6 กิโลกรัมหรือน้อยกว่านั้นในช่วงที่มีการยืดของข้อ หมั่นคอยสังเกตการเกิดโรคในช่วงที่มีการยืดของข้อ และใช้สารเคมีป้องกันกำจัด

เชื้อรา ซึ่งการเลือกใช้สารกำจัดราขึ้นกับความรุนแรงของการติดเชื้อ ราคาของสารกำจัดรา และการเกิดโรคแทรกซ้อนอื่นหรือไม่ เช่น การเกิดโรคใหม่ เป็นต้น (Wrather และ Sweets, 2009)

การใช้สารกำจัดราเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ตัวอย่างสารกำจัดรา ได้แก่ วาลิดามายซิน, เบโนมิล, โพรพิโคนาโซล, ทีบูโคนาโซล, คาร์เบนดาซิม, เพนไซคูรอน และฟุโทลานิล โดยใช้อัตราตามคำแนะนำของนักวิชาการ โดยพ่นสารเคมีนี้บริเวณที่เริ่มพบโรคระบาด ไม่จำเป็นต้องพ่นทั้งแปลงนา เพราะโรคกาบใบแห้งจะเกิดเป็นหย่อมๆ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตควรไถกลบหน้าดิน เพื่อทำลายสเคลอโรเทียของรา (Kumar และคณะ, 2013)

2.7 การควบคุมโรคทางชีวภาพ (biological control)

เพื่อให้ได้ผลผลิตจากพืชที่คงคุณภาพและมีปริมาณเพียงพอในการอุปโภคและบริโภคของทั้งมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมโรคพืช ซึ่งแนวทางต่างๆที่ใช้ในการป้องกัน และกำจัดโรคพืชนั้น เกษตรกรส่วนใหญ่มักจะพึ่งพาสารกำจัดศัตรูพืชเนื่องจากมีประสิทธิภาพดี เห็นผลรวดเร็ว และใช้ได้สะดวก อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีมากเกินไปและผิดประเภท ก็ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย นอกจากนี้ยังทำให้ศัตรูพืชมีความทนทานต่อสารเคมีเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันมีการออกกฎระเบียบที่เข้มงวดในการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและมีแรงกดดันทางการเมืองเพื่อลดการใช้สารเคมีที่อันตราย นอกจากนี้ปัญหาสำคัญที่พบในการแพร่ระบาดของโรคพืชในธรรมชาติ คือไม่สามารถกำจัดได้ด้วยสารเคมีเดิม (Singh และคณะ, 2009) ดังนั้นนักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาทางเลือกใหม่ๆในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ซึ่งวิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่งคือ ใช้การควบคุมทางชีวภาพ หรือที่เรียกว่า biological control ซึ่งหมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยหรือไม่ได้อาศัยอยู่ในพืช มายับยั้งกิจกรรมหรือประชากรของศัตรูพืช และสิ่งมีชีวิตนี้จะต้องไม่ก่อโรคหรือสร้างความเสียหายกับพืช (Pal และ Gardener, 2006)

2.7.1 กลไกการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ

ในธรรมชาติจะมีแบคทีเรียที่มีสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ มักนิยมเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ 4 ลักษณะ ดังนี้

2.7.1.1 การแก่งแย่งแข่งขัน (competition) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีกลไกในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืชเพื่อแย่งชิงปัจจัยในการดำรงชีวิต เช่น ที่อยู่อาศัย แหล่งอาหารพวกคาร์บอน และไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต ทำให้เชื้อก่อโรคพืชเหล่านั้นไม่สามารถเจริญเติบโต และไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตโดยไม่มีโรคและให้ผลผลิตสูง การแข่งขันที่พบมากคือ การแย่งชิงธาตุเหล็กซึ่งเป็นสารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดในดินหรือสภาพแวดล้อม มาใช้ประโยชน์ในการเติบโต เช่น *Pseudomonas aureofaciens* AR1 จะผลิตสารไฮเดอโรฟอรัสช่วยในการจับธาตุเหล็กในธรรมชาติได้ดีกว่า *Alternaria* sp., *F. oxysporum*, *Sclerotium* sp. และ *P. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในข้าวและช่วยในปกป้องต้นข้าวจากรากก่อโรคเหล่านี้ได้ (Chaiharn และคณะ, 2009) และ *B. subtilis* BN1 สามารถผลิตไฮเดอโรฟอรัส ซึ่งแย่งจับธาตุเหล็กได้ดีกว่า และส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของรา *Macrophomina phaseolina* ที่ก่อโรครากเน่าในต้นสนได้ (Singh และคณะ, 2008) นอกจากนี้ในบริเวณรอบรากพืชซึ่งมีการหลั่งสารอาหารต่างๆออกมานั้น แบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบรากพืชจะมีการแก่งแย่งสารอาหารต่างๆได้แก่น้ำตาล กรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าหาสารอาหารเหล่านี้ได้เร็วกว่าก็จะมีชีวิตรอด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มที่มีลักษณะดังกล่าว ได้แก่ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) เช่น *Azospirillum* sp. (Compant และคณะ, 2005)

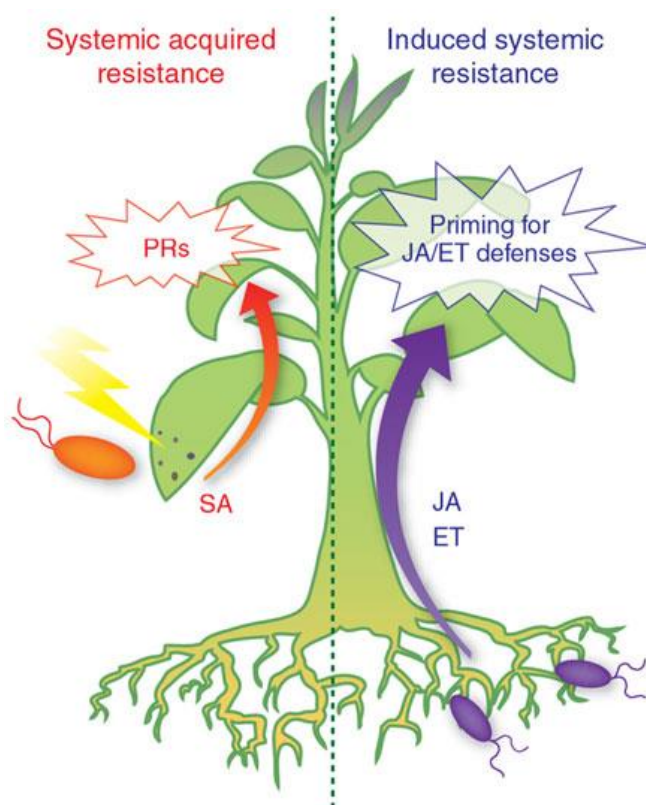
2.7.1.2 การยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยตรง (antibiosis) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารพิษ เอนไซม์ หรือสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายเชื้อก่อโรค และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่มีการศึกษาของเชื้อปฏิปักษ์ ตัวอย่างเช่น *P. fluorescens* CHA0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าดำในยาสูบซึ่งเกิดจาก *Thielaviopsis basicola* โดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์ CHA0 มีการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา ได้แก่ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ เป็นต้น (Voisard และคณะ, 1989) *B. amyloliquefaciens* RC-2 สามารถผลิต iturin A2 ซึ่งมีโครงสร้างเป็นไซคลิกเพปไทด์ (cyclic peptide) โดยพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมามากมายทั้งแบคทีเรียและรา ได้แก่ *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Yoshida และคณะ, 2001) และมีการผลิตเอนไซม์ไลติก ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้ ได้แก่ โคติเนส โปรตีเอส และ β -1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Compant และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคอีก

หลายชนิด อาทิ amphisin, butyrolactones, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), oomycin A, phenazine, pantocin A และ B, pyoluteorin, pyrrolnitrin, tensin, tropolone, ligomycin A, kanosamine, viscosinamide, xanthobaccin, และ zwittermicin A เป็นต้น (Compant และคณะ, 2005; Raaijmakers และคณะ, 2002)

2.7.1.3 การเป็นปรสิต (parasitism) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัยในเชื้อก่อโรคพืช แล้วคอยดูดกินอาหารส่งผลให้เชื้อก่อโรคพืชอ่อนแอและตายในที่สุด การใช้กลไกนี้เพื่อควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวิธีการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยตรง เช่น *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ซึ่งก่อให้เกิดโรครากปมซึ่งเป็นปัญหาที่พบในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (Tian และคณะ, 2007) นอกจากนี้ *Trichoderma* ก็เป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่นิยมนำใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยสามารถยับยั้ง *R. solani* และ *Sclerotium rolfsii* ที่เป็นราก่อโรคในพืช โดยกลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นพบว่า *T. harzianum* และ *T. hamatum* เป็นปรสิตของราก่อโรคพืช เนื่องจากจะเข้าจับกับราก่อโรคพืชด้วยการม้วนเส้นใยไปรอบราก่อโรคพืช แล้วสร้างโครงสร้างคล้ายตะขอหรือแอปเพรสซอร์เข้ามาเจริญในเส้นใยของราก่อโรคและมีการหลั่งเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของราก่อโรคร่วมด้วย ส่งผลให้ราก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญและแพร่กระจายได้ (Elad และคณะ, 1983)

2.7.1.4 การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (induction of host defense) โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค ซึ่งเป็นกลไกที่มีความน่าสนใจและศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยประกอบด้วย 2 กลไก ดังแสดงในรูปที่ 2.9 คือ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชจากเชื้อที่ก่อโรคโดยตรงที่เรียกว่า systemic acquired resistance (SAR) คือ เมื่อเชื้อก่อโรคเข้ารุกรานพืชจะทำให้เกิดการกระตุ้น โดยพืชจะผลิตกรดซาลิซิลิก (salicylic acid, SA) ที่ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่จะนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรค (pathogenesis-related (PR) protein) โปรตีนและเอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่ ไคตินเนส โปรตีเอส และกลูคาเนส ซึ่งจะทำลายเชื้อก่อโรคโดยตรง และโปรตีน PR ที่ส่งผลให้พืชต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการรุกรานจากเชื้อก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามการส่งสัญญาณของกรดซาลิซิลิกสามารถเกิดได้โดยไม่ขึ้นกับเชื้อก่อโรคได้เช่นกัน และอีกกลไกหนึ่งคือ เกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งระบบจากเชื้อที่ไม่ได้ก่อโรคในพืช ที่เรียกว่า induced systemic resistance (ISR) โดยมีการสร้างสารตัวกลางเป็นกรดจาสโมนิก (jasmonic acid, JA) และเอทิลีน (Pal และ Gardener, 2006) ตัวอย่างเช่น เมื่อเลี้ยง *P. fluorescens* CHAO ที่บริเวณรากของต้นยาสูบ และให้มีการติดเชื้อไวรัส Tobacco Necrosis Virus (TNV) บริเวณใบ พบว่า ส่งผลให้มีปริมาณของกรดซาลิซิลิกเพิ่มขึ้นในใบ ลดอาการที่เกิดจาก

ไวรัส TNV และกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาในพืชโดยเกิดความต้านทานทั้งระบบจากไวรัสที่ติดเชื้อบริเวณใบ (Maurhofer และคณะ, 1994) *P. fluorescens* WCS374r สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งระบบใน *Arabidopsis* sp. เพื่อต้านทานต่อเชื้อก่อโรคที่เกิดจาก *P. syringae* pv. *tomato* และ *F. oxysporum* f. sp. *raphani* โดยไม่มีการสะสมกรดซาลิไซลิกและไม่เกิดการกระตุ้นยีน PR (Van Wees และคณะ, 1997) และ *B. subtilis* GB03 และ *B. amyloliquefaciens* IN937a ผลิตสารระเหย 2,3-Butanediol ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ *Arabidopsis* sp. และส่งผลทำให้ *Arabidopsis* sp. ต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเน่าจาก *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ได้ (Ryu และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.9: ระบบการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันในพืช
ที่มา: (Pieterse และคณะ, 2009)

2.8 *Bacillus*

แบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางประชากรโดยมีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์และเจริญในภาวะที่มีอากาศ (aerobic endospore forming bacteria; AEFB) คือแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) (Kumar และคณะ, 2011) *Bacillus* พบได้ทั่วไปในทุกสภาพแวดล้อม เช่น ในน้ำทะเลจนถึงในดิน และพบได้ในสภาพแวดล้อมที่สุขุขอย่างบริเวณน้ำพุร้อน ลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญของ *Bacillus* ได้แก่ การมีผนังเซลล์หนา การสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อความเครียดต่างๆ และการสร้างสารปฏิชีวนะที่อาจเป็นประเภทเปปไทด์ รวมถึงเอนไซม์ต่างๆที่หลั่งออกจากเซลล์ ลักษณะเหล่านี้ช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ยาวนานในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย โดยมีการนำแบคทีเรียในสกุลนี้ไปใช้ในด้านการเกษตรและช่วยส่งเสริมผลผลิตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม (Zhang และคณะ, 2008) *Bacillus* หลากหลายสปีชีส์เป็นที่รู้จักในการเป็นฟีจีฟออาร์ โดยมีกลไกต่างๆที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช กล่าวคือ การผลิตฮอร์โมนพืช, การละลายธาตุอาหารฟอสเฟต, การผลิตไซโตโรพอร์ซึ่งเป็นสารจับธาตุเหล็ก และสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น สารปฏิชีวนะ หรือการยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช และการกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในพืช (Kumar และคณะ, 2012) เหตุผลที่ *Bacillus* มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ ประการแรกคือ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีการศึกษาเป็นอย่างดีและมีองค์ความรู้ที่เอื้อต่อการนำไปใช้ ประการที่สองคือ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้การยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการนำไปใช้ โดยไม่ก่อให้เกิดโรค ประการที่สาม คือ *Bacillus* มีสมบัติการสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งทำให้ทนทานและอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง หรือขาดแคลนสารอาหารและน้ำได้ เป็นต้น (Cawoy และคณะ, 2011) นอกจากนี้ แม้ว่า *Bacillus* ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ก็สามารถมีชีวิตอยู่ในภาวะ facultative anaerobe ซึ่งมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำได้ (Cawoy และคณะ, 2011) สมบัตินี้เป็นข้อดีสำหรับการนำไปใช้เป็นฟีจีฟออาร์ เนื่องจากบริเวณรอบรากพืชมีออกซิเจนความเข้มข้นต่ำ

2.8.1 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของ *Bacillus*

การปล่อยสารอาหารออกมาจากรากและใบของพืชเป็นผลดีต่อแบคทีเรียที่ยึดเกาะหรืออาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว ในทางกลับกันแบคทีเรียเหล่านี้ก็จะช่วยพืชในการปกป้องจากเชื้อก่อโรค โดยสำหรับ *Bacillus* จะแบ่งได้เป็น 3 กลไก คือ การแก่งแย่งแข่งขันในด้านที่อยู่อาศัย รวมถึงธาตุอาหารต่างๆ การผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และการเหนี่ยวนำความต้านทานทั้งระบบในพืช (Cawoy และคณะ, 2011) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.8.1.1 การแก่งแย่งแข่งขันในด้านที่อยู่อาศัยรวมถึงธาตุอาหารต่างๆ

การแก่งแย่งแข่งขันทรัพยากรในธรรมชาติ เช่น สารอาหาร และออกซิเจน เกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน ในแง่ของการควบคุมโรคทางชีวภาพจะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแก่งแย่งแข่งขันโดยตรงสำหรับทรัพยากรดังกล่าวกับเชื้อก่อโรค การแก่งแย่งแข่งขันสารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้ราก่อโรคตายได้ รวมถึงระงับการงอกของสปอร์ราที่อยู่ในดินด้วย (Alabouvette และคณะ, 2006) เนื่องจากบริเวณรากมีความอุดมสมบูรณ์น้อย ฉะนั้นจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณนี้จึงจำเป็นต้องมีความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบการแก่งแย่งแร่ธาตุบางอย่าง เช่น เหล็ก, ทองแดง, สังกะสี, แมงกานีส และอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ธาตุเหล็กเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตและเป็นธาตุที่ขาดแคลนในดิน จึงต้องมีการแก่งแย่งแข่งขัน (Loper และ Henkels, 1997) ไฮเดอโรฟอรัสเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่ผลิตโดยจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่มที่นำไปใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ โดยจะไปละลายและจับเฟอร์ริกไอออนในภาวะที่มีเหล็กจำกัด (Tortora และคณะ, 2011a) ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากการขาดแคลนธาตุเหล็กสำหรับการเจริญ การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านการแก่งแย่งแข่งขันที่อยู่อาศัยและสารอาหารพบได้ใน *Pseudomonas* (Haas และ Défago, 2005) แม้ว่ากลไกการแก่งแย่งแข่งขันยังไม่มีการศึกษาใน *Bacillus* แต่ปรากฏการณ์นี้น่าจะเกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีพบริเวณรอบรากพืชได้ (Cawoy และคณะ, 2011)

2.8.1.2 การผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เช่น *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* และ *B. pumilus* เป็นที่รู้จักว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จีโนมประมาณ 4-5% ของ *B. subtilis* ประมวลรหัสให้เอนไซม์หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Stein, 2005) ในการสังเคราะห์สารทางชีวภาพของ *Bacillus* มีการรายงานถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช โดยกลไกการทำลายเชื้อก่อโรคโดยตรง ตัวอย่างเช่น *B. cereus* Uw85 ผลิตสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่ารา ได้แก่ zwittermicin A และ kanosamine ที่สามารถยับยั้ง *Phytophthora medicaginis* ที่ก่อให้เกิดโรคน้ำคอดินในหญ้าอัลฟาฟา (Silo-Suh และคณะ, 1994) *B. brevis* และ *B. polymyxa* ผลิตสารปฏิชีวนะ gramicidin S และ polymyxin B ที่ยับยั้ง *Botrytis cinerea* ที่ก่อโรคราสีเทาในต้นสตรอเบอรี่ (Haggag, 2008) และ *B. subtilis* ที่สามารถผลิต iturin A ที่ควบคุมโรคเน่าคอดินในมะเขือเทศที่เกิดจาก *R. solani* (Asaka และ Shoda, 1996)

2.8.1.3 การเหนี่ยวนำความต้านทานทั้งระบบในพืช

การเหนี่ยวนำความต้านทานทั้งระบบในพืชด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ตัวอย่างเช่น *B. pumilus* EN16 และ *B. subtilis* SW1 สามารถกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างยาสูบ (tobacco mosaic virus disease) ได้ โดยกลไกที่เกิดขึ้นคือ แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชมีการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของพืชเพิ่มขึ้นคือ เบนิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase), พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรค (PR protein) (Lian และคณะ, 2011)

2.8.2 แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเลเกี่ยวกับการควบคุมทางชีวภาพ

พื้นผิวโลกประกอบด้วยส่วนของพื้นน้ำมากถึง 3 ใน 4 หรือคิดเป็น 70% โดยทะเลเป็นแหล่งกำเนิดของสิ่งมีชีวิตมา 35 ล้านปีแล้ว ทำให้ทะเลเป็นหนึ่งในระบบนิเวศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก สิ่งแวดล้อมทางทะเลมีความซับซ้อนมากและมีสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายอาศัยอยู่ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย อาร์เคีย รา โพรทิสต์ และสัตว์ทะเลต่างๆ (Munn, 2011) Hagström และคณะ (2002) ได้รายงานว่าน้ำทะเลปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีแบคทีเรียประมาณ 10^6 เซลล์ แบคทีเรียและราทะเลสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจำนวนมาก โดยมีปฏิสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตทางทะเลที่มีร่างกายอ่อนนุ่ม ไม่มีโครงสร้างที่ช่วยปกป้องร่างกายที่สังเกตได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารเคมีเหล่านี้ช่วยในการปกป้อง และช่วยให้มีชีวิตรอดในแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีสภาพแวดล้อมรุนแรงได้ โดยสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งอาจผลิตจากสิ่งมีชีวิตนั้นเองหรือจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่น (Armstrong และคณะ, 2001) ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการรายงานถึงจำนวนของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียและราทางทะเลว่ามีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้ทั้งสถาบันการศึกษาและอุตสาหกรรมมีความสนใจเพิ่มมากขึ้น โดยในปี 2007 พบสารใหม่ 961 ชนิด ซึ่งถูกพบจากจุลินทรีย์ทางทะเลโดยเพิ่มขึ้น 24% เมื่อเทียบกับจำนวนของสารที่มีการรายงานในปี 2006 (Jensen และ Fenical, 1994) ดังนั้นน้ำทะเลจึงเป็นแหล่งของการคัดแยกจุลินทรีย์ที่น่าสนใจแหล่งหนึ่ง (Debbab และคณะ, 2010; Munn, 2011)

ดรุณี จิวเจริญ (2555) ได้คัดกรองแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ TD12-11, TU13-9 และ TW1-1N9 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata*, *Bipolaris* sp., *Collectotrichum* sp., *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตทางชีววิทยาโมเลกุล พบว่า ไอโซเลต TD12-11 และไอโซเลต TU13-9 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* XF-1 (gb|CP004019.1) และไอโซเลต TW1-1 N9 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus aryabhattai* PSB57 (gb|HQ242770.1)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียทางทะเลมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ อาทิ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ SH-B10 ซึ่งคัดแยกจากทะเลลึกทางตอนใต้ของประเทศจีน พบว่ามีความสามารถในการผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา ซึ่งไลโปเปปไทด์ที่สายพันธุ์ SH-B10 ผลิตได้นั้น เป็นสารกลุ่มเพนไซซินซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. graminearum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumis melo* L. และ *F. graminearum* f. sp. *zea mays* L. เมื่อทดสอบด้วยวิธีการแพร่ผ่านเมมเบรน พบว่าสามารถยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ได้ดีที่สุด การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่รายงานว่าสารไลโปเปปไทด์กลุ่มเพนไซซินสามารถยับยั้งราได้และทำให้สามารถนำแบคทีเรียทางทะเลมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพได้ (Chen และคณะ, 2010) อีกงานวิจัยหนึ่ง ได้คัดแยก *Bacillus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MC1B-03, MC1B-17, MC3B-22 และ MC1B-14 จากไบโอฟิล์มในทะเล เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต MC1B-03, MC1B-17, และ MC3B-22 มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Bacillus mojavensis* ส่วน ไอโซเลต MC1B-14 มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Bacillus firmus* งานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* และ *F. oxysporum* ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียทางทะเล (yeast extract agar, YEA) โดยฤทธิ์ยับยั้งในอาหาร YEA ดีกว่าในอาหาร PDA และราที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดคือ *C. gloeosporioides* นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต MC3B-22 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ G03 ที่ใช้ในทางการค้า และไอโซเลต MC3B-22 ยังสามารถยึดเกาะและยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้เมื่อนำมาทดสอบในใบมะม่วง (Ortega-Morales และคณะ, 2009)

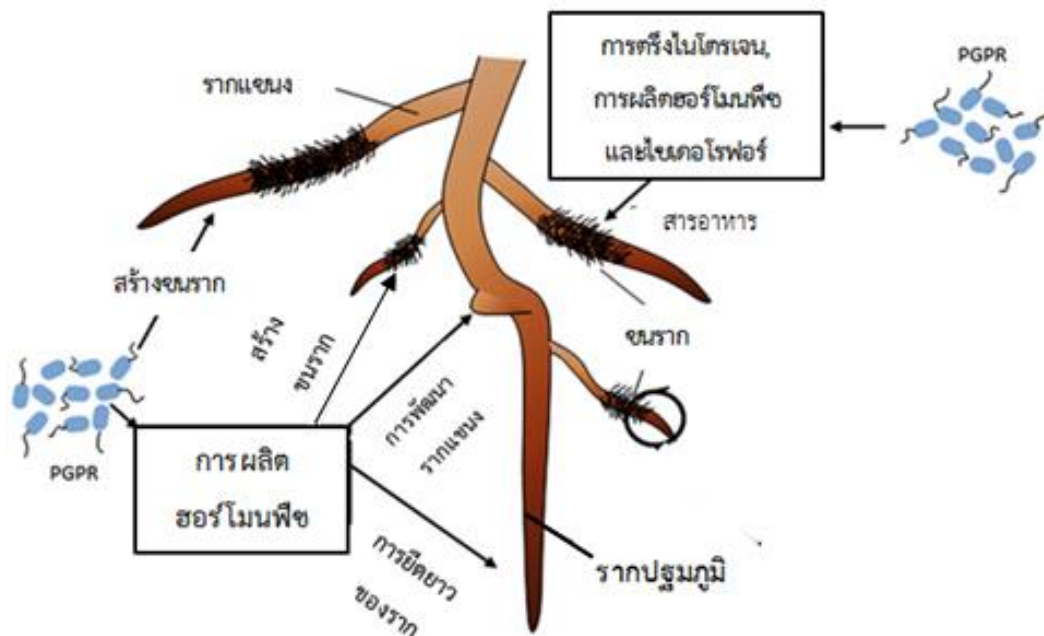
2.9 ไรโซแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช หรือพีจีพีอาร์ (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR)

ในดินจะมีปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอบรากพืชโดยเป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืช ดินและจุลินทรีย์ กล่าวคือ พืชจะได้รับสารอาหารและน้ำที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชผ่านทางราก และส่วนของรากจะมีการปล่อยสารที่มีสมบัติละลายน้ำที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอะมิโน ฮอร์โมน กรดอินทรีย์ น้ำตาล และวิตามิน เป็นต้น ออกมาสู่ดิน ซึ่งเป็นประโยชน์กับจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช ซึ่งจุลินทรีย์ในดินสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารได้ (Antoun และ Kloepper, 2001)

ไรโซแบคทีเรียคือ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช มีความสามารถในการแก่งแย่งสารอาหาร และครอบครองบริเวณส่วนรากของพืชเป็นแหล่งอาศัย ไรโซแบคทีเรียบางชนิดเป็นเอนโดไฟท์ที่สามารถเข้าไปอยู่ภายในเนื้อเยื่อของรากของพืช (Lugtenberg และ Kamilova, 2009) ไรโซแบคทีเรียแบ่งได้หลายกลุ่มคือกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตพืช กลุ่มที่ดำรงชีพอย่างอิสระ และกลุ่มที่เป็นอันตรายต่อพืช กล่าวคือ สามารถจำกัดการเจริญเติบโตของพืชโดยการเปลี่ยนแปลงการดูดซึมน้ำและไอออนของแร่ธาตุบางชนิด หรือยับยั้งสารที่ทำให้พืชเจริญเติบโต (Antoun และ Kloepper, 2001)

พีจีพีอาร์ คือ กลุ่มของไรโซแบคทีเรียที่คิดเป็นประมาณ 2-5% ซึ่งมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พีจีพีอาร์ถูกอธิบายอย่างละเอียดในปี 1978 โดย Kloepper และ Schroth และระบุถึงความสามารถของไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ดังตัวอย่างที่ผลิตหัวไซท์ที่มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใส่เชื้อ (Antoun และ Kloepper, 2001) พีจีพีอาร์มีประโยชน์ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและช่วยให้พืชแข็งแรง เช่น การงอกของต้นกล้าเพิ่มขึ้น การดูดซึมน้ำและสารอาหาร การเพิ่มความแข็งแรง การพัฒนาระบบรากและการเพิ่มผลผลิต เป็นต้น พีจีพีอาร์มีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงหรือทางอ้อม ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ตัวอย่างกลไกการส่งเสริมการเจริญทางตรง คือ การผลิตฮอร์โมนพืช ได้แก่ ออกซิน, จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน เป็นต้น การเพิ่มสารอาหารโดยการละลายแร่ธาตุบางชนิด ได้แก่ ไนเตรตและฟอสเฟต หรือการย่อยสลายสารพิษบางชนิดเพื่อปกป้องพืช เช่น 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) นอกจากนี้พีจีพีอาร์ยังใช้กลไกทางอ้อมในการช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคพืชได้โดยการเหนี่ยวนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค (Lugtenberg และ Kamilova, 2009) พีจีพีอาร์จำนวนมากมีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมากกว่าหนึ่งกลไก สกุลของแบคทีเรียที่มีรายงานว่าจัดอยู่ในกลุ่มพีจีพีอาร์ ได้แก่ *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* และ *Thiobacillus*

ปัจจุบันมีการนำพีจีฟิอาร์ไปใช้กับพืชที่หลากหลายทั้งพืชที่เป็นธัญพืช, พืชสวน รวมถึงไม้ยืนต้น (Bouizgarne, 2013)



รูปที่ 2.10: กลไกต่างๆของพีจีฟิอาร์ในการส่งเสริมการเจริญต่อพืช
ที่มา: ดัดแปลงจาก Vacheron และคณะ (2014)

2.9.1 *Azospirillum*

แบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระ จำนวน 15 สปีชีส์ และไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 1 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ที่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับพืชมากที่สุด คือ *A. brasilense* และสำหรับสปีชีส์อื่นๆที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งบริเวณผิวรากเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *A. lipoferum*, *A. amazonense*, และ *A. irakense* (Cassán และคณะ, 2015) *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร มีเพอริทริคัสแฟลกเจลลา (peritrichous flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ และโพลาร์แฟลกเจลลา (polar flagella) เพื่อใช้ในการแหวกว่าย มีการสะสมแกรนูลของ พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly- β -hydroxybutyrate; PHB) (Fibach-Paldi และคณะ, 2012) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้อย่างหลากหลาย จึงทำให้มีการปรับตัวได้เป็นอย่างดีในสภาพแวดล้อมที่ต้องแข่งขัน เช่น บริเวณรอบรากพืชที่มีสิ่งมีชีวิตอยู่ร่วมกันมากมาย โดยสามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่จะดำรงชีวิตแบบ microaerophilic คือ ต้องการออกซิเจนน้อยๆสำหรับการเจริญในที่ที่มีหรือขาดแคลนสารประกอบไนโตรเจน (Malik และ

คณะ, 1996) *Azospirillum* เป็นเชื้อที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพีจีฟิอาร์ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบราก มีการปรับตัวเก่ง และมีสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ สามารถตรึงไนโตรเจน และสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้ ซึ่งได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน ซึ่งส่งผลถึงการปรับปรุงโครงสร้างของรากพืชให้แข็งแรงดีขึ้น รวมถึงส่งเสริมอัตราการดูดน้ำและแร่ธาตุของราก และยังสามารถในการละลายธาตุอาหารให้กับพืชด้วย (Bashan และ de-Bashan, 2010) *Azospirillum* ยังสามารถสร้างไซโตโรฟอร์ที่เป็นตัวจับเหล็กเพื่อช่วยในการดึงธาตุเหล็กให้กับพืชในภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลนธาตุเหล็กอีกด้วย (Tortora และคณะ, 2011a)

2.9.2 สมบัติของการเป็นพีจีฟิอาร์

2.9.2.1 การผลิตฮอร์โมนพืช

ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชเป็นสมบัติเด่นของจุลินทรีย์จำนวนมากและแบคทีเรียในกลุ่มพีจีฟิอาร์ โดยเฉพาะ *Azospirillum* ที่ช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเชื่อว่าความสัมพันธ์ของ *Azospirillum* กับพืชเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Vacheron และคณะ, 2014) การผลิตฮอร์โมนพืชของ *Azospirillum* เป็นสมบัติที่รู้จักกันดี ซึ่งกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่ผลิตได้แก่ กลุ่มอินโดล เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และกลุ่มจิบเบอเรลลิน เป็นต้น ฮอร์โมนพืชเหล่านี้จะมีส่วนช่วยในการเปลี่ยนเมแทบอลิซึมและโครงสร้างของรากพืช ส่งผลให้มีการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุได้ดีขึ้น ดังนั้นพืชจึงมีขนาดใหญ่และแข็งแรง (Bashan และ de-Bashan, 2010)

2.9.1.1.1 การผลิต IAA ของ *Azospirillum*

IAA เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ที่มีหมู่คาร์บอกซีเมทิล (กรดอะซิติก) ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน (Bandurski และคณะ, 1995) IAA มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับกลไกในด้านสรีระของพืช โดยออกซินจะตอบสนองต่อการแบ่งเซลล์ การยืดยาวของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (Leveau และ Lindow, 2005) ฮอร์โมนพืชกลุ่มนี้จะช่วยในการเพิ่มท่อลำเลียงน้ำและรากในโครงสร้างของพืช โดยวิธีการสังเคราะห์ IAA มี 3 แบบซึ่งมีทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น คือ 1.) การสังเคราะห์ IAA ผ่าน indole-3-pyruvic acid (IPyA) และ indole-3-acetaldehyde 2.) การเปลี่ยนทริปโตเฟนเป็น indole-3-acetaldoxyme และ indole-3-acetonitrile (IAN) 3.) การสังเคราะห์ IAA ผ่าน indole-3-acetamide formation (IAM) (Okon, 1993) อย่างไรก็ตามวิถีในการสังเคราะห์และกลไกของ IAA ก็มีสิ่งที่ยังไม่ทราบอีกมาก (Zakharova และคณะ, 2000)

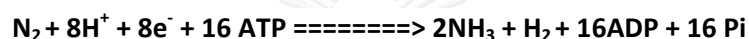
การสังเคราะห์ IAA ของ *Azospirillum* เกี่ยวข้องกับทริปโตเฟน โดยมีเอนไซม์ ipdC ที่ต้องถูกกระตุ้นด้วยทริปโตเฟนในการสังเคราะห์เอนไซม์อินโดลไพรวูเวตีคาร์บอกซีเลส (indole

pyruvate decarboxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในวิถีการสังเคราะห์ IAA (Costacurta และคณะ, 1994) จากนั้นจะเปลี่ยน IPyA เป็น indole-3-acetaldehyde (Zimmer และคณะ, 1998)

2.9.2.2 การตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศ (N_2) ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) และเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยใช้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะได้ผลผลิตเป็นแอมโมเนีย 2 โมลจากแก๊สไนโตรเจน 1 โมล และสูญเสียพลังงาน 16 ATP และได้อิเล็กตรอน และโปรตอนในรูปไฮโดรเจน ที่แสดงตามสมการ ดังนี้

ไนโตรจีเนส



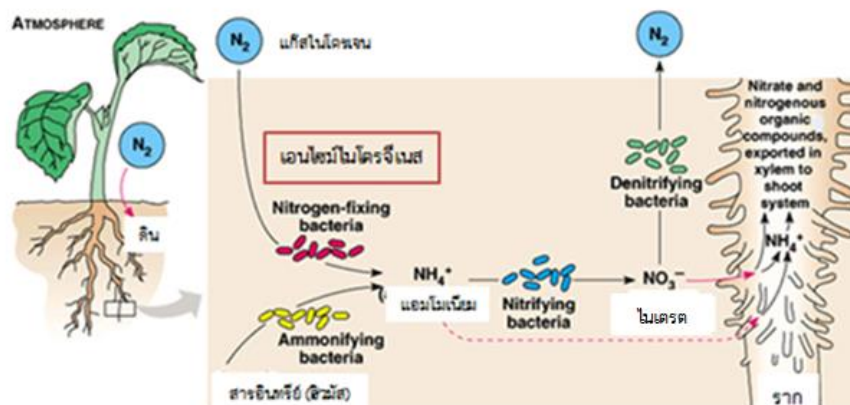
กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นกลไกหลักของ *Azospirillum* ซึ่งมีผลในการช่วยส่งเสริมการเจริญในพืช โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของผลรวมไนโตรเจนในลำต้นและเมล็ดของประมาณ 5-30% (Kapulnik และคณะ, 1981) นอกจากนี้ในแง่ของการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ พบว่ายังไม่สามารถใช้แทนปุ๋ยได้แต่สามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพของปุ๋ยได้ ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ จึงเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญมากในการเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดินและพืช (Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994)

Nitrogen-fixing bacteria = แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

Ammonifying bacteria = แบคทีเรียเปลี่ยนสารอินทรีย์เป็นแอมโมเนียม

Nitrifying bacteria = แบคทีเรียเปลี่ยนแอมโมเนียมเป็นไนเตรต

Denitrifying bacteria = แบคทีเรียเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนโตรเจน



รูปที่ 2.11: แบคทีเรียในดินที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tunbridge และ Fitzpatrick (2008)

2.9.2.3 การละลายธาตุอาหารฟอสเฟต

ธาตุฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งมีปริมาณไม่มากเหมือนกับแหล่งของธาตุไนโตรเจนที่อยู่ในชั้นบรรยากาศที่สามารถนำมาใช้โดยผ่านกระบวนการทางชีวภาพ บทบาทของธาตุฟอสฟอรัสมีหลากหลายได้แก่ การพัฒนาและการแบ่งเซลล์ของราก การเพิ่มการเจริญเติบโตของรากแขนงและรากฝอยในระยะแรกพร้อมทั้งเพิ่มความแข็งแรงให้กับรากและลำต้น การสร้างดอกและเมล็ด การให้ผลผลิตของพืชมาก รวมถึงเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA), อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA), อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) และโคเอนไซม์ (coenzyme) ซึ่งสารอินทรีย์ดังกล่าวเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์โปรตีน และการถ่ายทอดพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ตลอดจนการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (Tilak และคณะ, 2005; โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, 2553a)

ธาตุฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ที่พืชสามารถนำมาใช้ได้จะอยู่ในรูปของฟอสเฟตไอออน ได้แก่ ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน (H_2PO_4^-) และโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน (HPO_4^{2-}) จะให้เห็นได้ว่าถึงแม้สารประกอบของฟอสฟอรัสในดินมีอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปละลายน้ำยากส่งผลให้พืชขาดฟอสฟอรัสได้ (Brady, 1977) ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีบทบาทสำคัญในการละลายสารประกอบฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ได้ดังกล่าวข้างต้น

2.9.3 กลไกการควบคุมทางชีวภาพของ *Azospirillum*

Azospirillum ยังไม่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช เนื่องจาก *Azospirillum* หลากหลายสายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อก่อโรคโดยตรง กล่าวคือ ไม่พบการผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และไม่มีการผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) อย่างไรก็ตามมีการรายงานถึงกลไกบางอย่างของ *Azospirillum* ที่ช่วยในการลดความเสียหายจากเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น การแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในสิ่งแวดล้อมและการยึดพื้นที่อาศัยจากเชื้อก่อโรค, การยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชที่เป็นปรสิตในพืช, การช่วยให้พืชเกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อก่อโรค และการยับยั้งการเจริญของราโดยการผลิตสารที่มีความเป็นพิษ (Bashan และ de-Bashan, 2010) หากกล่าวโดยสรุปถึงตัวอย่างกลไกของ *Azospirillum* ในการนำมาใช้ควบคุมทางชีวภาพ มีดังนี้

2.9.3.1 การผลิตสารที่มีความเป็นพิษ

มีรายงานว่าบางสายพันธุ์ของ *Azospirillum* จากประเทศบราซิลสามารถผลิตไฮยาไนต์ (HCN) (Goncalves และคณะ, 1998) โดยลักษณะดังกล่าวถือเป็นลักษณะพิเศษที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ที่อยู่ในภูมิศาสตร์อื่นๆ บางไอโซเลตของ *Azospirillum* ผลิตแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Tapia-Hernández และคณะ, 1990) หรือผลิต phenylacetic acid ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลคล้ายฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (Somers และคณะ, 2005) *A. brasilense* มีการผลิตสารโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งการงอกและเจริญของเมล็ด broomrape ที่เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งได้ (Dadona และ Bar Nuna, 2004) และ *Azospirillum* spp. สามารถยับยั้งการงอกของวัชพืช Striga weed (witchweed) ที่รบกวนการเจริญของข้าวฟ่างในนา และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวฟ่างอีกด้วย (Bouillant และคณะ, 1997) ในกรณีของ *Azospirillum* ที่มีการผลิตสารที่เป็นพิษนั้น จะพบเฉพาะ *in vitro* หรือเมื่อมีการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคพืช โดยยังไม่มีการรายงานถึงการกระตุ้นความต้านทานต้านลบของพืช (Bashan, 1998)

2.9.3.2 การแก่งแย่งแข่งขัน

เมื่อ *A. brasilense* สายพันธุ์ Cd ถูกใส่ร่วมกับ *Staphylococcus* spp. พบว่าประชากรของ *Staphylococcus* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Holguin และ Bashan, 1993) อีกตัวอย่างงานวิจัยหนึ่ง เช่น การใส่เชื้อที่ก่อโรคใบด่างในมะเขือเทศที่เกิดจาก *P. syringae* pv. *tomato* (PST) ร่วมกับ *A. brasilense* โดยเริ่มจากการคลุกเชื้อทั้งสองกับเมล็ดมะเขือเทศ พบว่าเมื่อนำเมล็ดไปปลูกจะมีจำนวนประชากรของเชื้อที่ก่อโรคใบด่างบริเวณรอบรากพืชลดลง และการเพิ่มจำนวนของ *A. brasilense* ยังทำให้ปกป้องต้นมะเขือเทศจากเชื้อ PST และช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืชอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า PST ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในบริเวณรอบรากและบริเวณที่มี *A. brasilense* การใส่เชื้อผสมของ *A. brasilense* และ PST ด้วยการพ่นที่บริเวณใบ แสดงให้เห็นถึงการลดลงของประชากรของ PST อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และช่วยให้อาการของโรคใบด่างลดลง รวมถึงทำให้มะเขือเทศเจริญเติบโตได้ดีขึ้นอีกด้วย (Bashan และ de-Bashan, 2002) ในการใส่ *A. brasilense* Sp7 ที่เมล็ดแล้วตามด้วยเชื้อก่อโรค 2 ชนิดในมะเขือเทศ คือ *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* ที่ก่อโรคเน่า และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ที่ก่อโรคจุด พบว่ามีผลในการช่วยชะลอการตายของใบและต้นเมื่อเทียบกับต้นควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *A. brasilense* Sp 7 โดยเป็นผลดีในพื้นที่เพาะปลูกจริง (Romero และคณะ, 2003) *A. brasilense* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อในดินที่ก่อโรคในต้นแตงกวาได้ โดยพบการลดลงของน้ำหนักแห้งของเส้นใยชนิดต่างๆ ได้แก่ *F. oxysporum* ลดลง 90-96%, *R. solani* ลดลง 72-94%, *Pythium* ลดลง 71-95% และ *Sclerotinia* ถูกยับยั้งได้ 100% (Hassounaa และ

คณะ, 1998) ในธรรมชาติที่มีธาตุเหล็กอย่างจำกัด *Azospirillum* สามารถผลิตไซโตโครฟออร์มาจับธาตุเหล็กที่ขาดแคลน ซึ่งทำให้จุลินทรีย์และราหลายชนิดขาดธาตุเหล็กและไม่สามารถเจริญได้ (Shah และคณะ, 1992)

2.9.3.3 การกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงและต้านทานต่อเชื้อก่อโรค

มีตัวอย่างของการควบคุมทางชีวภาพมากมายที่ได้รับการรายงานไว้ แต่ไม่มีการอธิบายถึงกลไกเหล่านั้น โดยเป็นเพียงการสันนิษฐานว่าการใส่ *Azospirillum* จะส่งผลให้พืชมีความแข็งแรงต้านทานต่อเชื้อก่อโรคโดยการยับยั้งการติดเชื้อโรคนั้นๆ (Tilak และคณะ, 2005) โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในดิน เช่น การใส่ *A. lipoferum* ในต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่มีการติดเชื้อไส้เดือนฝอยซึ่งก่อโรครากปม ทำให้อาการรากปม และไซของไส้เดือนฝอยที่ติดอยู่กับรากลดลงเช่นกัน ต้นถั่วเขียวมีการเจริญเติบโตดีขึ้นรวมถึงมีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย (Khan และ Kounsar, 2000) จุลินทรีย์ เช่น *A. brasilense* ถูกใช้ในการพ่นที่บริเวณใบเพื่อยับยั้งราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในต้นมัลเบอร์รี่ เช่น โรคราแป้ง (powdery mildew) ที่เกิดจาก *Phyllactinia corylea*, โรคใบจุดดำ (black leaf spot) และโรคใบไหม้ (bacterial leaf blight) ที่เกิดจาก *P. mori* และโรคใบสนิมดำ (black leaf rust) ที่เกิดจาก *Cerotelium fici* ผลที่ได้พบว่าช่วยลดจำนวนของเชื้อก่อโรคลงได้ (Sudhakar และคณะ, 2000) มีงานวิจัยที่ใส่ *Azospirillum* sp. B510 ที่เป็นเอนโดไฟท์ลงไปในช่วงและพบว่าสามารถกระตุ้นให้ข้าวต้านทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจาก *M. oryzae* และ *X. oryzae* ได้ โดยกลไกการกระตุ้นความต้านทานผ่านสารตัวกลาง คือ กรดซาลิไซลิก หรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน PR (Yasuda และคณะ, 2009)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ *Azospirillum* ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เช่น

Bhaskara Rao และ Charyulu (2005) ได้ทดลองใส่ *A. lipoferum* เพียงอย่างเดียว จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Inoculum-1 (In-1), Inoculum-2 (In-2) และ Inoculum-3 (In-3) และใส่ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจนในข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet) พบว่ามีผลทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของรากและลำต้น และองค์ประกอบของไนโตรเจนในราก ลำต้นและเมล็ดเพิ่มขึ้น ปริมาณผลผลิตของพืชและน้ำหนักเมล็ดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชกลุ่มควบคุมพบว่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดย *A. lipoferum* สายพันธุ์ In-2 ให้ผลผลิตดีที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์

Deniele และคณะ (2015) มีความสนใจในการหาภาวะที่เหมาะสมของ *Azospirillum* และข้าวโพด เพื่อเป็นการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยมีจุดประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพของหัวเชื้อ *A. brasilense* ที่จะนำไปใช้ทางการค้าร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจนในระดับต่างๆ โดยการทดลองใช้ข้าวโพดพันธุ์ผสมที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อ *A. brasilense* และมีการเติมปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับต่างๆตั้งแต่ 0-160

กิโลกรัมต่อเฮกแตร์ ผลการทดลอง พบว่าการใส่หัวเชื้อ *A. brasilense* ช่วยเพิ่มพื้นที่ใบและน้ำหนักแห้งของลำต้นคิดเป็น 11% และ 12% ตามลำดับ

นอกจากนี้ Swedrzynska (2000) ได้ศึกษาถึงการช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวสาลีและข้าวโอ๊ตในฤดูหนาว โดยมี 3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การใส่หัวเชื้อ *A. brasilense* การใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และการใส่ยาฆ่ารา ผลที่ได้พบว่าธัญพืชที่ใส่หัวเชื้อ *A. brasilense* มีความแข็งแรงและให้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นโดยผลผลิตของข้าวสาลีและข้าวโอ๊ตเพิ่มขึ้นคิดเป็น 27% และ 6% ตามลำดับ

2.10 การจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการ

การจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการ คือ การจัดการและเลือกสรรวิธีการมาใช้ร่วมกันในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยก่อให้เกิดผลดีทั้งในด้านเศรษฐกิจและสภาพแวดล้อม วิธีหนึ่งคือ การใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งจะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้หลายโรค หรือมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพและการส่งเสริมการเจริญของพืชอย่างบูรณาการโดยใช้แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งโรคพืชและฟิซีฟิอาร์ร่วมกัน เช่น การป้องกันโรคใบด่างและใบจุดที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ตามลำดับ โดยใช้แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งโรคใบด่าง 3 ชนิด และแบคทีเรียกลุ่มฟิซีฟิอาร์ 2 ชนิด ซึ่งฟิซีฟิอาร์ที่ถูกเลือกมีสมบัติในการเหนี่ยวนำความต้านทานต่อโรคใบด่างในพืช เมื่อนำแบคทีเรียไปคลุกกับเมล็ดหรือผสมในดินที่ใช้ปลูก โดยมีการใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้สองชนิดร่วมกันแล้ว ผลการทดลองที่ได้พบว่า *P. syringae* สายพันธุ์ Cit7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบด่างสูงที่สุด และ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 89B-61 ซึ่งเป็นฟิซีฟิอาร์ลดความรุนแรงของโรคใบด่างได้ดีที่สุด นอกจากนี้ฟิซีฟิอาร์สองสายพันธุ์คือ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 89B-61 และ *B. pumilus* สายพันธุ์ SE34 ยังสามารถยับยั้งโรคใบจุดได้อีกด้วย และการนำแบคทีเรียที่ยับยั้งโรคใบด่างสายพันธุ์ Cit7 และฟิซีฟิอาร์สายพันธุ์ 89B-61 มาใช้ร่วมกันสามารถยับยั้งโรคใบด่างและใบจุดได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับการใส่เชื้อเพียงชนิดเดียว จะเห็นได้ว่าการควบคุมโรคมียุทธศาสตร์สูงชันเมื่อมีการใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพร่วมกัน งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าฟิซีฟิอาร์บางสายพันธุ์มีการเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคซึ่งเป็นการเตรียมพร้อมก่อนการติดโรคและอาจส่งผลดีในการนำไปใช้ร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์อื่นๆ (Jia และคณะ, 2006)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ของบริษัท Whatman International CO., Ltd., England
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International CO., Ltd., England
3. กระบอกฉีดยาพลาสติก (syringe) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
5. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
6. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
7. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
8. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Seoulin Bioscience, USA
10. เครื่องแช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
11. เครื่องนาโนดรอป 2000 (Nanodrop 2000 spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
12. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
13. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น ss-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
16. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo, USA

19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
20. ชุดอุปกรณ์เตรียม agarose gel electrophoresis ได้แก่ ภาชนะเจล กล่องใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ บริษัท Mupid-2 Advance, Japan
21. ชุดกรองสารตัวอย่างปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน บริษัท Millipore, USA
22. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
23. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น j2-21 บริษัท ISSCO, USA
24. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท Memmert, Germany
25. ตู้อบแห้ง (hot air oven) บริษัท Memmert, Germany
26. ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20, 100, 200, 1,000 มิลลิลิตร บริษัท Gilson, Japan
27. หลอดควิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
28. หลอดแก้วเลี้ยงต้นข้าวขนาด 25x250 มิลลิเมตร ของบริษัท Pyrex, USA
29. หลอดไมโครปิพิจขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท F.L. medical s.r.l., Italy
30. หลอดไฟให้ความสว่างต้นไม้ (LED grow light) ของบริษัท Siam grow light, Thailand
31. แผ่นสะท้อนแสงของบริษัท Siam grow light, Thailand
32. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 และรุ่น W760 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
33. Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
2. กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
3. กรดมาลิก ($C_4H_6O_5$) ของบริษัท Sigma, USA
4. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
5. กรดอินโดลอะซีติก (indole-3-acetic acid; IAA) ($C_{10}H_9O_2N$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
7. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Fluka, Germany
8. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท Merck, Germany
9. คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ของบริษัท Merck, Germany

10. คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
11. คาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (Carboxymethyl cellulose; CMC) ของบริษัท Merck, Germany
12. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
13. แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ของบริษัท MAY&BAKER Ltd., England
14. โคบอลต์ซัลเฟต ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
15. โครมอะซัวร์อล เอส ($\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}$) ของบริษัท Sigma, USA
16. ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (Thermo PCR purification kit) ของบริษัท Thermo Scientific, Lithuania
17. ซาฟรานิน (safranin) ของบริษัท CARLO ERBA, USA
18. ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
19. ซูโครส ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) ของบริษัท Merck, Germany
20. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
21. โซเดียมซิเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) ของบริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ของบริษัท คาโอ อินดัสเตรียล (ประเทศไทย), Thailand
25. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
26. ทรีปโตน (casein enzymic hydrolysate) ของบริษัท Himedia, India
27. ทรีปโตแฟน (tryptophan; Trp) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล อะมีโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl) aminomethane) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ของบริษัท Research Organics, USA
29. นมผงขาดมันเนย (skim milk) ของบริษัท Himedia, India
30. แบคโตเปปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Himedia, India
31. แป้งจากมันฝรั่ง (soluble starch) ของบริษัท Himedia, India
32. ผงวุ้น (agar)
33. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
34. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
35. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia

36. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
37. เฟอริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
38. เฟอริกซิเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$) ของบริษัท Fluka, Germany
39. มอลโทส ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) ของบริษัท Fluka, Switzerland
40. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท CARLO ERBA, USA
41. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
42. แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท UNIVAR Ajax Finechem Pty Ltd., Australia
43. แลกโทส ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) บริษัท Difco, USA
44. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Himedia, India
45. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Himedia, India
46. สีคองโกเรด (congo red) ของบริษัท Sigma, USA
47. สีโบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue) ของบริษัท Sigma, USA
48. ออกซาเลตมาลาไคท์ กรีน (malachite green (oxalate)) ของบริษัท Fluka, Germany
49. อาหารฟีนอลเรดบรธเบสสำเร็จรูป (Phenol Red Broth Base) ของบริษัท Difco, USA
50. อาหารสำเร็จรูป PDB (Patato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, India
51. อาหารสำเร็จรูปสำหรับ *Azospirillum* (*Azospirillum* Broth) ของบริษัท Himedia, India
52. เอธานอล ของบริษัท J.I. Baker, USA
53. เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ของบริษัท Sigma Chemical. Co., Germany
54. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Merck, Germany
55. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ของบริษัท Merck, Germany
56. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$) ของบริษัท Merck, Germany
57. ไอออนซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Fluka, Germany
58. ไอโอดีน (iodine) ของบริษัท Merck, Germany
59. เฮกซะเดซิลไตรเมทิล แอมโมเนียม โบรไมด์ (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide; HDTMA) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
60. 1 kb DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
61. DNAzol[®] Reagent ของบริษัท Invitrogen, USA
62. GoTaq[®] Green Master Mix ของบริษัท Promega, USA
63. Triton-X 100 ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์

| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ | เอกสารอ้างอิง |
|----------|---------------------------------|--------------------|
| 27F | 5'-AGA GTT TCC TGG CTC AG-'3 | (Kim และคณะ, 2005) |
| 1512R | 5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC T-'3 | (Kim และคณะ, 2005) |

3.4 จุลินทรีย์และการเก็บรักษา

3.4.1 แบคทีเรีย

Azospirillum sp. จำนวน 16 ไอโซเลตที่ได้รับจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บรักษาโดยการเลี้ยงในอาหารเหลวสำเร็จรูปสำหรับ *Azospirillum* (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งปราศจากแหล่งไนโตรเจน (semisolid N-free malate medium; NFb) และมีการเติมสี่โบรโมไทมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ (บริษัท Himedia, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาผสมด้วย 85% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชังจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ TD12-11, TU13-9 และ TW1-1N9 (ดร.ณิ จิวเจริญ, 2555) การเก็บรักษาทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth (NB, ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผสมด้วย 85% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 ราก่อโรคพืช

ราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* ได้รับมาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เก็บรักษาโดยเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato dextrose agar (PDA, ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ยกเว้น *R. solani* บ่มเพียง 2 วัน จากนั้นเททับด้วย 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย

3.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชเบื้องต้น

3.5.1.1 การเตรียมราก่อโรคพืชและแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

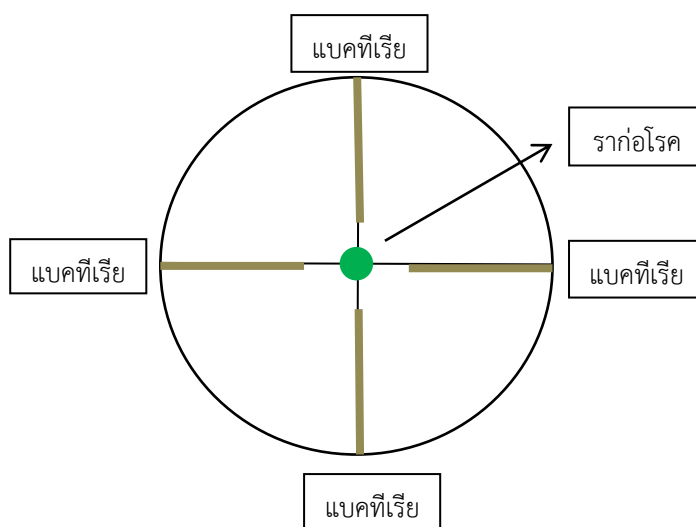
เลี้ยงราก่อโรคพืช ซึ่งได้แก่ *R. solani* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

เลี้ยง *Azospirillum* sp. จำนวน 16 ไอโซเลต ที่ได้รับมาจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร ใน *Azospirillum* agar medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ซึ่งมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (0.5 กรัมต่อลิตร) และสีคองโกเรด (15 มิลลิลิตรของความเข้มข้นคองโกเรด 1:400 ของสารละลาย) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเล จำนวน 3 ไอโซเลตได้แก่ TW1-1N9, TD12-11 และ TU13-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA, ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยการเลี้ยงร่วมกัน (dual culture)

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคโดยแบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 4 ส่วนพร้อมทั้งระบุตำแหน่งของการขีดแบคทีเรีย ดังรูป 3.1 สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ *Azospirillum* sp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมกรดมาลิกและสารอาหารที่จำเป็นต่อ *Azospirillum* sp. (Tortora และคณะ, 2011a) เมื่อขีดแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้แล้ว ใช้คอร์กบอเรียที่ปราศจากเชื้อจะราก่อโรคพืชที่ต้องการทดสอบ แล้วนำมาวางที่กึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ขีดแบคทีเรียไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน สังเกตความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต เลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคที่เห็นได้ชัดเจนโดยการนำชิ้นวุ้นรากที่เจริญร่วมกับแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรามาศึกษาการเจริญของรากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และนำแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคที่เห็นได้ชัดเจนมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.1: วิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชด้วยเทคนิคการขีดแบคทีเรีย

3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย

3.5.2.1 การเตรียมร่าก่อโรคพืชและน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย

เลี้ยงราในข้อ 3.5.1.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่เห็นได้ชัดเจนจากข้อ 3.5.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายแบคทีเรียมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยปีเปิดแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มา 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใส (supernatant) มากกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรด้วยชุดกรอง millipore filter ที่ปราศจากเชื้อ

3.5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียในการยับยั้งร่าก่อโรคพืช

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (2X PDA, ภาคผนวก ก หมายเลข 6) และมีอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไม่ให้อาหารแข็งตัว แล้วผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียที่ผ่านการกรองจากข้อ 3.5.2.1 ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2X PDA ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1:1 สำหรับชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB แทนน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 2X PDA ที่มีอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงเทเพลท แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง เจาะร่าก่อโรคพืชที่เลี้ยงบน PDA โดยใช้คอร์ก

บอเรียที่ปราศจากเชื้อขนาด 9 มิลลิเมตร แล้ววางชั้นวุ้นที่มีราลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทเพลทไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญของร่าก่อโรคพืชแล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้จากสูตรต่อไปนี้ (Yu และคณะ, 2011)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของร่าที่เจริญในชุดการทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของร่าที่เจริญในชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

3.6 การกำหนดปริมาณเชื้อโดยการถ่ายภาพมาตรฐาน

เลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเลี้ยง *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปสูตร NFb ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count และวัดค่าความค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรสำหรับ *Azospirillum* sp. และ 660 นาโนเมตรสำหรับแบคทีเรียจากน้ำทะเลโดยเจือจางเชื้อที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 จำนวนค่าแล้ววาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง

3.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยง *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NFb ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (0.5 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปรับปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 0.2 ซึ่งจะเท่ากับ ความเข้มข้นของเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต TW1-1N9, TD12-11 และ TU13-9 ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 0.5 ซึ่งจะเท่ากับ ความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.7.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA)

ทดสอบความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งเป็นหนึ่งในฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (Bashan และ de-Bashan, 2010) ตามวิธีของ Asghar และคณะ (2002) ที่ปรับปรุงตามวิธีของ Roesch และคณะ (2007) สำหรับ *Azospirillum* sp. เลี้ยงในอาหารเหลว NFb ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และแบคทีเรียจากน้ำทะเลเลี้ยงในอาหารเหลว NB โดยที่อาหารทั้งสองมีการเติมทริปโตแฟน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ข้างต้นปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3, 5, และ 7 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาทดสอบการผลิตออกซินโดยการวัดปริมาณ IAA ด้วยสารละลาย Salkowski colouring reagent (FeCl_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร + 35% HClO_4 98 มิลลิลิตร) โดยใช้สารละลายใส 2 มิลลิลิตรผสมกับ Salkowski colouring reagent 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดปริมาณการผลิต IAA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) ที่ความเข้มข้นในช่วง 10-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.3 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตตามวิธีของ Nautiyal (1999) โดยนำ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาหยดลงบนอาหารแข็ง National Botanical Research Institutes Phosphate Growth Medium (NBRIP, ภาคผนวก ก หมายเลข 7) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น เนื่องจากการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

3.7.4 การทดสอบการผลิตสารไซเตอโรฟอร์

ทดสอบการผลิตสารไซเตอโรฟอร์โดยหยด *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร รอจนแห้ง แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Chrome Azurol Sulphonate (CAS, ภาคผนวก ก หมายเลข 8) และบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเริ่มตรวจสอบ CAS-iron complex ที่เกิดจากไซเตอโรฟอร์จับกับธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้มเหลือง (Schwyn และ Neillands, 1987) สังเกตวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนสี และการผลิตไซเตอโรฟอร์โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวนสีส้มเหลืองที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละวัน

3.7.5 การทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน

เลี้ยง *Azospirillum* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทะเลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เพื่อทดสอบความสามารถของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน ซึ่งเป็นการศึกษาทางอ้อมถึงความสามารถของแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศนั้น นำเซลล์เริ่มต้นของแต่ละไอโซเลต 1 โคโลนีมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปสูตร NFb ภายใต้ภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต

3.8 การทดสอบการติดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว

3.8.1 การเตรียมเมล็ดข้าว

คัดเลือกเมล็ดข้าว (พันธุ์ปทุมธานี 1) ที่มีความสมบูรณ์ ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำเฉพาะเมล็ดที่จมน้ำมาซบให้แห้งด้วยกระดาษซับ แล้วนำเมล็ดข้าวที่คัดเลือกไว้ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 10 วินาที เทเอทานอลทิ้ง แล้วล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 2.5% หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 3% แช่ไว้นาน 3-5 นาที เทโซเดียมไฮโปคลอไรท์หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 6 ครั้ง รินน้ำกลั่นทิ้ง แล้วแช่น้ำกลั่นต่ออีก 1-4 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 6 ครั้ง บ่มเมล็ดข้าวในเพลทแก้วที่มีกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อชุ่มน้ำเพื่อให้ความชื้น ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 วัน จนสังเกตเห็นว่ามีรากเจริญออกมาจากเมล็ด (Woomer และคณะ, 2011)

3.8.2 การทดสอบการเกิดโรคโดยราในต้นข้าว

นำเมล็ดที่งอกรากแล้วไปใส่ในหลอดแก้วขนาด 25x200 มิลลิเมตรที่มีสารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ที่มีโพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำราก่อโรคพืชที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 2 วัน โดยราที่ไม่สร้างสปอร์ใช้คอร์กบอเรียที่ปราศจากเชื้อเจาะขึ้นวันร่าเพื่อนำมาใช้ ใส่ร่าลงในหลอดที่มีเมล็ดข้าว แล้ววางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้มีแสงแดดเพียงพอ สังเกตการเจริญของต้นข้าวเมื่อเวลาผ่านไป

ไป 3, 7, 9 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่รา โดยบันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นข้าวตั้งแต่ส่วนรากจนถึงใบเพื่อประเมินความรุนแรงของการก่อโรคในข้าว

3.9 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลในต้นข้าว

3.9.1 การเตรียมเมล็ดข้าวและหัวเชื้อของแบคทีเรีย

เตรียมเมล็ดข้าวตามวิธีในข้อ 3.8.1 และเตรียมหัวเชื้อ *Azospirillum* sp. โดยเลี้ยง *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปสูตร NFb ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปรับปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 0.2 ซึ่งจะเท่ากับความเข้มข้นของเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเพื่อใส่ลงในอาหารเลี้ยงต้นข้าว และเลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 0.5 ซึ่งจะเท่ากับความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.9.2 การส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของ *Azospirillum* sp. ในต้นข้าว

นำเมล็ดข้าวที่งอกรากแล้วไปใส่ในหลอดแก้วที่มีสารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจนหรือที่มี KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ใส่แบคทีเรียลงในหลอดโดยมีชุดการทดลอง 3 ชุด ดังนี้

- ชุดที่ 1 เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน
- ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน
- ชุดที่ 3 เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และมี *Azospirillum* sp.

สังเกตการเจริญของต้นข้าวทุกวัน และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นข้าว ได้แก่ ความยาวราก, ความสูงของต้นข้าว, สีของใบ, น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก

3.9.3 การส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของแบคทีเรียจากน้ำทะเลในต้นข้าว

นำเมล็ดข้าวที่งอกรากแล้วไปใส่ในหลอดแก้วที่มีสารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจนหรือที่มี KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ใส่แบคทีเรียลงในหลอดโดยมีชุดการทดลอง 2 ชุด ดังนี้

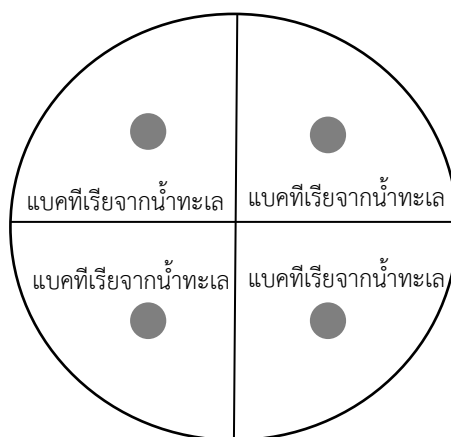
ชุดที่ 1 เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน

ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากน้ำทะเล

สังเกตการเจริญของต้นข้าวทุกวัน และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นข้าว ได้แก่ ความยาวราก, ความสูงของต้นข้าว, สีของใบ, น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก

3.10 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

เนื่องจาก *Azospirillum* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญให้กับต้นข้าว และแบคทีเรียจากน้ำทะเลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในต้นข้าว ดังนั้นในการนำประโยชน์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มมาใช้กับพืชร่วมกัน จึงต้องมีการทดสอบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้งสอง โดยเลี้ยง *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NFb ที่ใส่สารสกัดจากยีสต์ (0.5 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium หลังจากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผ่านการเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รองกระดาษกรองแห้ง แล้วนำมาวางบนอาหารที่ได้เกลี่ยเชื้อไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Azospirillum* sp. โดยแบคทีเรียจากน้ำทะเลซึ่งสังเกตได้จากบริเวณใสรอบกระดาษกรอง (inhibition zone)



รูปที่ 3.2: วิธีการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

3.11 การทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวที่เกิดจากรา

3.11.1 การเตรียมเมล็ดข้าวและหัวเชื้อของแบคทีเรีย

เตรียมเมล็ดข้าวตามวิธีข้อ 3.8.1 และหัวเชื้อของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.9.1 และเลี้ยงราก่อโรคพืชที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 2 วัน

3.11.2 การทดสอบการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากรา

นำเมล็ดข้าวที่งอกรากแล้วไปใส่ในหลอดแก้วที่มีสารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจนหรือที่มี KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ใส่แบคทีเรียและราลงในหลอดโดยมีชุดการทดลอง 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1: เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน + รา

ชุดที่ 2: เมล็ดข้าวในสารละลายที่ไม่มีไนโตรเจน + *Azospirillum* sp. เมื่อผ่านไป 1 วัน + แบคทีเรียจากน้ำทะเล และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน + รา

สังเกตการเจริญของต้นข้าวทุกวัน และเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความยาวราก ความสูงของต้นข้าว สีของใบ น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก และประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคในข้าว โดยมีดัชนีกำหนดการประเมิน, การคำนวณความรุนแรงของโรคและประสิทธิภาพในการป้องกันโรค (Yang และคณะ, 2009a) ดังนี้

0 = ไม่มีอาการของโรค

1 = มีแผลเล็กน้อยถึงต่ำกว่า 1/4 ของพื้นที่บริเวณกาบใบ

3 = มีแผลน้อยกว่า 1/2 ของพื้นที่บริเวณกาบใบ

5 = มีแผลมากกว่า 1/2 ของพื้นที่บริเวณกาบใบและมีการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงที่บริเวณแผ่นใบ

7 = มีแผลมากกว่า 3/4 ของพื้นที่บริเวณกาบใบและมีการติดเชื้อที่รุนแรงที่บริเวณแผ่นใบ

9 = มีแผลลุกลามไปถึงยอดของหน่อและมีการติดเชื้อที่รุนแรงทุกใบ

$$\text{ความรุนแรงของโรค(\%)} = \frac{\sum (\text{จำนวนพืชในที่อยู่ในแต่ละดัชนี} \times \text{ดัชนี})}{(\text{จำนวนพืชทั้งหมด} \times \text{ดัชนีความรุนแรงสูงสุด})} \times 100$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการป้องกันโรค (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคชุดทดสอบ}}{\text{ความรุนแรงของโรคชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.12.1 ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือก

เพื่อประกอบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ (ดรุณี จิวเจริญ, 2555) งานวิจัยนี้ได้ทดสอบสมบัติทางสรีรวิทยา และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือก โดยนำแบคทีเรียจากน้ำทะเลเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อโคลนนี้เลี้ยงลงในอาหารต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมีโดยอ้างอิงวิธีจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) ซึ่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทดสอบ ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลสและออกซิเดส, ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ (Carbohydrate fermentation) ได้แก่ กลูโคส ซูโครส มอลโตส และแลคโตส, ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility), ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis), ความสามารถในการย่อยโปรตีน (casein hydrolysis), ความสามารถในการย่อยเซลลูโลส (cellulose hydrolysis), ความสามารถในการใช้ซิเตรต (citrate utilization), การสร้างอินโดล, และการรีดิวส์ไนเตรต

3.12.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.12.2.1 การติดสีแกรม (Gram's stain)

3.12.2.2 การสร้างเอนโดสปอร์โดยการย้อมสีเอนโดสปอร์ (endospore stain)

3.12.3 ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Azospirillum* sp.

3.12.3.1 เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

เลี้ยง *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารละลาย DNAzol[®] Reagent (Invitrogen) 50 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครพิพพ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อเชื้อโคลนนี้เดี่ยวของแบคทีเรียประมาณ 10 มิลลิกรัม แล้วจุ่มลงในสารละลาย DNAzol[®] Reagent ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสาร (vortex mixer) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันต่อไป

3.12.3.2 เตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยใช้ส่วนผสมสำเร็จรูป GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) โดยเติมสารละลายต่างๆ ตามลำดับ ลงในหลอดไมโครพิพพ์ ดังนี้

| | | |
|--------------------------------|------|-----------|
| Master mixed 2X | 25.0 | ไมโครลิตร |
| ฟอร์เวิร์ดไพเมอร์ (10 μ M) | 5.0 | ไมโครลิตร |
| รีเวิร์สไพเมอร์ (10 μ M) | 5.0 | ไมโครลิตร |
| ดีเอ็นเอแม่แบบ | 5.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 10.0 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 50.0 | ไมโครลิตร |

สำหรับปฏิกิริยานี้ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพเมอร์ที่ใช้สำหรับ *Azospirillum* sp. คือ 27F และ 1512R ตามลำดับ สารที่ผสมแล้วต้องอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และผสมให้เข้ากันเบาๆโดยไม่ให้มีฟองอากาศด้วยเครื่องปั่นผสมสาร แล้วนำหลอดไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปรับอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนด ดังนี้

| | | | |
|----------------------|---------------------|------------------|----------|
| initial denaturation | ที่ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที | } 30 รอบ |
| denaturation | ที่ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| annealing | ที่ 58 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| extention | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 2 นาที | |
| final extention | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที | |

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ที่ต้องการเป็นจำนวนมาก และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสต่อไป

3.12.3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอะกาโรส 1 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 3-4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วอุ่นเพื่อให้เจลละลายจนหมด เทลงถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอให้เจลแข็ง จากนั้นนำเจลที่แข็งแล้วใส่ลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน(1 kb ladder) ที่ผสมกับ 6X loading dye (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) โดยปรับความเข้มข้นสุดท้ายให้เป็น 1X (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) แล้วไหลลงลงในช่องใส่ตัวอย่าง เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีของบรอมฟินอลบูลเคลือบลงมาถึงปลายสุดของอะกาโรสเจล นำเจลออกจาก

แชมเบอร์แล้วนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกโดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation โปรแกรม Quantity one เวอร์ชัน 4.4.1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.12.3.4 ทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S rDNA จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (Thermo Scientific GeneJET PCR purification kit) โดยเติมบัฟเฟอร์ที่เป็นตัวจับ (binding buffer) ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสุทธิของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายไปใส่ใน Geneaid column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ที่เป็นตัวล้าง (wash buffer) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที และเทส่วนน้ำใส่ทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครพิพพ์หลอดใหม่ เติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสลงไปปริมาตร 50 ไมโครลิตรตรงกลางคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.12.3.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของแบคทีเรีย

นำสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วในข้อ 3.12.3.4 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1512R นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit และโปรแกรม Blastn แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีดังต่อไปนี้

3.13.1 สถิติพรรณนา (descriptive statistics) ในการคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดลองแต่ละขั้นตอน

3.13.2 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (covarience) โดยใช้สถิติแบบทางเดียว (one way ANOVA) ในการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ DMRT (Duncan's New Mutiple Rang Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22

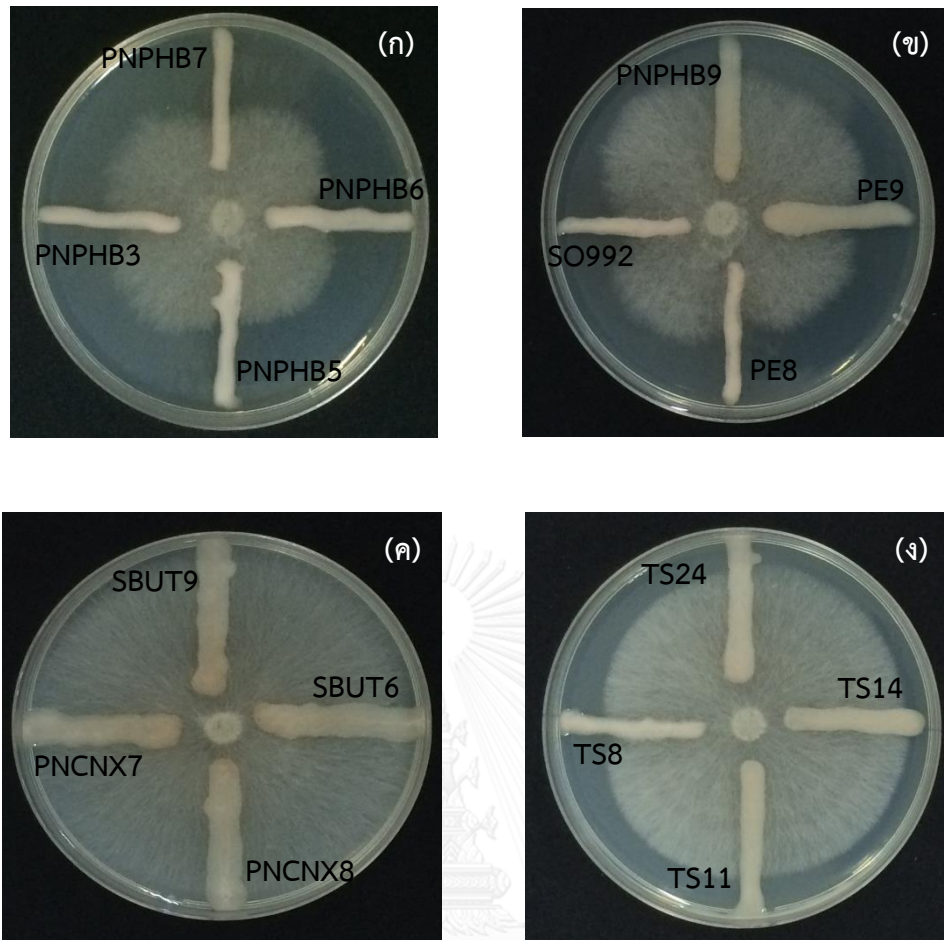
บทที่ 4

ผลการทดลอง

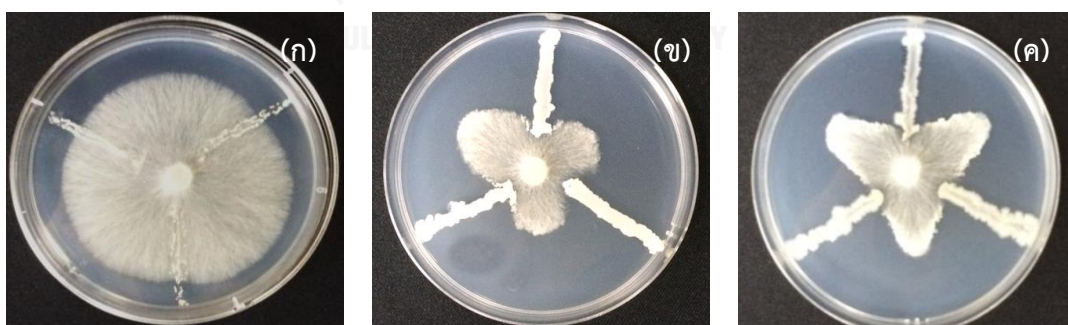
4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช *R. solani* ของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

4.1.1 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยการเลี้ยงร่วมกัน (dual culture)

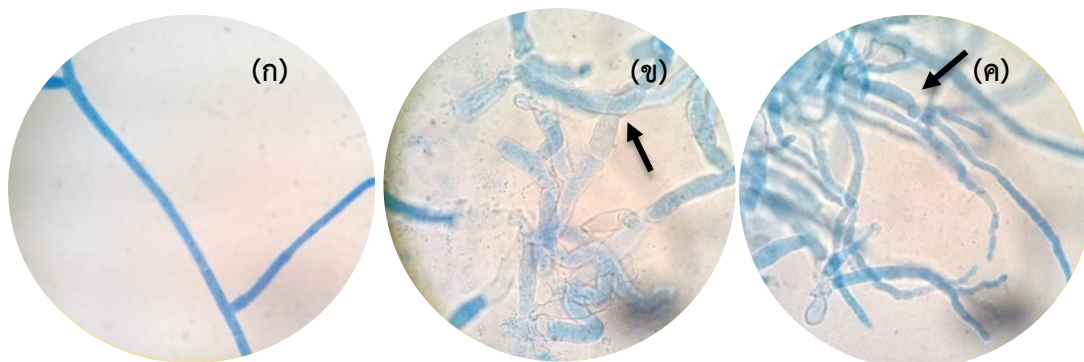
การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช *R. solani* ด้วยเทคนิคการเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับรา โดยขีดแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ และใช้คอร์กบอเรียอร์ที่ปราศจากเชื้อเจาะราก่อโรคพืชที่ต้องการทดสอบ แล้วนำมาวางที่กึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ขีดแบคทีเรียไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน สังเกตความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคจากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต พบว่า *Azospirillum* sp. ทั้ง 16 ไอโซเลต (รูปที่ 4.1 ก.-ง.) และแบคทีเรียจากน้ำทะเล 1 ไอโซเลต คือ TU13-9 (รูปที่ 4.2 ก.) ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *R. solani* ซึ่งสังเกตได้จากรา *R. solani* สามารถเจริญที่บนแบคทีเรียที่ขีดไว้โดยไม่มีโซนยับยั้งเกิดขึ้น แบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และ TD12-11 มีความสามารถในการยับยั้ง *R. solani* ได้ดังรูปที่ 4.2 (ข. และ ค.) โดยสังเกตจากโซนยับยั้งที่ชัดเจน เมื่อนำชิ้นส่วนของ *R. solani* ชุดควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับแบคทีเรียมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่า ราสามารถสร้างเส้นใยที่สมบูรณ์ และมีการแตกแขนงได้ปกติ (รูปที่ 4.3 ก.) ขณะที่เส้นใยของราที่เจริญร่วมกับแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นั้น เส้นใยของ *R. solani* บริเวณที่มีการสัมผัสกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลต TW1-1N9 และ TD12-11 มีการเจริญและการแตกแขนงที่ผิดปกติ มีการบวมพองของเส้นใย และมีการสลายของเส้นใยบางส่วนด้วย (รูปที่ 4.3 ข. และ ค.) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลต TW1-1N9 และ TD12-11 ที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่เห็นได้ชัดเจนเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.1: การไม่สามารถยับยั้ง *R. solani* ของ *Azospirillum* sp. ไอโซเลตต่างๆ (ก.-ง.)



รูปที่ 4.2: การยับยั้งรา *R. solani* ของแบคทีเรียจากน้ำทะเล (ก) ไอโซเลต TU13-9, (ข) ไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) ไอโซเลต TD12-11



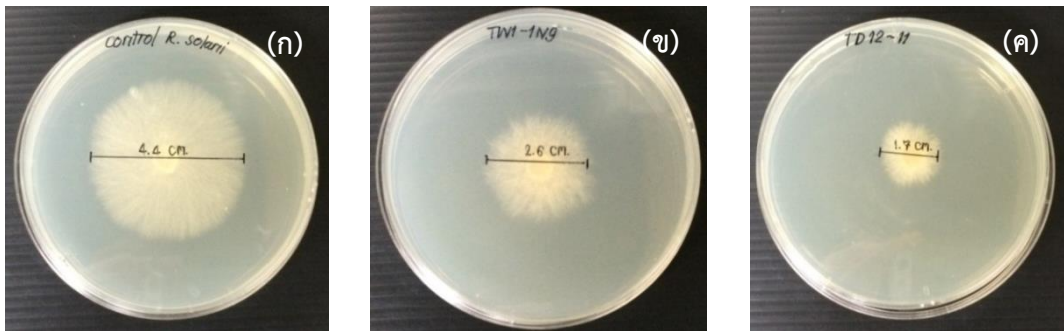
รูปที่ 4.3: การเจริญของ *R. solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า ลูกศรในแต่ละรูปแสดงผลการแตกแขนงที่ผิดปกติ และการบวมพองของเส้นใย (ก) ชุดควบคุมที่ไม่ถูกเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย, (ข) เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต TD12-11

4.1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย

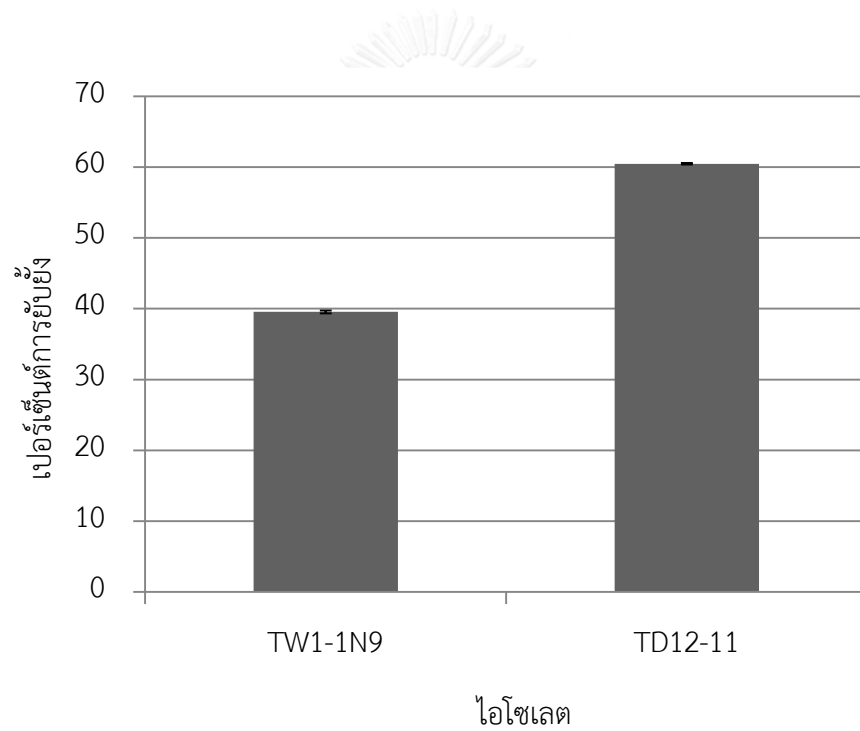
เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลต TW1-1N9 และ TD12-11 ในการยับยั้ง *R. solani* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์นั้น ได้เลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน แยกส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อออกมารอง โดยกรองน้ำเลี้ยงเชื้อผ่าน Millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และผสมน้ำเลี้ยงเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XPDA ในอัตราส่วน 1:1 สำหรับชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ผสมแทนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวางขึ้นวุ้นที่มีราก่อโรคพืช *R. solani* ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชกับชุดควบคุม แล้ววัดการเจริญของราก่อโรคพืชโดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญ จากการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดการทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

ผลการทดลองพบว่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำเลี้ยงเชื้อดังรูปที่ 4.4 (ก.) แล้ว น้ำเลี้ยงเชื้อของทั้งไอโซเลต TW1-1N9 และ TD12-11 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. solani* ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ข. และ ค.) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต TD12-11 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคิดเป็น $60.45 \pm 0.17\%$ ซึ่งมากกว่าไอโซเลต TW1-1N9 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคิดเป็น $39.55 \pm 0.11\%$ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



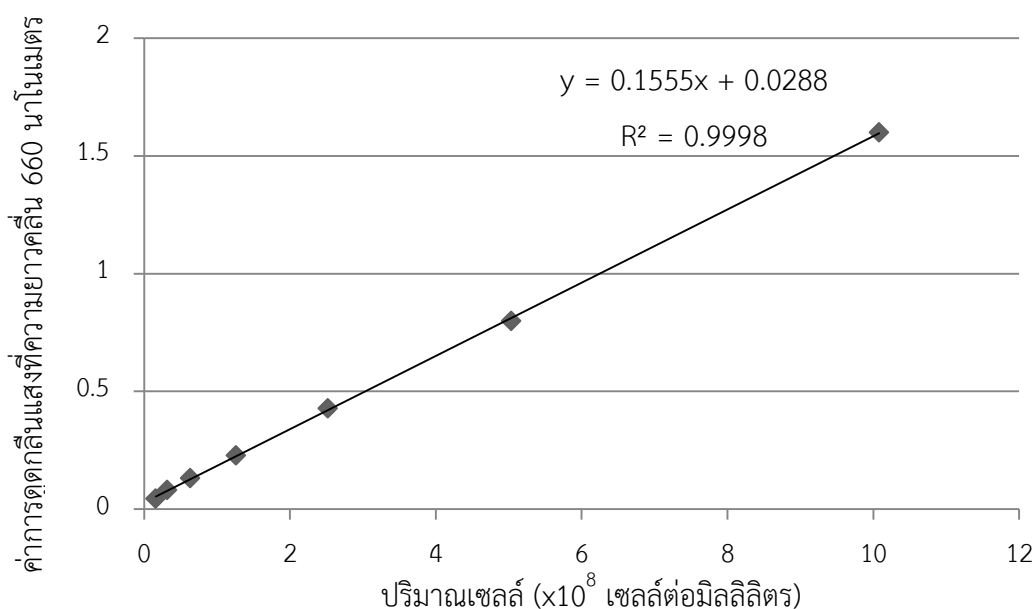
รูปที่ 4.4: (ก) เพลทควบคุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB, (ข) เพลทที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต TW1-1N9 และ (ค) เพลทที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต TD12-11



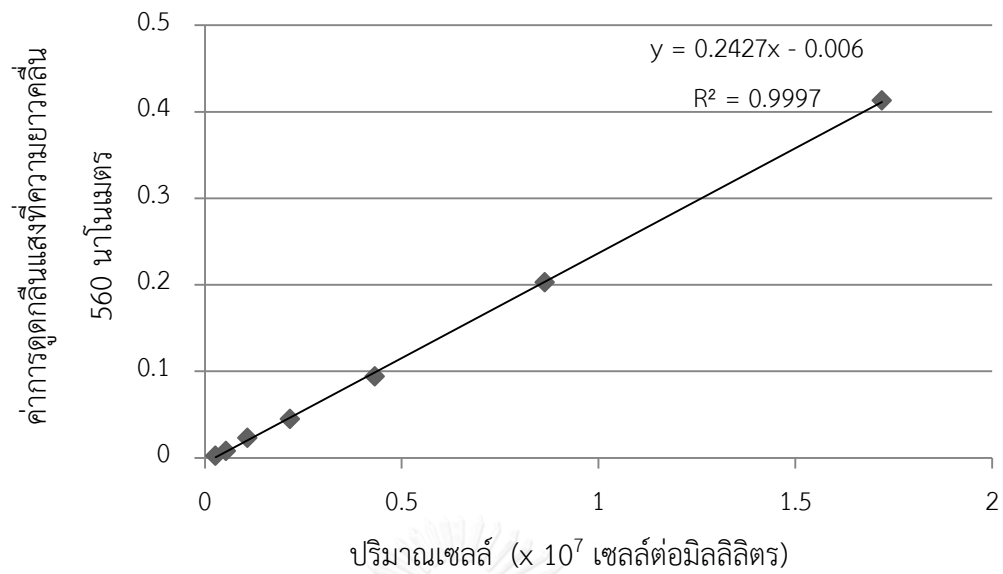
รูปที่ 4.5: เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *R. solani* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย TW1-1N9 และ TD12-11

4.2 ผลการกำหนดปริมาณเชื้อโดยการทำการภาพมาตรฐาน

จากการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเพื่อกำหนดปริมาณเชื้อพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.5-1.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 สำหรับ *Azospirillum* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปสูตร NFb แต่ละไอโซเลต ค่าที่ได้ของแต่ละเชื้อมีความแปรผันอย่างมาก จึงกำหนดปริมาณเชื้อได้ในช่วงกว้างๆ โดยการกำหนดเวลาในการเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือ เลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์เป็นเวลา 5 วัน ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2-0.5 ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.6: แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) กับปริมาณเซลล์แบคทีเรียจากน้ำทะเล ($\times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

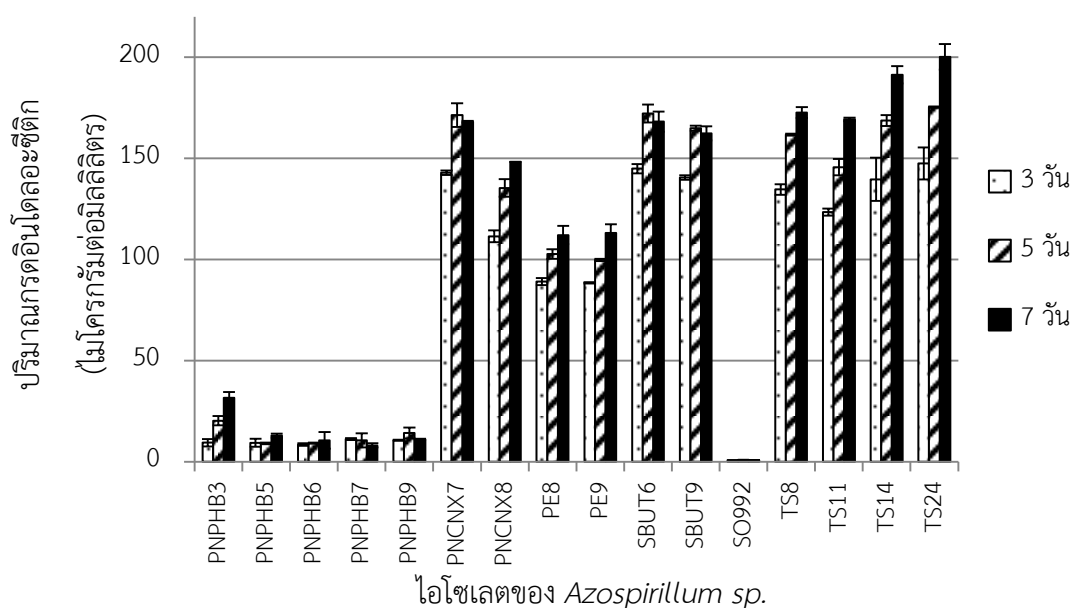


รูปที่ 4.7: แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (OD_{560}) กับ ปริมาณเซลล์ *Azospirillum* sp. ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูป สูตร NFb เป็นเวลา 5 วัน

4.3 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

4.3.1 ความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

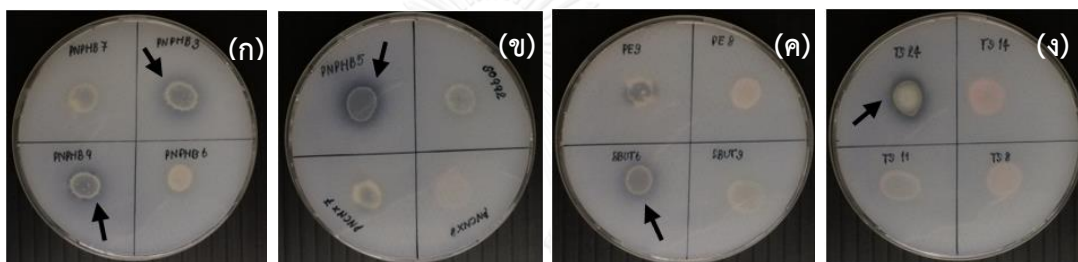
ทดสอบความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งเป็นหนึ่งในฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน ตามวิธีของ Asghar และคณะ (2002) ที่ปรับปรุงตามวิธีของ Roesch และคณะ (2007) โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียจากน้ำทะเลในวันที่ 1-3 และเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Azospirillum* sp. ในวันที่ 3, 5 และ 7 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาทดสอบการผลิตออกซินโดยการวัดปริมาณ IAA หลังการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski colouring reagent และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณการผลิต IAA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ที่ความเข้มข้นในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียจากน้ำทะเลไม่มีการผลิต IAA และ *Azospirillum* sp. จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ PNCNX7, PNCNX8, PE8, PE9, SBUT6, SBUT9, TS8, TS11, TS14 และ TS24 มีความสามารถในการผลิต IAA อยู่ในช่วง 112.10-200.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ดังรูปที่ 4.6 โดยไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในวันที่ 7 คือ TS24, TS14 และ TS8 คิดเป็น 200.19, 191.33 และ 172.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต SO992, PNPBH3, PNPBH5, PNPBH6, PNPBH7 และ PNPBH9 มีการผลิต IAA ในปริมาณต่ำมากอยู่ในช่วง 0.70-31.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.8)



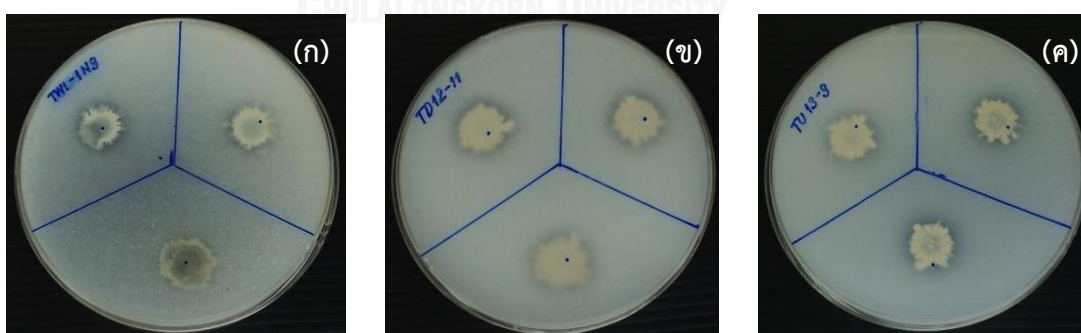
รูปที่ 4.8: แผนภูมิแสดงความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติกของ *Azospirillum* sp. ที่เวลา 3, 5 และ 7 วัน

4.3.2 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยนำ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารแข็ง NBRIP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วสังเกตการเกิดวงใสรอบๆโคโลนีที่เกิดขึ้นจากการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า *Azospirillum* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ PNPB3, PNPB5, PNPB9, SBUT6 และ TS24 สามารถละลายฟอสเฟตได้ โดยใช้เวลาประมาณ 20 วัน ดังรูปที่ 4.9 และแบคทีเรียจากน้ำทะเลมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ทั้ง 3 ไอโซเลตคือ TW1-1N9, TD12-11 และ TU13-9 โดยใช้เวลาประมาณ 14 วันดังรูปที่ 4.10



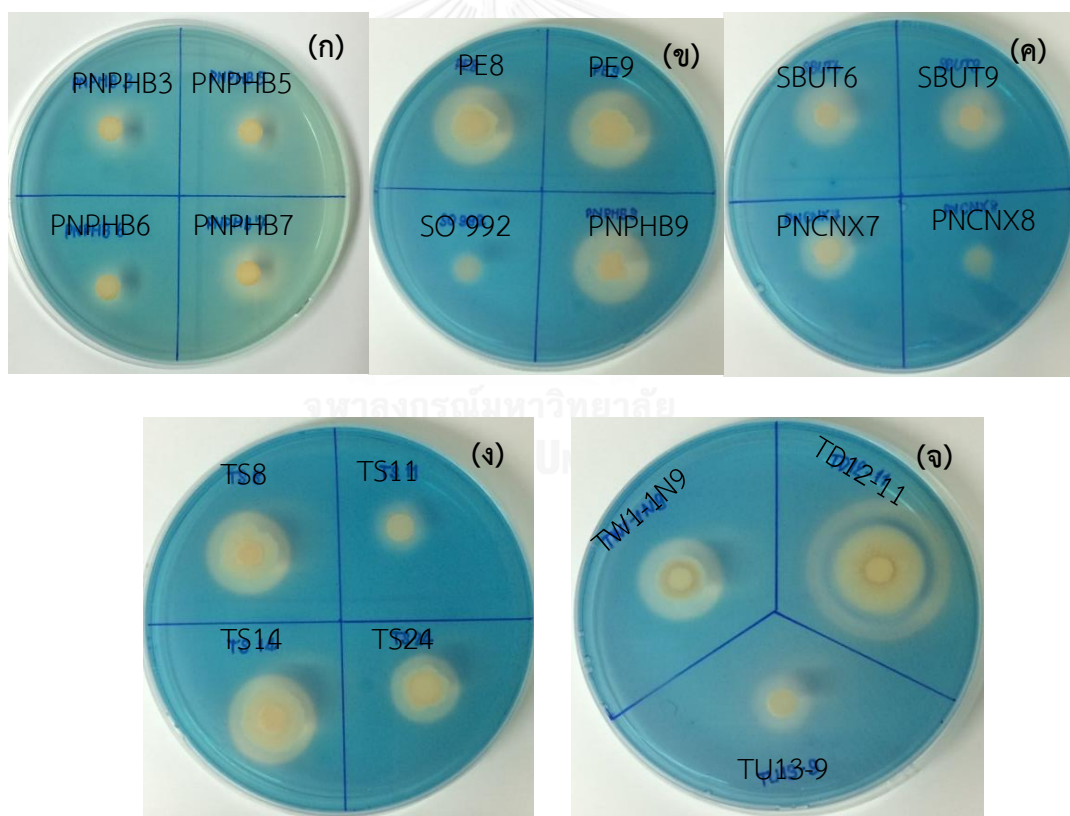
รูปที่ 4.9: ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *Azospirillum* sp. ไอโซเลตต่างๆบนอาหารแข็ง NBRIP ที่เวลา 20 วัน ลูกศรในแต่ละรูปแสดงผลจากไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ (ก) PNPB3 และ PNPB9, (ข) PNPB5, (ค) SBUT6 และ (ง) TS24



รูปที่ 4.10: ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลตต่างๆบนอาหารแข็ง NBRIP ที่เวลา 14 วัน (ก) TW1-1N9, (ข) TD12-11 และ (ค) TU13-9

4.3.3 ความสามารถในการผลิตสารไซเดอโรพอร์ของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

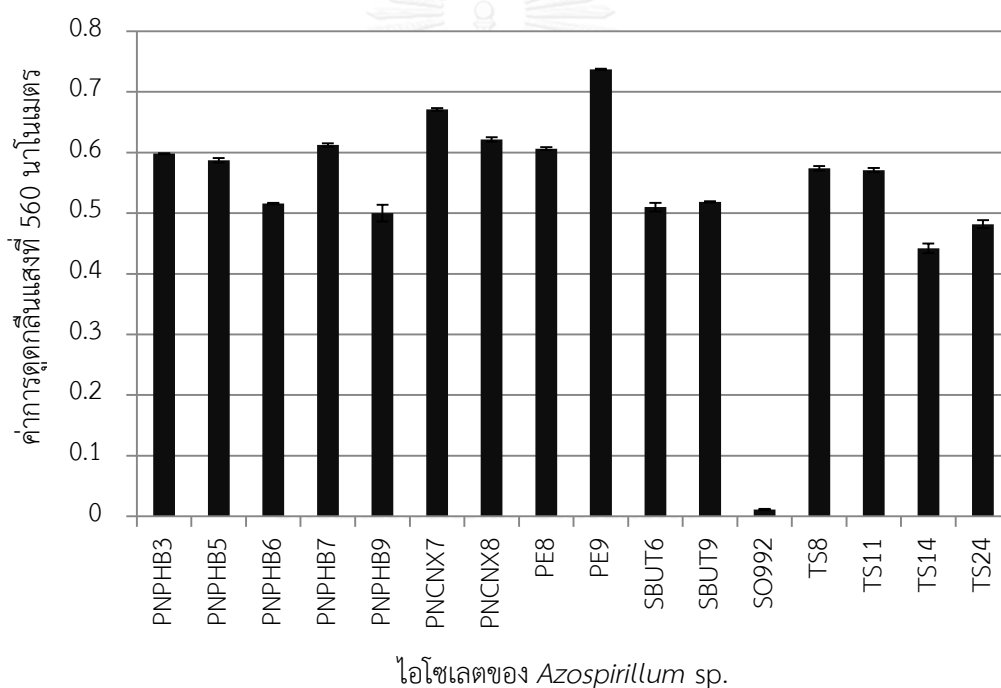
ทดสอบความสามารถในการผลิตสารไซเดอโรพอร์ของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลโดยการหยดแบคทีเรียลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้ววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตรอบโคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งถ้าสามารถผลิตสารไซเดอโรพอร์ได้จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม ซึ่งเกิดจากไซเดอโรพอร์จับกับธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่ารอบโคโลนีของ *Azospirillum* sp. มีการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีส้มเหลืองเกือบทุกไอโซเลต เมื่อเวลาผ่านไป 14-21 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 (ก.-ง.) ยกเว้นไอโซเลต SO992 และ PNCNX8 ที่ไม่พบการผลิตไซเดอโรพอร์ ขณะที่แบคทีเรียจากน้ำทะเลสามารถเจริญและเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS ได้ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.11 (ค.)



รูปที่ 4.11: การผลิตไซเดอโรพอร์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome Azurol Sulphonate (CAS) (ก)–(ง) การผลิตไซเดอโรพอร์ของ *Azospirillum* sp. และ (จ) การผลิตไซเดอโรพอร์ของแบคทีเรียจากน้ำทะเล

4.3.4 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล

เพื่อศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลโดยการศึกษาการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนซึ่งเป็นการศึกษาทางอ้อม โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนและมีโบรโมไทมอลบลู ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จากนั้นเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ผลการทดลองพบว่า *Azospirillum* sp. เกือบทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลต SO992 สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนได้ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.44-0.74 ดังรูปที่ 4.12 ส่วนแบคทีเรียจากน้ำทะเลไม่สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนได้



รูปที่ 4.12: ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนของ *Azospirillum* sp. ที่เวลา 7 วัน

4.4 ผลการทดสอบการติดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว

เมื่อนำเมล็ดข้าวที่งอกรากแล้วมาใส่ *R. solani* แล้ววางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของต้นข้าวเมื่อเวลาผ่านไป 3, 7, 9 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่รา พบว่าต้นข้าวที่ใส่ *R. solani* มีอาการของโรคชัดเจนเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่รา อาการของโรคที่เกิดจาก *R. solani* คือ ต้นข้าวจะถูกปกคลุมด้วยเส้นใยของราที่บริเวณข้อต่อระหว่างกาบหุ้มยอดอ่อนกับใบเลี้ยง (mesocotyl) เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 7 วันจะพบแผลเป็นจุดกลมสีน้ำตาลอมเขียวที่บริเวณกาบใบ ต้นข้าวจะเริ่มแห้งและตายประมาณ 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13: การทดสอบการติดเชื้อราก่อโรคในต้นข้าว (ก) ต้นข้าวชุดควบคุมที่ไม่ใส่ราที่เวลา 14 วัน, (ข) ต้นข้าวที่ใส่ *R. solani* ที่เวลา 7 วัน และ (ค) ต้นข้าวที่ใส่ *R. solani* ที่เวลา 14 วัน

4.5 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อ ต้นข้าว

4.5.1 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของ *Azospirillum* sp. ต่อต้นข้าว

ศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของ *Azospirillum* sp. ในต้นข้าว โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุด คือ เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน, เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และเมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และมี *Azospirillum* sp. เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นข้าว ได้แก่ ความยาวราก, ความสูงของต้นข้าว, สีของใบ, น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 โดยลักษณะที่สังเกตได้ชัดเจนคือ อาการใบเหลืองของต้นข้าวซึ่งพบว่าต้นข้าวส่วนใหญ่ที่ใส่ *Azospirillum* sp. แทบไม่พบอาการใบเหลืองเนื่องจากการขาดธาตุไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.18 น้ำหนักแห้งของรากและความยาวรากของต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. พบว่า *Azospirillum* sp. ช่วยในเรื่องการเพิ่มการแตกแขนงของราก ดังแสดงในรูปที่ 4.12-4.16 และพบว่าต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNCNX7, PNCNX8, SBUT6, SBUT9, TS8, TS11, TS14 และ TS24 มีน้ำหนักแห้งและความสูงของต้นมากกว่าชุดควบคุมในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนและชุดควบคุมที่มีไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.18

ตารางที่ 4.1: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น, ความยาวของรากและต้น และระดับอาการใบเหลืองของต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไบโอสเลตต่างๆ ที่เวลา 14 วัน

| ต้นข้าว | น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม) | | ความยาว (มิลลิเมตร) | | ระดับอาการ ใบเหลือง* |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | ราก* | ต้น* | ราก* | ต้น* | |
| PNPHB3 | 11.86±0.55 ^{abcd} | 8.33±0.87 ^a | 63.67±8.02 ^{cdef} | 142.67±7.09 ^{ab} | 2.00 ^{bc} |
| PNPHB5 | 12.13±0.55 ^{abcde} | 9.07±0.92 ^{ab} | 67.67±3.77 ^{def} | 151.33±5.03 ^{bc} | 1.67±0.58 ^{abc} |
| PNPHB6 | 11.53±0.72 ^{abc} | 9.10±0.66 ^{ab} | 52.67±9.71 ^{abc} | 156.67±9.07 ^{bc} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| PNPHB7 | 10.43±1.21 ^a | 9.97±1.93 ^{abc} | 56.00±7.21 ^{bcd} | 152.33±8.74 ^{bc} | 2.33±0.58 ^{cd} |
| PNPHB9 | 12.87±1.17 ^{cde} | 8.60±0.56 ^{ab} | 56.00±7.94 ^{bcd} | 160.67±6.51 ^{cd} | 2.00 ^{bc} |
| PNCNX7 | 12.50±1.05 ^{bcde} | 12.67±1.65 ^{de} | 53.33±5.03 ^{abc} | 165.67±9.29 ^{cde} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| PNCNX8 | 14.00±1.18 ^e | 12.13±1.10 ^{cde} | 51.67±4.51 ^{abc} | 175.67±2.08 ^{ef} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| PE8 | 12.36±0.83 ^{bcde} | 9.63±1.42 ^{ab} | 70.67±13.20 ^f | 182.67±11.23 ^{fg} | 1.00 ^{ab} |
| PE9 | 12.80±1.28 ^{cde} | 9.77±0.70 ^{ab} | 51.33±5.51 ^{abc} | 176.33±4.93 ^{ef} | 0.67±0.58 ^a |
| SBUT6 | 13.10±1.66 ^{cde} | 13.00±0.44 ^{de} | 49.33±1.53 ^{ab} | 193.67±6.35 ^{gh} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| SBUT9 | 12.77±0.76 ^{cde} | 12.00±2.00 ^{cde} | 50.00±6.56 ^{ab} | 174.00±4.58 ^{def} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| TS8 | 11.47±0.47 ^{abc} | 10.80±1.73 ^{bcd} | 62.00±5.57 ^{bcdef} | 181.33±9.50 ^{fg} | 1.33±0.58 ^{abc} |
| TS11 | 13.97±0.66 ^e | 13.40±1.42 ^e | 67.00±4.36 ^{def} | 205.00±11.00 ^h | 1.67±0.58 ^{abc} |
| TS14 | 13.10±0.36 ^{cde} | 13.03±0.86 ^{de} | 53.33±5.03 ^{abc} | 207.00±12.00 ^h | 0.67±0.58 ^a |
| TS24 | 13.50±1.81 ^{de} | 12.43±0.90 ^{de} | 57.00±6.56 ^{bcde} | 206.33±7.77 ^h | 0.67±0.58 ^a |
| ชุดควบคุม | 10.63±0.51 ^{ab} | 8.63±0.55 ^{ab} | 40.67±7.10 ^a | 134.67±6.51 ^a | 3.00±1.00 ^d |
| ชุดควบคุม (มีไนโตรเจน) | 11.67±0.29 ^{abc} | 10.23±0.70 ^{abc} | 57.16±9.88 ^{ef} | 166.67±5.86 ^{cde} | 1.67±0.58 ^{abc} |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษ (a, b, ...) ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระดับอาการใบเหลือง; 0 = ไม่มีอาการใบเหลือง

1 = ใบเหลืองเฉพาะที่บริเวณปลายใบของต้นข้าว

2 = ใบเหลืองน้อยกว่า 1/2 ของใบข้าว

3 = ใบเหลืองมากกว่า 1/2 แต่น้อยกว่า 3/4 ของใบข้าว

4 = ใบเหลืองมากกว่า 3/4 ของใบข้าวหรือมีอาการใบเหลืองทั้งต้น



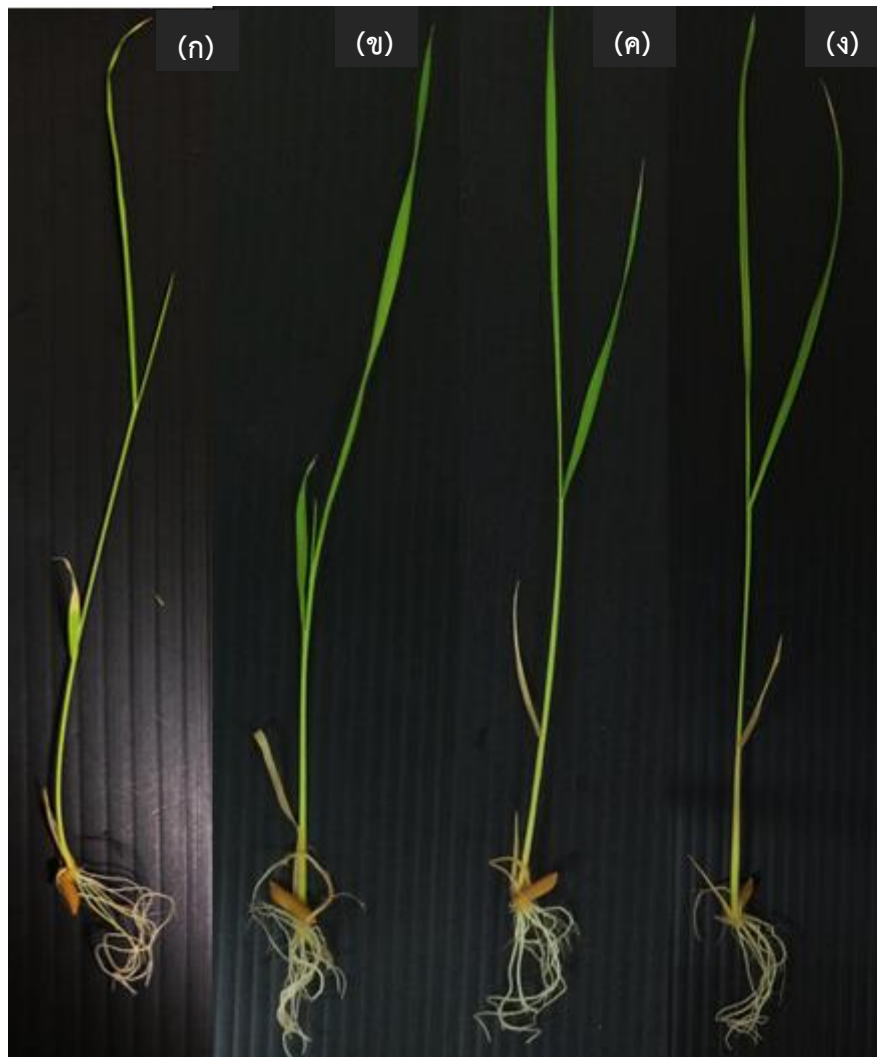
รูปที่ 4.14: ต้นข้าวที่ไม่มีการใส่ *Azospirillum* sp. (ก) ต้นข้าวในสารละลายอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และ (ข) ต้นข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน



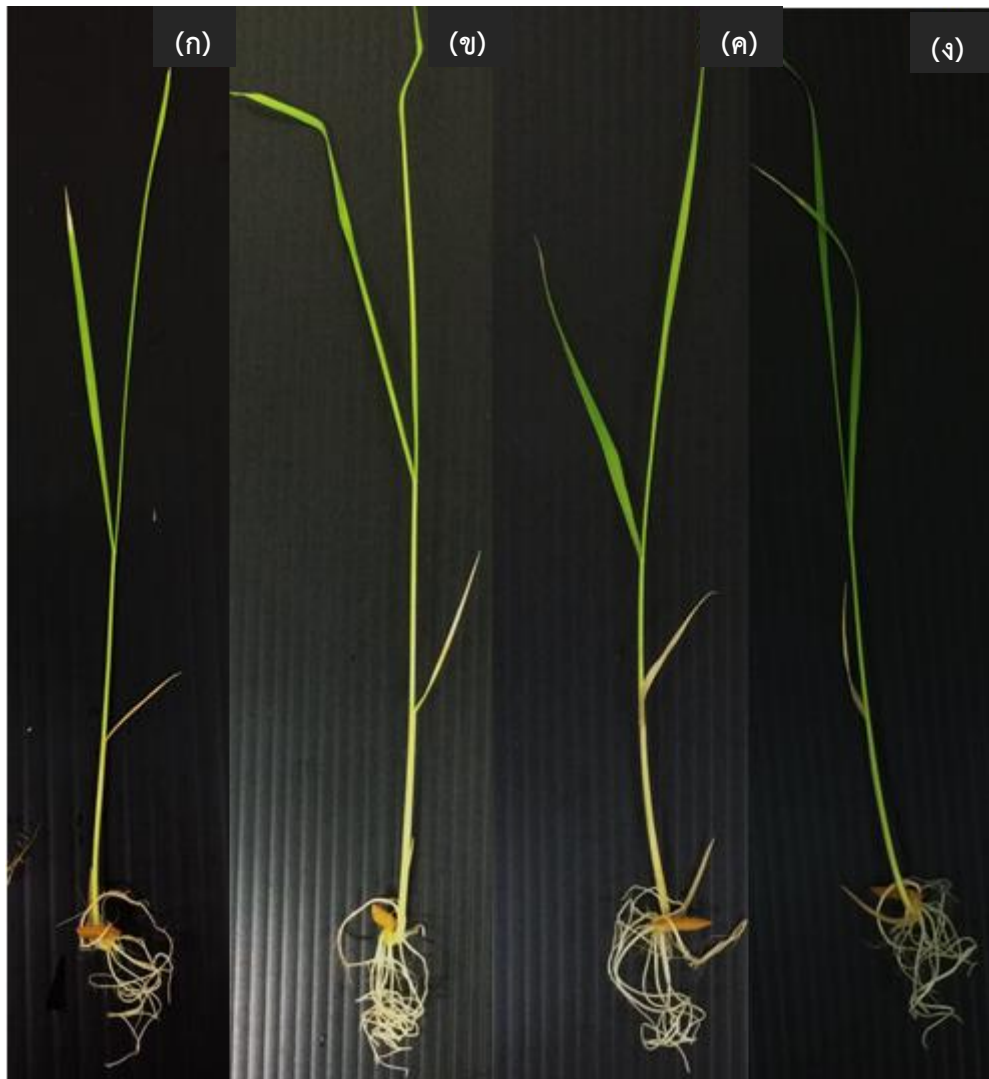
รูปที่ 4.15: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไบโอสเลต (ก) PNPB3, (ข) PNPB5 และ (ค) PNPB6



รูปที่ 4.16: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไบโชนีเลต (ก) PNPBH7, (ข) PNPBH9, (ค) PNCNX7 และ (ง) PNCNX8



รูปที่ 4.17: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต (ก) SBUT6, (ข) SBUT9, (ค) PE8 และ (ง) PE9



รูปที่ 4.18: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต (ก) TS8, (ข) TS11, (ค) TS14 และ (ง) TS24

4.5.2 ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อต้นข้าว

เพื่อศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อต้นข้าว โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุด คือ เมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน, และเมล็ดข้าวในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากน้ำทะเล เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นข้าว ได้แก่ ความยาวราก, ความสูงของต้นข้าว, สีของใบ, น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 โดยลักษณะที่สังเกตได้ชัดเจนคือ ความยาวรากของต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลตมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรีย โดยพบว่ารากมีลักษณะสั้นมาก แต่มีขนาดใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 4.19-4.22 (ก.) และเมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอจะเห็นการแตกแขนงมากกว่าต้นที่ไม่ใส่เชื้อดังแสดงในรูปที่ 4.19-4.22 (ข.) สำหรับน้ำหนักแห้งของรากพบว่า ต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลต TD12-11 และ TU13-9 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักแห้งของรากชุดควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรีย แต่ไอโซเลต TW1-1N9 มีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับน้ำหนักแห้งและความสูงของต้นข้าวพบว่า ไอโซเลต TW1-1N9 และ TU13-9 มีค่ามากกว่าต้นข้าวชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำหนักแห้งและความสูงของต้นข้าวจากไอโซเลต TD12-11 ไม่มีความแตกต่างกับต้นข้าวชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอาการใบเหลืองของต้นข้าวพบว่า ต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเลจะเกิดอาการใบเหลืองเนื่องจากการขาดธาตุไนโตรเจนที่บริเวณปลายใบของทุกไอโซเลตรวมถึงต้นที่เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 4.2: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น, ความยาวของรากและต้น และระดับอาการใบเหลืองของต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเลไฮโซเลตต่างๆ ที่เวลา 14 วัน

| ต้นข้าว | น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม) | | ความยาว (มิลลิเมตร) | | ระดับอาการ ใบเหลือง ^{ns} |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | ราก* | ต้น* | ราก* | ต้น* | |
| TW1-1N9 | 13.08±0.37 ^b | 15.64±2.29 ^b | 27.20±12.70 ^a | 236.40±43.67 ^b | 1.40±0.55 |
| TD12-11 | 12.16±0.53 ^a | 12.66±1.03 ^a | 33.00±6.52 ^a | 227.80±31.85 ^{ab} | 1.20±0.45 |
| TU13-9 | 12.56±0.42 ^{ab} | 15.12±1.16 ^b | 36.60±7.23 ^a | 248.00±15.12 ^b | 1.00±0.71 |
| ชุดควบคุม (มีไนโตรเจน) | 12.10±0.54 ^a | 12.26±2.22 ^a | 67.00±17.26 ^b | 193.40±14.21 ^a | 1.60±0.55 |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 5 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษ (a, b, ...) ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระดับอาการใบเหลือง; 0 = ไม่มีอาการใบเหลือง

1 = ใบเหลืองเฉพาะที่บริเวณปลายใบของต้นข้าว

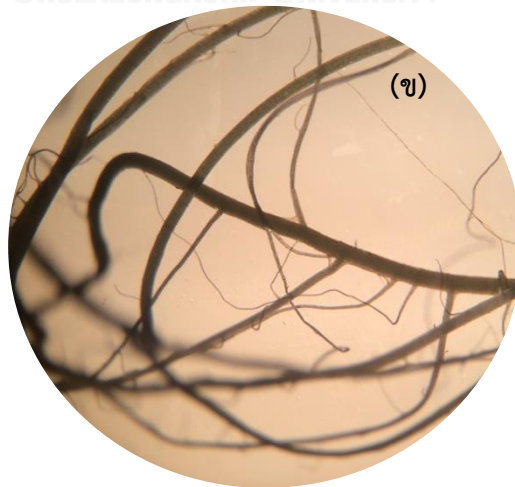
2 = ใบเหลืองน้อยกว่า 1/2 ของใบข้าว

3 = ใบเหลืองมากกว่า 1/2 แต่น้อยกว่า 3/4 ของใบข้าว

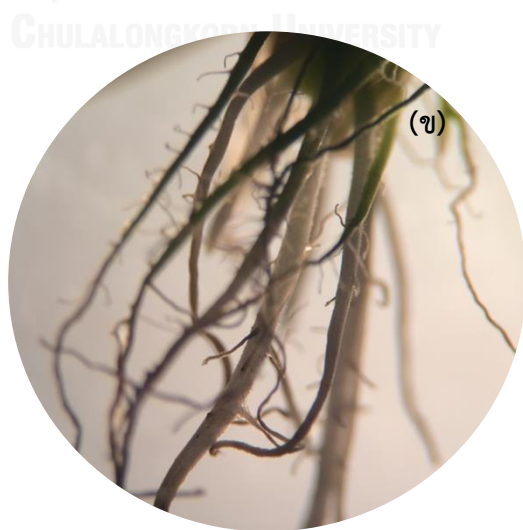
4 = ใบเหลืองมากกว่า 3/4 ของใบข้าวหรือมีอาการใบเหลืองทั้งต้น



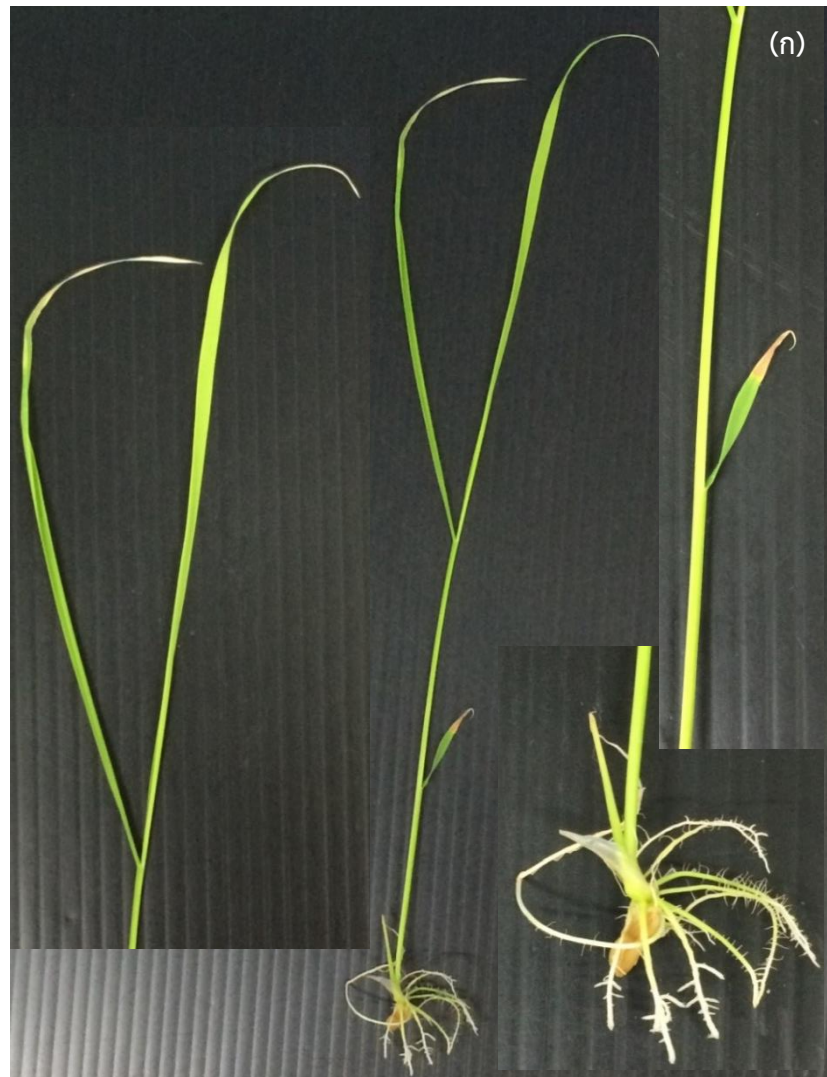
CHULALONGKORN UNIVERSITY



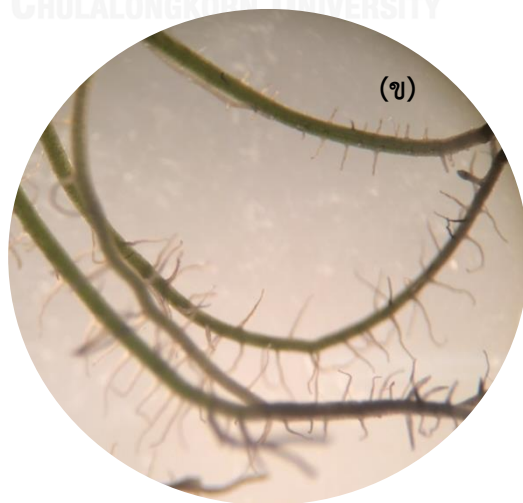
รูปที่ 4.19: ต้นข้าวในชุดควบคุมในสารละลายที่มีไนโตรเจน (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



รูปที่ 4.20: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TW1-1N9 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



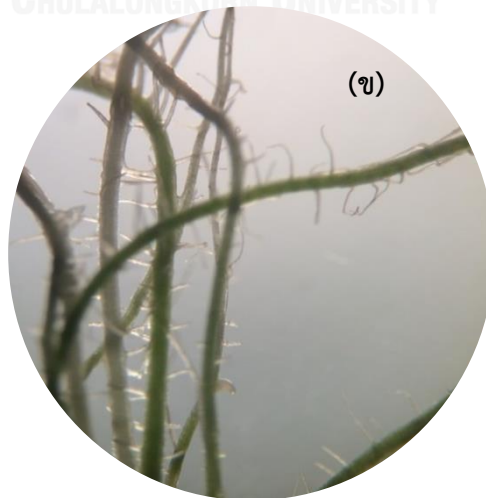
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.21: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TD12-11 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



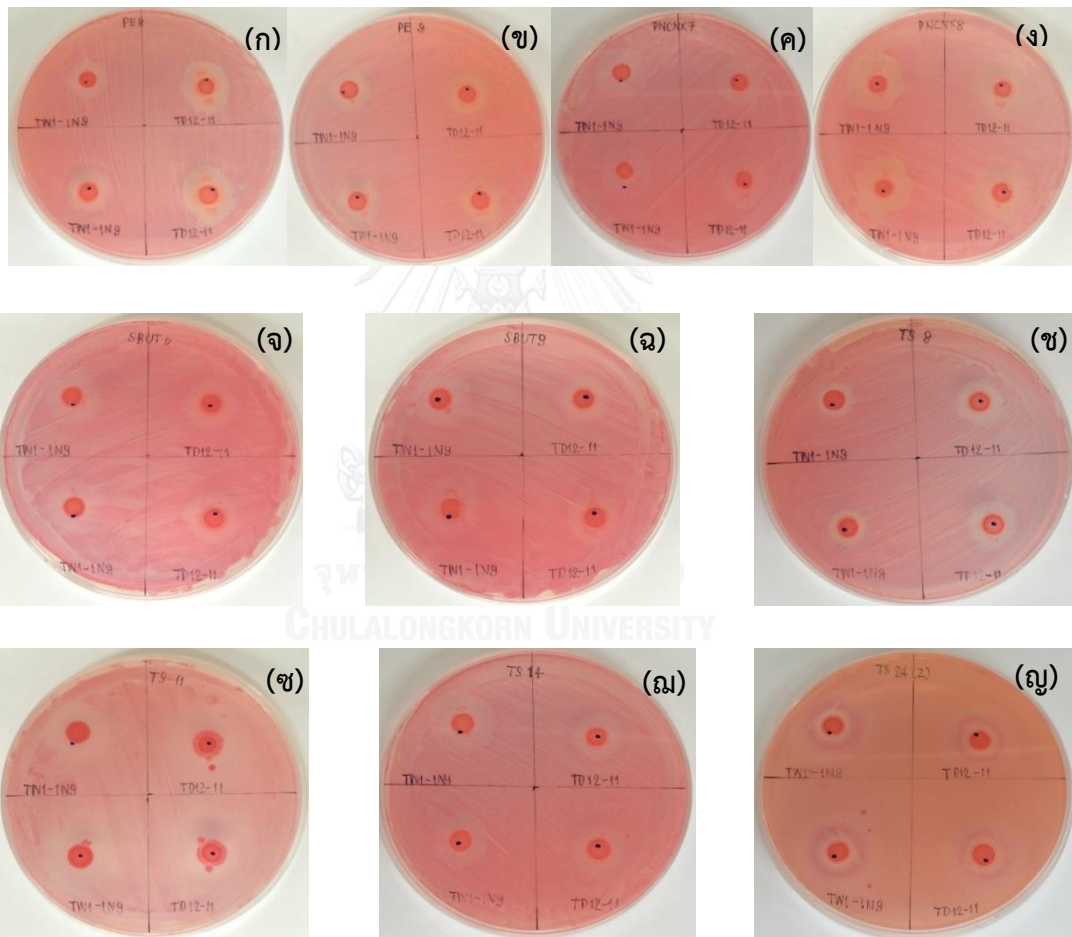
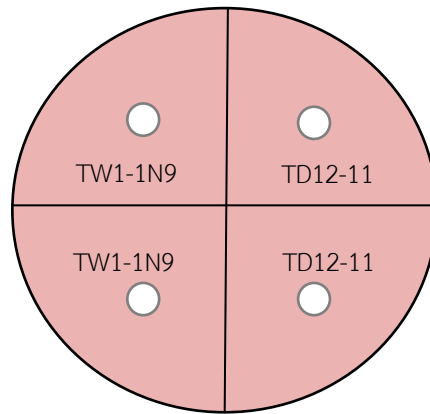
CHULALONGKORN UNIVERSITY



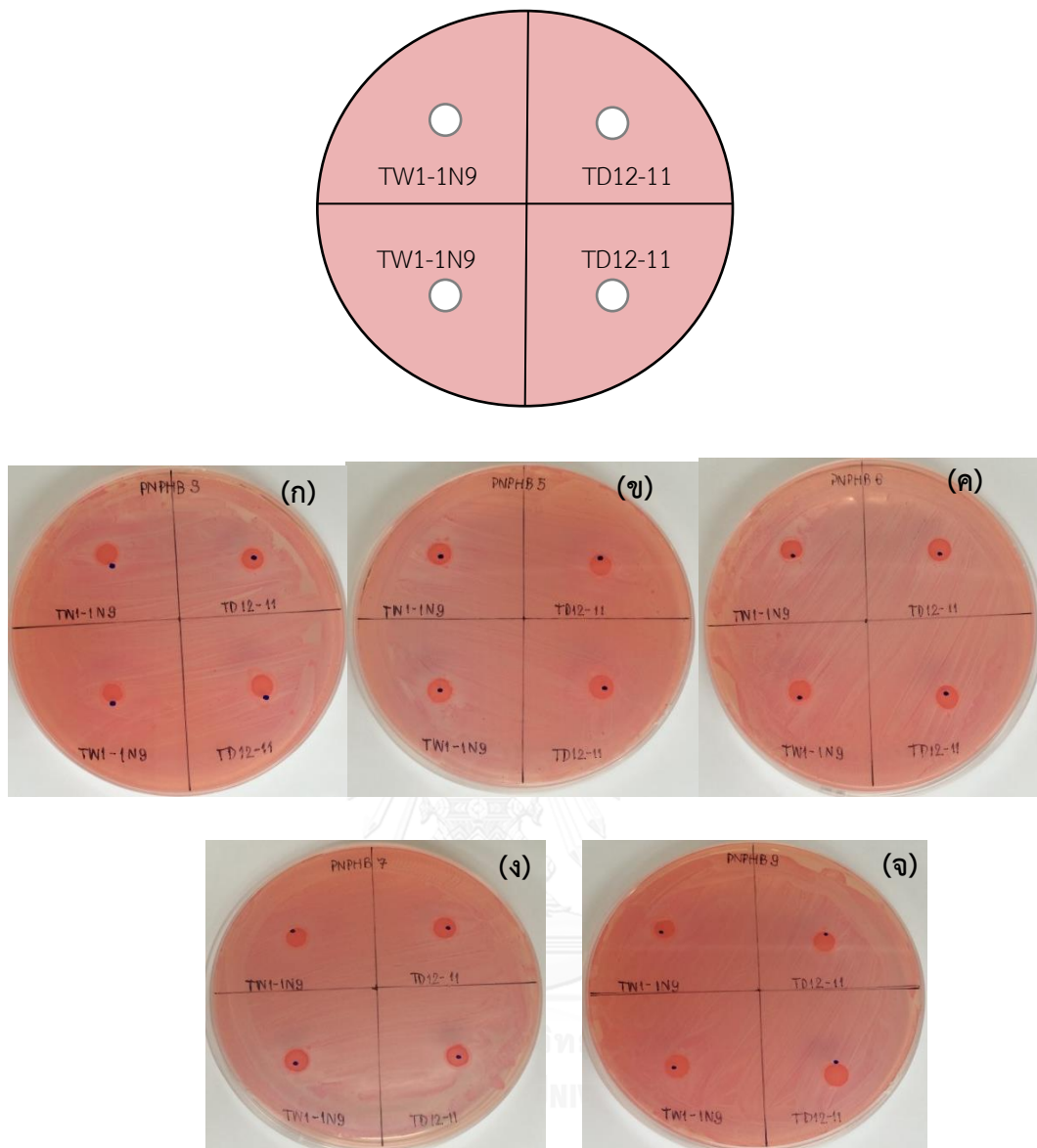
รูปที่ 4.22: ต้นข้าวในสารละลายที่มีไนโตรเจนที่ใส่เชื้อ TU13-9 (ก) ส่วนต่างๆของต้นข้าว และ (ข) การแตกแขนงของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4.6 ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต

เนื่องจาก *Azospirillum* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญให้กับต้นข้าว และแบคทีเรียจากน้ำทะเลมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. solani* ที่ก่อโรคใบไหม้ในต้นข้าว ดังนั้นการนำแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มมาใช้ประโยชน์กับพืชร่วมกันจึงต้องทดสอบการอยู่ร่วมกันได้ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium โดยนำ *Azospirillum* sp. ไอโซเลตต่างๆ มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium หลังจากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อจุ่มแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลตคือ TW1-1N9 หรือ TD12-11 ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB แล้วนำมาวางบนอาหารที่ได้เกลี่ย *Azospirillum* sp. ไว้ บนเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Azospirillum* sp. โดยแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต คือ TW1-1N9 และ TD12-11 ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณใสรอบกระดาษกรอง ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันพบว่า มี *Azospirillum* 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของ *Azospirillum* sp. ที่ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรียจากน้ำทะเลซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ร่วมกันได้ ได้แก่ ไอโซเลต PE8, PE9, PNCNX7, PNCNX8, SBUT6, SBUT9, TS8, TS11, TS14 และ TS24 ดังแสดงในรูปที่ 4.23 และกลุ่มของ *Azospirillum* sp. ที่สามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้โดยไม่พบบริเวณยับยั้งรอบกระดาษกรอง ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต PNPBH3, PNPBH5, PNPBH6, PNPBH7 และ PNPBH9 ดังแสดงในรูปที่ 4.24 ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะ *Azospirillum* sp. กลุ่มหลังที่อาศัยร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้เพื่อนำไปใช้ร่วมกันกับพืชเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งโรคที่เกิดในต้นข้าว



รูปที่ 4.23: การเป็นปฏิปักษ์ของ *Azospirillum* sp. บางไอโซเลตกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต คือ TW1-1N9 และ TD12-11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium (ก) PE8, (ข) PE9, (ค) PNCX7, (ง) PNCX8, (จ) SBUT6, (ฉ) SBUT9, (ช) TS8, (ซ) TS11, (ณ) TS14 และ (ญ) TS24



รูปที่ 4.24: การอยู่ร่วมกันระหว่าง *Azospirillum* sp. แต่ละไอโซเลตกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล 2 ไอโซเลต คือ TW1-1N9 และ TD12-11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium (ก) PNPBH3, (ข) PNPBH5, (ค) PNPBH6, (ง) PNPBH7 และ (จ) PNPBH9

ผลการทดสอบการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่า *Azospirillum* sp. ที่สามารถผลิตทุกปัจจัยที่ทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลต PNPBH3, PNPBH5, PNPBH9, SBUT6 และ TS24 ซึ่งไอโซเลต SBUT6 และ TS24 มีการส่งเสริมการเจริญในต้นข้าวที่ชัดเจน แต่ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรียจากน้ำทะเล ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะไอโซเลต PNPBH3, PNPBH5 และ PNPBH9 มาทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลต่อไป

ตารางที่ 4.3: ข้อมูลของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลแต่ละไอโซเลตในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว และการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด

| ไอโซเลต | การผลิต IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | การละลายฟอสเฟต | ไซเตโอโรฟอรั | การตรึงไนโตรเจน | การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว | การอยู่ร่วมกับ TW1-1N9 | การอยู่ร่วมกับ TD12-11 |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------|-----------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Azospirillum</i> sp. | | | | | | | |
| PNPHB3 | 31.72 | + | + | + | ✓ | ✓ | ✓ |
| PNPHB5 | 12.89 | + | + | + | ✓ | ✓ | ✓ |
| PNPHB6 | 10.50 | - | + | + | ✓ | ✓ | ✓ |
| PNPHB7 | 8.08 | - | + | + | ✓ | ✓ | ✓ |
| PNPHB9 | 11.06 | + | + | + | ✓ | ✓ | ✓ |

ตารางที่ 4.3: ข้อมูลของ *Azospirillum* sp. และแบบคที่เรียงจากน้ำหนักทะเลแต่และไอโซเลตในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว และการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ต่อ)

| ไอโซเลต | การผลิต IAA (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) | การละลาย ฟอสเฟต | การผลิต ไฮเดอโรฟอรั | การตรึงไนโตรเจน | การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว | การอยู่ร่วมกับ TW1-1N9 | การอยู่ร่วมกับ TD12-11 |
|---------|--------------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| PNCNX7 | 168.05 | - | + | + | ✓ | ✗ | ✗ |
| PNCNX8 | 148.27 | - | - | + | ✓ | ✗ | ✗ |
| PE8 | 112.10 | - | + | + | ✓ | ✗ | ✗ |
| PE9 | 113.14 | - | + | + | ✓ | ✗ | ✗ |
| SBUT6 | 168.16 | + | + | + | ✓ | ✗ | ✗ |
| SBUT9 | 162.37 | - | + | + | ✓ | ✗ | ✗ |

ตารางที่ 4.3: ข้อมูลของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลแต่ละไอโซเลตในการผลิตปุ๋ยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว และการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ต่อ)

| ไอโซเลต | การผลิต IAA (ไมโครกรัมต่อ มิลลิตร) | การละลาย ฟอสเฟต | ไซโตโครฟออร์ | การผลิต ไนโตรเจน | การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว | การอยู่ร่วมกับ TW1-1N9 | การอยู่ร่วมกับ TD12-11 |
|---------|------------------------------------|-----------------|--------------|------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| SO992 | 0.70 | - | + | - | x | x | x |
| TS8 | 172.64 | - | - | + | ✓ | x | x |
| TS11 | 169.26 | - | + | + | ✓ | x | x |
| TS14 | 191.33 | - | + | + | ✓ | x | x |
| TS24 | 200.19 | + | + | + | ✓ | x | x |

ตารางที่ 4.3: ข้อมูลของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลแต่ละไอโซเลตในการผลิตปัจจัยต่างๆที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว และการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ต่อ)

| ไอโซเลต | การผลิต IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | การละลายฟอสเฟต | ไซโตไคน์ | การตรึงไนโตรเจน | การส่งเสริมการเจริญในต้นข้าว |
|---------------------|-------------------------------------|----------------|----------|-----------------|------------------------------|
| แบคทีเรียจากน้ำทะเล | | | | | |
| TW1-1N9 | 0 | + | + | - | ✓ |
| TD12-11 | 0 | + | + | - | ✓ |
| TU13-9 | 0 | + | + | - | ✓ |

(+) = ให้ผลบวก, (-) = ให้ผลลบ, (✓) = ส่งเสริมการเจริญในต้นข้าวได้ และสามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้ในการทดสอบการอยู่ร่วมกัน และ (✗) = ไม่ส่งเสริมการเจริญในต้นข้าวได้ และไม่สามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้ในการทดสอบการอยู่ร่วมกัน

4.7 ผลการทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวที่เกิดจากรา

เพื่อศึกษาการป้องกันการเกิดโรคจาก *R. solani* ในต้นข้าวโดยใช้แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่เลี้ยงร่วมกับ *Azospirillum* sp. โดย *Azospirillum* sp. ที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้จะเป็กลุ่มที่สามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้ ซึ่งเลือกมา 3 ไอโซเลต ได้แก่ PNPBH3, PNPBH5 และ PNPBH9 เมื่อผ่านไป 1 วัน ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเล โดยติดเชื้อ *R. solani* ภายหลังจากการใส่เชื้อแบคทีเรีย 7 วันและเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บันทึกลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความยาวราก, ความสูงของต้นข้าว, สีของใบ, น้ำหนักแห้งของต้นข้าว และน้ำหนักแห้งของราก และประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคในข้าว โดยมีดัชนีกำหนดการประเมิน, การคำนวณความรุนแรงของโรคและประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ดังนี้

ดัชนีกำหนดการประเมินความรุนแรงของโรค

0 = ไม่มีอาการของโรค,

1 = มีแผลเล็กน้อยถึงต่ำกว่า 1/4 ของพื้นที่บริเวณกาบใบ

3 = มีแผลน้อยกว่า 1/2 ของพื้นที่บริเวณกาบใบ

5 = มีแผลมากกว่า 1/2 ของพื้นที่บริเวณกาบใบและมีการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงที่บริเวณแผ่นใบ

7 = มีแผลมากกว่า 3/4 ของพื้นที่บริเวณกาบใบและมีการติดเชื้อที่รุนแรงที่บริเวณแผ่นใบ

9 = มีแผลลุกลามไปถึงยอดของหน่อและมีการติดเชื้อที่รุนแรงทุกใบ

$$\text{ความรุนแรงของโรค(\%)} = \frac{\sum (\text{จำนวนพืชในที่อยู่ในแต่ละดัชนี} \times \text{ดัชนี})}{(\text{จำนวนพืชทั้งหมด} \times \text{ดัชนีความรุนแรงสูงสุด})} \times 100$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการป้องกันโรค (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคชุดทดสอบ}}{\text{ความรุนแรงของโรคชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

ผลการทดลองพบว่าต้นข้าวที่ใส่ทั้ง *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลสามารถช่วยยับยั้งอาการของโรคที่เกิดจาก *R. solani* ได้อย่างชัดเจน โดยค่าของน้ำหนักแห้งรากและต้น รวมถึงความยาวรากและต้นมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่เป็นโรค ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นข้าวมีความแข็งแรง และมีความทนทานต่อการติดเชื้อ *R. solani* ได้ ดังตารางที่ 4.4

อาการของโรคจาก *R. solani* ในต้นข้าวที่ติดราเพียงอย่างเดียวพบว่า มีอาการที่รุนแรงโดยมีแผลสีน้ำตาลตั้งแต่บริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อนลุกลามไปจนถึงแผ่นใบ ดังแสดงในรูปที่ 4.25 และ 4.26 สำหรับอาการของโรคในต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเลพบว่าต้นข้าวที่ใส่ PNPBH3+TW1-1N9, PNPBH5+TD12-11 และ PNPBH9+TD12-11 มีอาการของโรคที่บริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อนอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.27,4.30 และ 4.32 ต้นข้าวที่ใส่

PNPHB3+TD12-11 และ PNPHB5+TW1-1N9 มีอาการของโรคที่บริเวณข้อต่อขาหุ้มยอดอ่อนเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.28 และ 4.29 และต้นข้าวที่ใส่ PNPHB9+TW1-1N9 แทบไม่พบอาการของโรคจาก *R. solani* ดังแสดงในรูปที่ 4.31

สำหรับเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคจาก *R. solani* พบว่า ต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียจากน้ำทะเลร่วมกับ *Azospirillum* sp. มีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการติดเชื้อราเพียงอย่างเดียว โดยเปอร์เซ็นต์การป้องกันโรคจาก *R. solani* ของต้นข้าวที่ใส่เชื้อ PNPHB9+TW1-1N9, PNPHB5+TW1-1N9 และ PNPHB3+TD12-11 คิดเป็น 89.70%, 80.40% และ 79.41% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4: ข้อมูลน้ำหนักแห้งของรากและต้น และความยาวของรากและต้นของต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ร่วมกับแบคทีเรียจากน้ำทะเล และติดเชื้อ *R. solani* ที่เวลา 14 วัน

| ต้นข้าว+จุลินทรีย์ รูปแบบต่างๆ | น้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัม) | | ความยาว (มิลลิเมตร) | |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | ราก* | ต้น* | ราก* | ต้น* |
| ชุดควบคุม | 11.26±0.63 ^a | 8.50±2.01 ^a | 36.00±16.98 ^a | 137.50±23.70 ^a |
| PNPHB3+TW1-1N9+รา | 12.52±1.54 ^{abc} | 13.80±2.41 ^b | 45.80±14.51 ^{ab} | 175.30±25.14 ^b |
| PNPHB3+TD12-11+รา | 12.43±1.41 ^{abc} | 14.34±3.35 ^b | 35.70±10.10 ^a | 215.70±29.03 ^c |
| PNPHB5+TW1-1N9+รา | 12.83±1.54 ^{bc} | 14.59±2.87 ^b | 60.11±15.37 ^c | 214.44±29.65 ^c |
| PNPHB5+TD12-11+รา | 12.44±1.49 ^{abc} | 12.89±3.46 ^b | 32.60±10.31 ^a | 196.05±31.47 ^{bc} |
| PNPHB9+TW1-1N9+รา | 12.99±1.88 ^c | 15.02±3.23 ^b | 49.60±14.00 ^{bc} | 215.60±32.28 ^c |
| PNPHB9+TD12-11+รา | 11.49±1.09 ^{ab} | 12.10±2.52 ^b | 36.60±12.33 ^a | 202.90±31.93 ^{bc} |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 10 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

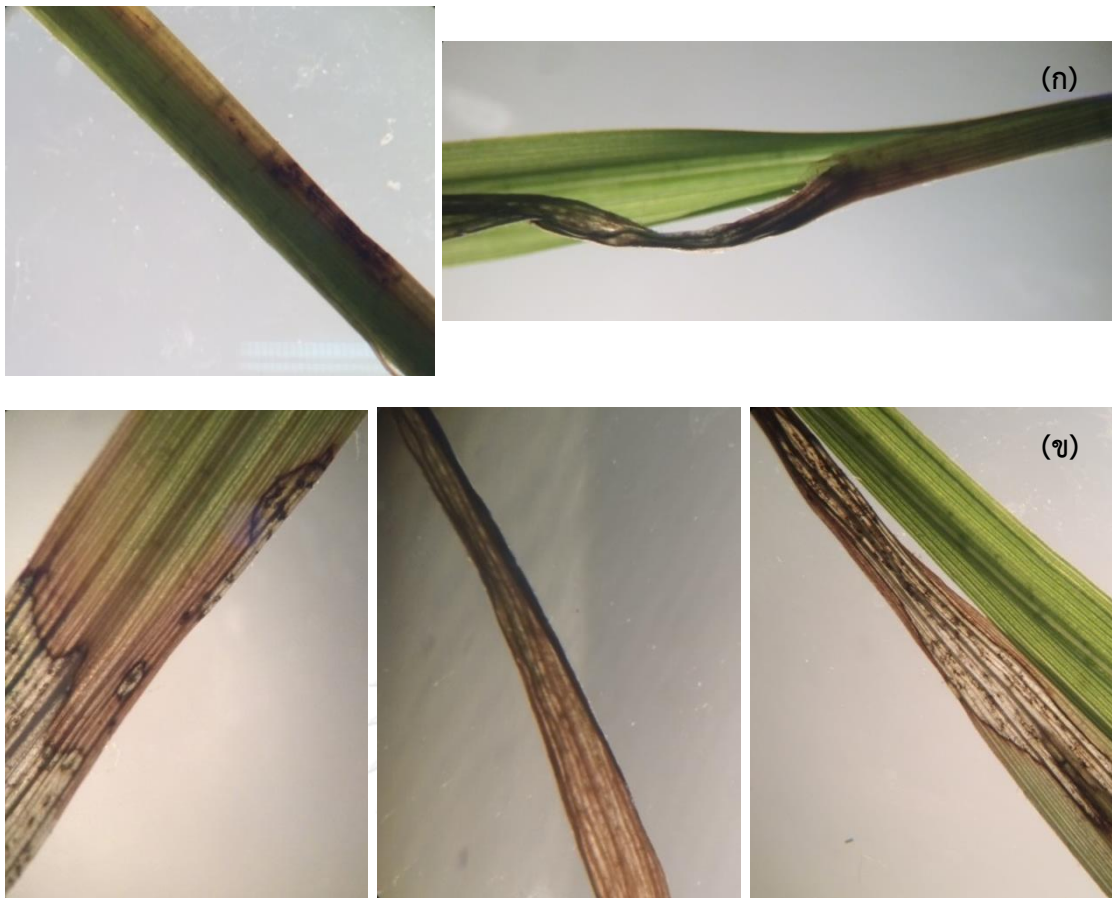
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษ (a, b, ...) ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.5: ระดับการเกิดโรคที่เกิดจาก *R. solani* เมื่อมี *Azospirillum* sp. กับแบคทีเรียจากน้ำทะเล ภายหลังติดเชื้อ *R. solani* 14 วัน

| ต้นข้าว+จุลินทรีย์รูปแบบ ต่างๆ | 14 วันหลังจากติดเชื้อรา | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| | ระดับอาการของโรคกาบ ใบแห้ง (%) | การป้องกันการเกิดโรค กาบใบแห้ง (%) |
| <i>R. solani</i> | 75.56 | |
| PNPHB3+TW1-1N9 | 24.44 | 67.65 |
| PNPHB3+TD12-11 | 15.56 | 79.41 |
| PNPHB5+TW1-1N9 | 14.81 | 80.40 |
| PNPHB5+TD12-11 | 17.78 | 76.47 |
| PNPHB9+TW1-1N9 | 7.78 | 89.70 |
| PNPHB9+TD12-11 | 25.56 | 66.17 |



รูปที่ 4.25: ต้นข้าวที่ใส่เฉพาะ *R. solani* เกิดโรคกาบใบแห้ง (ก) ผลที่บริเวณแผ่นใบ, (ข) ผลบริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อน และ (ค) ลักษณะอาการต้นข้าวที่ใส่ *R. solani*



รูปที่ 4.26: ผลของต้นข้าวที่ใส่เฉพาะรา *R. solani* เกิดโรคกาบใบแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ก) ผลที่ข้อและบริเวณข้อต่อกาบหุ้มยอดอ่อนของต้นข้าว และ (ข) ผลบริเวณแผ่นใบของต้นข้าว



รูปที่ 4.27: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPB3 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน



รูปที่ 4.28: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPHB3 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน



รูปที่ 4.29: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNP HB5 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน



รูปที่ 4.30: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPB5 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน



รูปที่ 4.31: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPBH9 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TW1-1N9 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน



รูปที่ 4.32: ต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPBH9 และแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลต TD12-11 และติดเชื้อราเมื่อผ่านไป 14 วัน

4.8 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

4.8.1 สมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเล

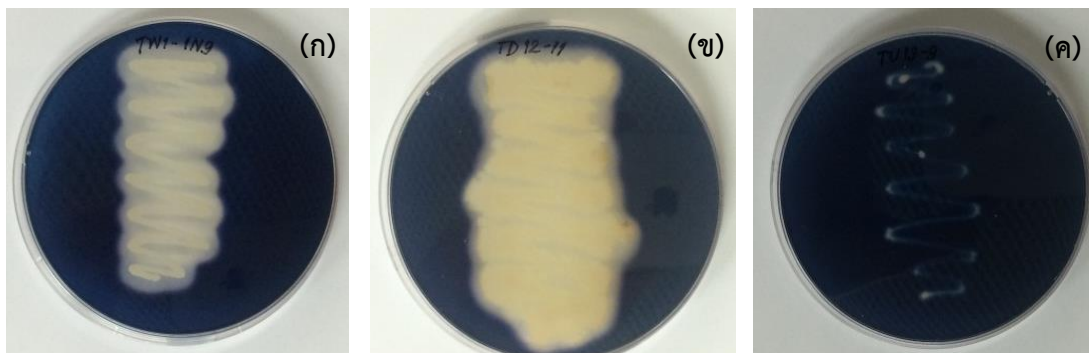
ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเลโดยวิธีที่อ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) โดยผลการทดสอบเป็นตามตารางที่ 4.6 จากผลการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำทะเล พบว่า แบคทีเรียจากน้ำทะเลสามารถหมักน้ำตาลชนิดต่างๆได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลมอลโทส โดยทำให้เกิดกรดเป็นผลิตภัณฑ์, สามารถเคลื่อนที่ได้จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยวิธีการหยด

เชื้อให้เกาะติดบนแผ่นสไลด์ (hanging drop), มีความสามารถรีดิวซ์ไนเตรต และมีการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ คาทาเลสเพื่อย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหายใจแบบใช้ออกซิเจน, อะไมเลสที่ย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาลต่างๆโดยเมื่อหยดไอโอดีนลงไปจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินในบริเวณที่มีการย่อยแป้ง ดังแสดงในรูป 4.33 และเคซีเนสที่ย่อยโปรตีนในน้ำนมที่มีเป็นสารคอลลอยด์ขนาดใหญ่ให้เปลี่ยนเป็นสารคริสทลลอยด์ขนาดเล็ก ลักษณะโปร่งแสง และไม่มีสี ดังแสดงในรูป 4.34

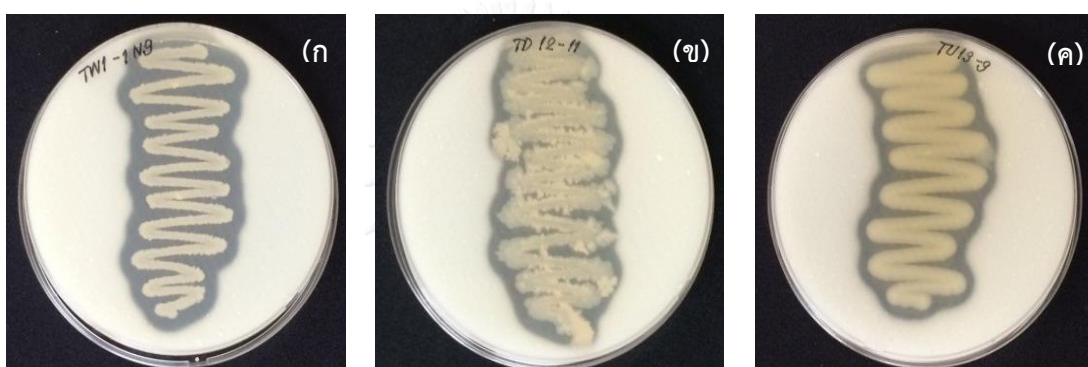
ตารางที่ 4.6: ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียจากน้ำทะเล

| การทดสอบทางชีวเคมี | ไอโซเลตของแบคทีเรียจากน้ำทะเล | | |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | TW1-1N9 | TD12-11 | TU13-9 |
| D-Glucose utilization | Acid, no gas | Acid, no gas | Acid, no gas |
| Sucrose utilization | Acid, no gas | Acid, no gas | - |
| Lactose utilization | - | - | - |
| Maltose utilization | Acid, no gas | - | Acid, no gas |
| Citrate utilization | - | - | - |
| Oxidase | - | - | - |
| Catalase | + | + | + |
| Indole production | - | - | - |
| Methyl Red (MR) | - | - | + |
| Voges-Proskauer (VP) | + | + | - |
| Motility | + | + | + |
| Nitrate reduction | + | + | + |
| Starch hydrolysis | + | + | - |
| Casein hydrolysis | + | + | + |
| Cellulose hydrolysis | - | - | - |

(+) = ให้ผลบวก, (-) = ให้ผลลบ



รูปที่ 4.33: การทดสอบย่อยแป้ง (ก) ไอโซเลต TW1-1N9 สามารถย่อยแป้งได้, (ข) ไอโซเลต TD12-11 สามารถย่อยแป้งได้ และ (ค) ไอโซเลต TU13-9 ไม่มีความสามารถย่อยแป้ง



รูปที่ 4.34: การทดสอบย่อยเคซีน (ก) ไอโซเลต TW1-1N9 สามารถย่อยเคซีนในนมได้, (ข) ไอโซเลต TD12-11 สามารถย่อยเคซีนในนมได้ และ (ค) ไอโซเลต TU13-9 สามารถย่อยเคซีนในนมได้


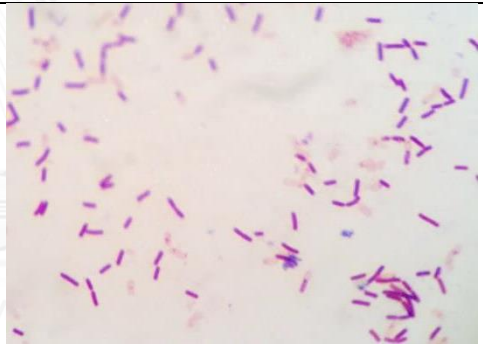
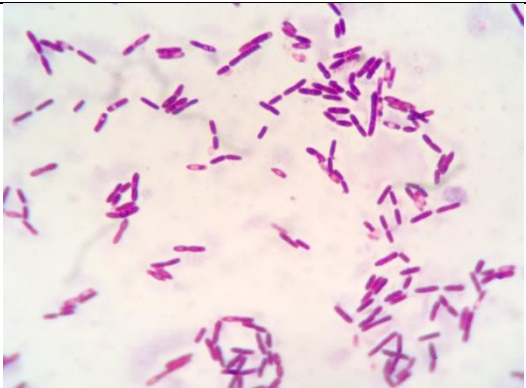
4.8.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

นำแบคทีเรียจากน้ำทะเล และ *Azospirillum* sp. มาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา โดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, การย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และการย้อมสีเอนโดสปอร์ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากน้ำทะเล โดยการเลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทะเลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าลักษณะโคโลนีของไอโซเลต TW1-1N9 มีรูปร่างไม่แน่นอน สีขาวทึบแสง ขอบหยัก ผิวหน้าแบน ผิวแห้ง ไอโซเลต TD12-11 มีรูปร่างกลมกลม สีขาวครีมทึบแสง ขอบมีการแผ่เป็นเส้นใย ผิวหน้านูน ผิวมัน ส่วนไอโซเลต TU13-9 มีรูปร่างกลม สีขาวทึบแสง ขอบหยัก ผิวหน้านูน ผิวมัน การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียจากน้ำทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการย้อมสีแกรมพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งและมีการจัดเรียงตัวต่างกัน และการย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลตมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ดัง

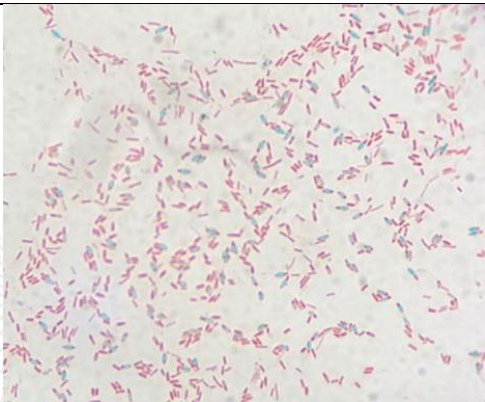
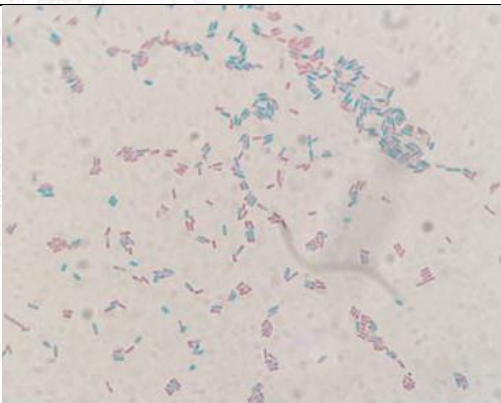
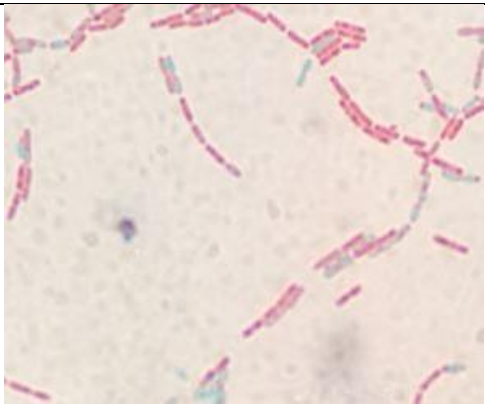
แสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนผลสัณฐานวิทยาของ *Azospirillum* sp. โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PNPBH3, PNPBH5, PNPBH6, PNPBH7 และ PNPBH9 มีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหนานูน ขอบเรียบ ผิวมัน ไอโซเลต TS24 มีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหนานูน ขอบย่น ผิวมัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* agar medium ที่มีการเติมสีกองโกเรด พบว่า มีการดูดสีเข้าไปในเซลล์ คือโคโลนีจะมีสีชมพูอ่อนเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง และมีสีแดงเข้มเมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของ *Azospirillum* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการย้อมสีแกรมพบว่าไอโซเลตที่คัดเลือกมาคือ PNPBH3, PNPBH5, PNPBH6, PNPBH7, PNPBH 9 และ TS24 ติดสีแกรมลบ และมีรูปร่างเป็นแท่งโค้งงอ ดังแสดงในตารางที่ 4.8



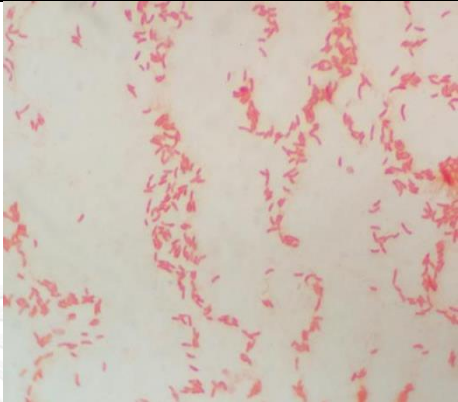
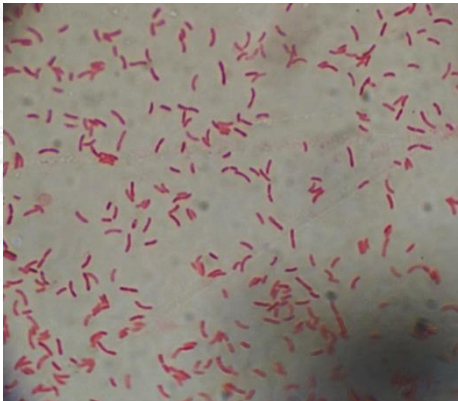
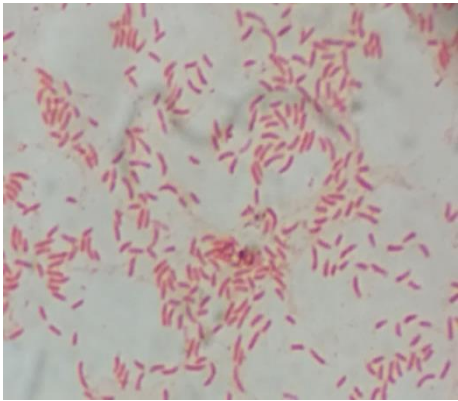
ตารางที่ 4.7: ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากน้ำทะเล

| ไอโซเลต | ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA | การย้อมแกรม | | |
|---------|---|--|----------|--|
| | | รูปร่าง/การจัดเรียงตัว | การติดสี | รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า |
| TW1-1N9 | รูปร่างไม่แน่นอน สีขาว ทึบแสง ขอบหยัก ผิวหน้าแบน ผิวแห้ง | รูปร่างแท่ง การเรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้น 1-2 เซลล์ | ม่วง |  |
| TD12-11 | รูปร่างกลม สีขาวทึบแสง ขอบมีการแผ่เป็นสันโย ผิวหน้านูน ผิวมัน | รูปร่างแท่ง การเรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้น 1-2 เซลล์ | ม่วง |  |
| TU13-9 | รูปร่างกลม สีขาวทึบแสง ขอบหยัก ผิวหน้านูน ผิวมัน | รูปร่างแท่ง การเรียงตัวตัวเป็นสายประมาณ 2-3 เซลล์ | ม่วง |  |

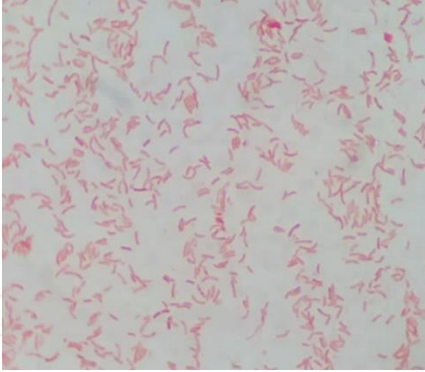

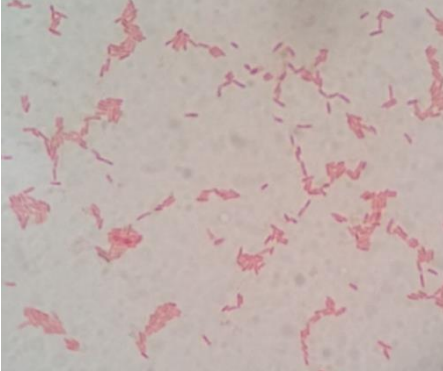
ตารางที่ 4.7: ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากน้ำทะเล (ต่อ)

| ไอโซเลต | การย้อมเอนโดสปอร์ | |
|---------|----------------------------------|--|
| | การติดสี | รูปร่างได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า |
| TW1-1N9 | เซลล์ติดสีแดง สปอร์ติดสีเขียว |  |
| TD12-11 | เซลล์ติดสีแดง สปอร์ติดสีเขียว |  |
| TU13-9 | เซลล์ติดสีแดง สปอร์ติดสีเขียว |  |

ตารางที่ 4.8 : ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Azospirillum* sp.

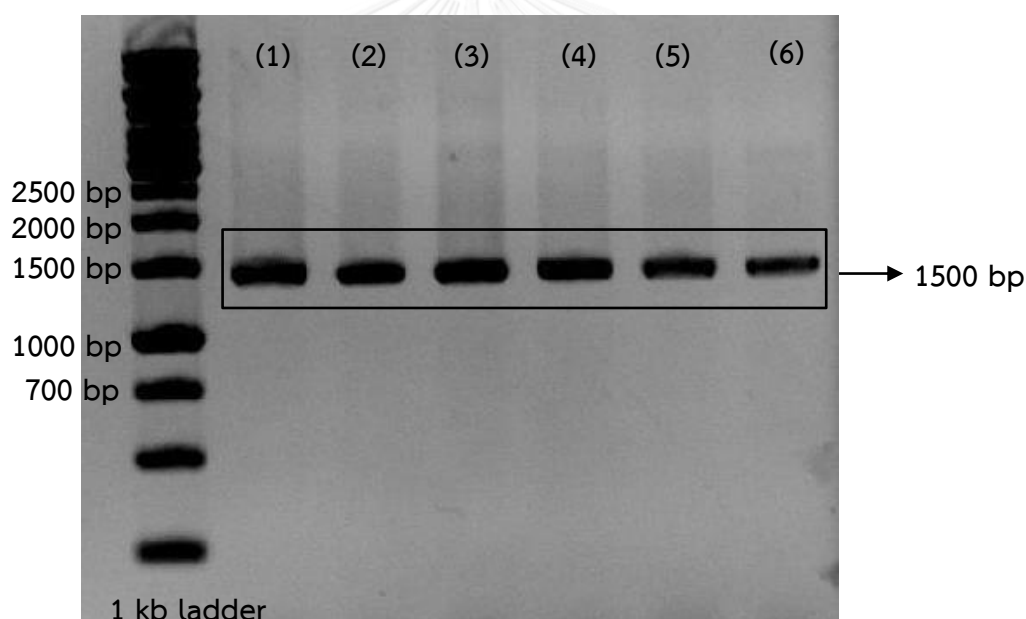
| ไอโซเลต | ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA | ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Azospirillum</i> agar medium | การย้อมแกรม | |
|---------|--|--|-----------------------|--|
| | | | รูปร่าง | รูปร่างไตกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า |
| PNPHB3 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหน้าเนียน ขอบเรียบ ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหน้าเนียน ขอบหยัก ผิวแห้ง | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ |  |
| PNPHB5 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหน้าเนียน ขอบเรียบ ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหน้าเนียน ขอบหยัก ผิวแห้ง | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ |  |
| PNPHB6 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหน้าเนียน ขอบเรียบ ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหน้าเนียน ขอบหยัก ผิวแห้ง และเหนียว | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ |  |

ตารางที่ 4.8: ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Azospirillum* sp. (ต่อ)

| ไอโซเลต | ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA | ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Azospirillum</i> agar medium | การย้อมแกรม | |
|---------|---|---|--------------------------------|--|
| | | | รูปร่าง | รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า |
| PNPHB7 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหนานูน ขอบเรียบ ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหนานูน ขอบหยัก ผิวแห้ง และเหนียว | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ |  |
| PNPHB9 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหนานูน ขอบเรียบ ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหนานูน ขอบหยัก ผิวแห้ง และเหนียว | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ |  |
| TS24 | รูปร่างกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวหนานูน ขอบย่น ผิวมัน | รูปร่างกลม สีแดงจากการดูดสีคองโกเรด ผิวหน้าเรียบ ขอบย่น ผิวแห้ง | ลักษณะเป็นแท่ง โค้งงอ เล็กน้อย |  |

4.8.3 ข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Azospirillum* sp.

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA ของ *Azospirillum* sp. ไอโซเลตที่คัดเลือก ได้แก่ PNPB3, PNPB5, PNPB6, PNPB7, PNPB9 และ TS24 ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1512R แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.35 ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (ภาคผนวก ง หมายเลข 2) พบว่าไอโซเลต PNPB3, PNPB5, PNPB6, PNPB7 และ PNPB9 มีความคล้ายคลึงกับ *Azospirillum zeae* สายพันธุ์ U31 (KT345631.1) ที่ 99% ส่วนไอโซเลต TS24 มีความคล้ายคลึงกับ *Azospirillum brasilense* สายพันธุ์ Az39 (CP007797.1) ที่ 99% ดังแสดงในตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.35: อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์บริเวณ 16S rDNA จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *Azospirillum* sp. ไอโซเลตต่างๆ ซึ่งมีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส (1) PNPB3, (2) PNPB5, (3) PNPB6, (4) PNPB7, (5) PNPB9 และ (6) TS24

ตารางที่ 4.9: การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Azospirillum* sp. ทั้ง 6 ไอโซเลตกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank

| ไอโซเลต | ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank | หมายเลขเข้าถึง | ความเหมือนกันของลำดับ (%) |
|---------|---|----------------|---------------------------|
| PNPHB3 | <i>Azospirillum zeae</i> สายพันธุ์ U31 | KT345631.1 | 99 |
| PNPHB5 | <i>Azospirillum zeae</i> สายพันธุ์ U31 | KT345631.1 | 99 |
| PNPHB6 | <i>Azospirillum zeae</i> สายพันธุ์ U31 | KT345631.1 | 99 |
| PNPHB7 | <i>Azospirillum zeae</i> สายพันธุ์ U31 | KT345631.1 | 99 |
| PNPHB9 | <i>Azospirillum zeae</i> สายพันธุ์ U31 | KT345631.1 | 99 |
| TS24 | <i>Azospirillum brasilense</i> สายพันธุ์ Az39 | CP007797.1 | 99 |

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ การศึกษาด้านการยับยั้งราก่อโรคพบว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเล *B. subtilis* TD12-11 และ *B. aryabhatai* TW1-1N9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. solani* ที่ก่อโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ ขณะที่ *Azospirillum* sp. ทุกไอโซเลตไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค การศึกษาด้านการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่า *Azospirillum* sp. เกือบทุกไอโซเลตสามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ซึ่งเป็นหนึ่งในฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (Bashan และ de-Bashan, 2010), *Azospirillum* sp. ไอโซเลต PNPB3, PNPB5, PNPB9, SBUT6 และ TS24 และแบคทีเรียจากน้ำทะเลสองไอโซเลตข้างต้นรวมถึง *B. subtilis* TU13-9 สามารถละลายฟอสเฟตซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มธาตุฟอสเฟตให้แก่พืช (Krishnaraj และ Dahale, 2014), *Azospirillum* sp. เกือบทุกไอโซเลต และแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้งสามไอโซเลตสามารถผลิตไซโตโรพอร์ซึ่งเป็นตัวจับธาตุเหล็กเพื่อช่วยในการดึงธาตุเหล็กให้กับพืช (Tortora และคณะ, 2011a) และ *Azospirillum* sp. เกือบทุกไอโซเลตสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศซึ่งเป็นหนึ่งในธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของพืช (Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าทั้ง *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลมีสมบัติเป็นฟิสิกัลที่ช่วยส่งเสริมการเจริญในพืชได้ โดยเมื่อทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการใส่แบคทีเรียลงในต้นข้าวพบว่า *Azospirillum* sp. ช่วยเพิ่มการแตกแขนงของราก เพิ่มความสูงและน้ำหนักแห้งของต้นข้าว และช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สำหรับแบคทีเรียจากน้ำทะเลช่วยเพิ่มการแตกแขนงและความแข็งแรงของราก รวมถึงเพิ่มความสูงและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวเช่นกัน เมื่อทดสอบผลการป้องกันโรคกาบใบแห้งในต้นข้าวพบว่าการใส่แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มร่วมกันสามารถลดอาการของโรคกาบใบแห้งในข้าวและป้องกันโรคได้คิดเป็น 66.17%-89.70% โดยไอโซเลต PNPB9 ร่วมกับ TW1-1N9 มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้สูงสุด

งานวิจัยนี้นำแบคทีเรียจากน้ำทะเลสกุล *Bacillus* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *B. subtilis* TD12-11, *B. subtilis* TU13-9 และ *B. aryabhatai* TW1-1N9 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *R. solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคกาบใบแห้งในข้าว และพบว่า *B. subtilis* TD12-11 และ *B. aryabhatai* TW1-1N9 สามารถยับยั้ง *R. solani* ได้ เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ *R. solani* ภายใตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าเส้นใยรามีการบวมผิดปกติซึ่งอาจเกิดจากการผลิตสารเมแทบอลิต์หรือเอนไซม์ไลติกของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่แพร่ผ่านวุ้นทำให้เราไม่สามารถเจริญขยายออกเป็นวงกว้างได้ (Yang และคณะ, 2009a)

จากการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าทั้งสองไอโซเลตมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีเอส ซึ่งเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เหล่านี้หรือสารเมแทบอลิต์อื่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่เรียกว่าทั้ง *B. subtilis* TD12-11 และ *B. aryabhatai* TW1-1N9 สามารถยับยั้ง *R. solani* ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง $60.45 \pm 0.17\%$ และ $39.55 \pm 0.11\%$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าสารเมแทบอลิต์และเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราเป็นสารที่ผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายทั่วโลกในการนำมาใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืชต่างๆทางชีวภาพ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ของงานวิจัยนี้มีข้อดีในด้านการควบคุมโรคพืชเนื่องจากสามารถยับยั้งโรคพืชได้หลากหลายชนิด ดร.ณิ จิวเจริญ (2555) ได้รายงานไว้ว่า *Bacillus* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. lunata*, *Bipolaris* sp., *Collectotrichum* sp., *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* รวมถึง *R. solani* ซึ่งเหนือกว่าหลายงานวิจัยที่ *Bacillus* สามารถยับยั้งราได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด (Kondoh และคณะ, 2001; Yang และคณะ, 2009a; Yu และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า *B. subtilis* TD12-11 และ *B. aryabhatai* TW1-1N9 ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *R. solani* ยังสามารถเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยเมื่อเลี้ยง *B. subtilis* TD12-11 ร่วมกับ *A. zeae* PNPHB3 สามารถควบคุมการเกิดโรคและลดอาการของโรคกาบใบแห้งในข้าวที่เกิดจาก *R. solani* ได้ถึง 79.41% และเมื่อเลี้ยง *B. aryabhatai* TW1-1N9 ร่วมกับ *A. zeae* PNPHB9 สามารถควบคุมการเกิดโรคและลดอาการของโรคกาบใบแห้งในข้าวที่เกิดจาก *R. solani* ได้ถึง 89.70% บทความวิจัยก่อนหน้านี้นี้มีรายงานการนำ *Bacillus* และ *Azospirillum* มาเลี้ยงร่วมกันเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช (Felici และคณะ, 2008) แต่ยังไม่เคยมีการกล่าวถึงการนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มาใช้ร่วมกันในแง่ทั้งการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช ดังนั้นงานวิจัยที่ปฏิบัติครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกันเพื่อการจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการร่วมกับการส่งเสริมการเจริญของพืช

นอกจากนี้ มีงานวิจัยมากมายที่รายงานว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้ง *R. solani* ได้ (Yang และคณะ, 2009a) แต่สำหรับ *B. aryabhatai* นั้น ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าสามารถยับยั้ง *R. solani* ได้ แม้ว่ามียุทธศาสตร์เพียงฉบับเดียวที่พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถยับยั้ง *Pythium aphanidermatum* ที่ก่อโรคเน่าคอดิน (damping-off) ในแตงกวาได้ (Chen และคณะ, 2015) ดังนั้นงานวิจัยที่ปฏิบัติครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการยับยั้ง *R. solani* และราโรคพืชอีกหลายชนิด โดย *Bacillus* ในสปีชีส์ *aryabhatai*

แม้ว่า *Azospirillum* sp. ทั้ง 16 ไอโซเลตจะไม่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ อย่างไรก็ตาม *Azospirillum* เหล่านี้ก็มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญในพืชอีกหลาย

รูปแบบ อาทิจ การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ซึ่งพบใน *Azospirillum* sp. จำนวน 15 ไอโซเลตแต่ไม่พบในไอโซเลต SO992 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตซึ่งพบใน *Azospirillum* sp. เพียง 5 ไอโซเลต คือ PNPB3, PNPB5, PNPB9, SBUT6 และ TS24 การผลิตสารไซโตคอกินินซึ่งพบใน 14 ไอโซเลต โดยไม่พบในไอโซเลต PNCNX8 และ SO992 และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนซึ่งพบใน *Azospirillum* sp. จำนวน 15 ไอโซเลต แต่ไม่พบในไอโซเลต SO992 สำหรับไอโซเลต TS24 เป็นไอโซเลตที่น่าสนใจในแง่การส่งเสริมการเจริญของข้าว เนื่องจากมีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชครบทั้ง 4 สมบัติที่ทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *A. brasilense* Az39 มากถึง 99% ขณะที่ PNPB9 ก็มีความน่าสนใจในแง่ที่นอกจากจะมีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชแล้ว ยังสามารถเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่ยับยั้งราได้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า มีความคล้ายคลึง *A. zeae* U31 มากถึง 99% *A. brasilense* มีรายงานการนำมาใช้ในด้านส่งเสริมการเจริญของพืชมากมาย (Burdman และคณะ, 1997; Saubidet และคณะ, 2002; Spaepen และคณะ, 2008) แต่ *A. zeae* นั้น เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่มีรายงานในปี 2007 (Mehnaz และคณะ, 2007) โดยสามารถแยกได้จากรอบๆรากของข้าวโพด *Azospirillum* ในสปีชีส์นี้มีรายงานว่าส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดได้ (Mehnaz และคณะ, 2010) แต่ยังไม่มียางานว่ามีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว ดังนั้นงานวิจัยที่ปฏิบัติครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการส่งเสริมการเจริญของข้าวโดย *Azospirillum* ในสปีชีส์ *zeae*

งานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งพบเฉพาะใน *Azospirillum* sp. แต่ไม่พบในแบคทีเรียจากน้ำทะเล โดยปริมาณการผลิต IAA ของ *Azospirillum* sp. อยู่ในช่วง 0.70-200.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลตที่มีการผลิต IAA สูงสุด คือ ไอโซเลต TS24 ผลิตได้ 200.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองไอโซเลตของ *Azospirillum* sp. ส่วนใหญ่ในงานวิจัยนี้มีการผลิต IAA ได้ในปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมทริปโตแฟนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ IAA แสดงให้เห็นว่าไอโซเลตเหล่านี้ของ *Azospirillum* sp. มีกระบวนการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีทริปโตแฟน (El-Khawas และ Adachi, 1999) ซึ่งในธรรมชาติแบคทีเรียจะได้รับทริปโตแฟนจากสารอินทรีย์ที่หลั่งออกมาจากรากพืช (Bais และคณะ, 2006) โดย IAA ที่ผลิตจากพืจิปอาร์ทจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของรากในต้นอ่อนพืช และส่งผลถึงการผลิตมวลชีวภาพในพืชที่มากขึ้นหรือลดลงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและความเข้มข้นของ IAA Dobbelaere และคณะ (1999) ได้ใส่ *A. brasilense* Sp245 และ Sp7 ในต้นข้าวสาลี และพบว่ามีความยาวของรากลดลงและมีขนรากเพิ่มขึ้น ขณะที่อีกงานวิจัยหนึ่ง มีการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. brasilense* ใส่ลงในต้นข้าว พบว่ามีการยืดยาวของรากเพิ่มขึ้น, พื้นที่ผิวของรากเพิ่มขึ้น, น้ำหนักแห้งรากเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาของรากแขนงและขนรากเพิ่มขึ้น แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ IAA สูงจะยับยั้งความ

ยาวของรากและการพัฒนาของรากแขนง และส่งผลให้เกิดปุ่มปมบนราก (El-Khawas และ Adachi, 1999) อีกทั้งปริมาณการผลิต IAA ยังมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์และแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย รวมถึงความสามารถในการใช้ซับสเตรตของแบคทีเรีย, ภาวะการเลี้ยง และระยะเวลาเจริญของแบคทีเรียด้วย (Chaiharn และคณะ, 2009)

การละลายฟอสเฟตของ *Azospirillum* sp. พบในไอโซเลต PNPB3, PNPB5, PNPB9, SBUT6 และ TS24 และแบคทีเรียจากน้ำทะเลทุกไอโซเลต ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้อย่างน้อยสามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ซึ่งจัดเป็นฟอสเฟตอนินทรีย์ที่อยู่ในเฟลทได้ ดังนั้นจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (phosphate-solubilizing bacteria; PSB) PSB สามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตได้ดีกว่าหินฟอสเฟต, อะลูมิเนียมฟอสเฟต และเหล็กฟอสเฟต เนื่องจากฟอสเฟตในรูปอื่นสามารถละลายได้ยาก (Chung และคณะ, 2005) แบคทีเรียมีกลไกการละลาย (solubilization) สำหรับอนินทรีย์ฟอสฟอรัส และกลไกการเปลี่ยนให้เป็นแร่ธาตุ (mineralization) สำหรับอนินทรีย์ฟอสฟอรัส (Khan และคณะ, 2009) กลไกหลักของการละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัส คือการผลิตกรดอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งกรดอินทรีย์จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และคาร์บอกซิล (-COOH) ที่จะแย่งจับกับไอออนบวกที่ยึดกับฟอสเฟต และส่งผลให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ (Sagoe และคณะ, 1998) กรดอินทรีย์ที่มีการผลิต ได้แก่ กรดกลูโคินิกซึ่งเป็นกรดที่พบบ่อยในการละลายฟอสเฟต (Rodríguez และ Fraga, 1999) รวมถึงกรดอื่นๆ คือ กรดแลกติก, กรดไอโซวาเลอริก, กรดไอโซบิวทีริก และกรดอะซีติก เป็นต้น โดยพบการผลิตใน *B. liqueniformis* และ *B. amyloliquefaciens* นอกจากนี้ยังพบกรดไกลโคลิก, กรดออกซาลิก, กรดมาโลนิค และกรดซักซินิก ใน PSB อื่นๆ ด้วย (Banik และ Dey, 1982; Illmer และ Schinner, 1992) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปว่าแบคทีเรียต่างๆในงานวิจัยนี้ละลายฟอสเฟตโดยการผลิตกรดชนิดใด ซึ่งสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นซับสเตรต

ความสามารถในการผลิตไซโตโรฟออร์ พบว่า *Azospirillum* sp. เกือบทุกไอโซเลต (ยกเว้นไอโซเลต SO992 และ PNCNX8) และแบคทีเรียจากน้ำทะเลทุกไอโซเลตสามารถผลิตไซโตโรฟออร์ที่แพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS ซึ่งจะเปลี่ยนสีน้ำเงินของอาหารไปเป็นสีส้ม สมบัตินี้เป็นหนึ่งในลักษณะของพีจีฟิอาร์ โดยแบคทีเรียจากน้ำทะเลมีอัตราการผลิตไซโตโรฟออร์มากกว่า *Azospirillum* sp. ซึ่งสังเกตจากวงแหวนสีส้มรอบโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่า ทั้งนี้มีรายงานว่าอัตราการเปลี่ยนสีของอาหาร CAS โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งไอโซเลตของแบคทีเรียที่เจริญได้รวดเร็วจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS ที่รวดเร็วเช่นกัน (Chaiharn และคณะ, 2009) การผลิตไซโตโรฟออร์เกี่ยวข้องกับกลไกการแข่งขันของพีจีฟิอาร์ที่ยึดเกาะบริเวณรากพืชรวมถึงจุลินทรีย์อื่นๆที่อยู่ตาม

ธรรมชาติ (Haas และ Défago, 2005) เหล็กที่ได้จากการจับกับไซเดอโรพอร์จะมีบทบาทสำคัญในการวัดความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันของแบคทีเรียบริเวณรากพืชและการแข่งขันกันแย่งจับธาตุเหล็กของแบคทีเรียอื่นๆบริเวณรอบรากพืช (Crowley, 2006) Carrillo-Castañeda และคณะ (2002) รายงานถึงผลดีต่อการเจริญของต้นอ่อนของอัลฟัลฟาในสภาพที่มีการจำกัดธาตุเหล็กภายหลังการใส่แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Azospirillum* ที่สามารถผลิตสารไซเดอโรพอร์ได้ พบว่าเมล็ดอัลฟัลฟาที่ใส่เชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการงอกเพิ่มขึ้น รวมถึงน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน ไซเดอโรพอร์บางชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายสปีชีส์ ขณะที่ไซเดอโรพอร์บางชนิดจำเพาะต่อการผลิตของจุลินทรีย์เพียงสปีชีส์เดียว (Crowley, 2006; Sandy และ Butler, 2009) โมเลกุลของไซเดอโรพอร์ประกอบด้วยโซ่ด้านข้าง (side chain) และหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่สามารถบ่งบอกความสามารถของลิแกนด์ในการจับกับธาตุเหล็กได้ (Crosa และ Walsh, 2002) โดยสามารถแบ่งไซเดอโรพอร์เป็น 3 กลุ่มตามชนิดของหมู่ฟังก์ชัน, โครงสร้างและลักษณะทางเคมี และประเภทของลิแกนด์ที่ล้อมรอบ คือ ไซเดอโรพอร์กลุ่ม carboxylate, hydroxamate และ catecholate (Crowley, 2006) ในภาวะความเป็นกรด-เบสที่เป็นกลาง ไซเดอโรพอร์กลุ่ม hydroxamate พบว่าให้สารเชิงซ้อนของ monohydroxamate และ trihydroxamate ที่มีสีส้ม ซึ่งทุกไอโซเลตของแบคทีเรียในงานวิจัยนี้น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม hydroxamate (Milagres และคณะ, 1999)

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ประเมินจากการเจริญในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาทางอ้อม โดยแบคทีเรียที่สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศเป็นแหล่งไนโตรเจนจะเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) เพื่อเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ (Steenhoudt และ Vanderleyden, 2000) จากผลการทดลอง พบว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเลไม่สามารถเจริญในอาหารเหลว Nfb ที่ปราศจากไนโตรเจนได้ แต่สำหรับ *Azospirillum* sp. มีความสามารถในการเจริญในอาหารนี้ได้ วิธีการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสามารถใช้วิธีในระดับโมเลกุลได้โดยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ส่วนของยีน *nifD* ที่แปลรหัสให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่มีความสำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยแบคทีเรียที่มียีนนี้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 710 คู่เบส (Pedraza และคณะ, 2007) นอกจากนี้ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียยังสามารถตรวจสอบได้จากการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยการสอบวิเคราะห์การรีดักชันของอะเซทีลีน (acetylene reduction assay) (Pedraza และคณะ, 2007)

การทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในต้นข้าว โดยการใส่ *Azospirillum* sp. หรือแบคทีเรียจากน้ำทะเลลงในต้นข้าวแสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของ *Azospirillum* sp. และแบคทีเรียจากน้ำทะเลของกล้าต้นข้าวในระยะเริ่มแรก สมบัติที่เห็นได้

ชัดเจนใน *Azospirillum* sp. คือการตรึงไนโตรเจนโดยอยู่ร่วมกับพืชอย่างอิสระ โดยสังเกตจากการไม่พบอาการใบเหลืองของต้นข้าวที่ใส่ *Azospirillum* sp. ในอาหารเลี้ยงต้นข้าวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบกับต้นข้าวกลุ่มควบคุม ผลของความยาวรากของต้นข้าวที่มี *Azospirillum* sp. ไม่แตกต่างกับต้นข้าวกลุ่มควบคุมในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน แต่ที่สังเกตเห็นอย่างชัดเจนคือการแตกแขนงของรากซึ่งแตกต่างกับต้นข้าวกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียที่ใส่ลงไป (Dobbelaere และคณะ, 1999)

นอกจากนี้ผลของการใส่ *Azospirillum* ในต้นข้าวยังส่งผลให้น้ำหนักแห้งและความสูงของต้นข้าวเพิ่มขึ้นจากต้นข้าวกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยไอโซเลตที่เห็นการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งของต้นข้าวและความสูงชัดเจน คือ TS14, TS24 และ TS11 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dobbelaere และคณะ (2001) ที่ประเมินผลของการใส่หัวเชื้อ *A. brasilense* ที่มีสมบัติเป็นพีจีฟิอาร์ต่อการเจริญของข้าวสาลี พบว่าต้นข้าวสาลีที่ใส่เชื้อ *A. brasilense* มีน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นเพิ่มขึ้น

สำหรับแบคทีเรียจากน้ำทะเลนั้น สมบัติด้านพีจีฟิอาร์ต่อพืชที่เห็นอย่างชัดเจนคือ ความยาวรากของต้นข้าวสั้นกว่าต้นข้าวกลุ่มควบคุมในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน แต่มีการแตกแขนงของรากมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนและรากมีความหนาและแข็งแรง รวมถึงน้ำหนักและความสูงของต้นข้าวที่ใส่แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตก็มากกว่าต้นข้าวกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Balcan และคณะ (2015) ที่พบว่าแบคทีเรียที่ใส่ให้กับพืชมีผลทำให้รากสั้นและหนาขึ้น ซึ่งมีผลในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนระหว่างรากและดิน ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้อาจเป็นผลของฮอร์โมนอื่นๆที่แบคทีเรียจากน้ำทะเลผลิตขึ้นได้ เช่น จิบเบอเรลลินที่ให้ผลคล้ายคลึงกับ IAA คือช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการยืดยาวของเซลล์ และมีการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงที่ส่งเสริมการงอกของต้น เช่น เอนไซม์อะไมเลส โดยจะเพิ่มความสามารถในการดูดซึมแป้ง (Bharathi และคณะ, 2004) หรืออาจเป็นผลจากไซโตไคนินที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์เช่นกัน โดยการกระตุ้นการเจริญของลำต้นและยับยั้งการเจริญของราก (Arkhipova และคณะ, 2007)

การพัฒนาหัวเชื้อผสมในการใช้เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชทางชีวภาพเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากหัวเชื้อผสมอาจจะช่วยให้มีการยึดเกาะพืชได้ดีขึ้น, มีการปรับตัวจากการเปลี่ยนแปลงด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นตลอดฤดูกาลเพาะปลูก, มีกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคจำนวนมาก หรือมีการป้องกันเชื้อก่อโรคได้ในช่วงกว้าง (Rechcigl และ Rechcigl, 1997) จากแนวคิดทางชีวนิเวศของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับพืชทั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญ, ความแข็งแรงของพืช และการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช ซึ่งคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่อาศัยในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์นั้น กลุ่มของจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชจะสามารถช่วยเพิ่มสารอาหารให้กับพืชและควบคุมเชื้อก่อโรคในดิน

ได้ (Spence และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตาม ความเข้ากันได้ของเชื้อและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพเป็นปัจจัยที่ถือเป็นข้อจำกัดของการใช้หัวเชื้อผสมในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการป้องกันการเกิดโรคกาบใบแห้งที่เกิดจาก *R. solani* และในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดร่วมกันคือ แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีสมบัติในการยับยั้งรา และ *Azospirillum* sp. ที่มีสมบัติในการเป็นฟิซิฟออาร์ ซึ่งพบว่าการใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกันสามารถช่วยลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้ และป้องกันโรคได้ 66.17-89.70% ซึ่งแบคทีเรียจากน้ำทะเล *B. aryabhatai* TW1-1N9 กับ *A. zeae* PNPB9 สามารถลดอาการของโรคได้ดีที่สุด โดยอาจเป็นผลจากกลไกของแบคทีเรีย 2 ชนิดร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญในข้าว เช่น การผลิต IAA และการตรึงไนโตรเจน รวมถึงกลไกการยับยั้งรา เช่น การผลิตสารไซโตโรเฟอร์และสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา ทำให้ต้นข้าวมีความแข็งแรง ทนทานต่อการติดเชื้อ *R. solani* และมีน้ำหนักแห้งและความสูงของต้นข้าวที่สูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ใส่แบคทีเรีย งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นการใช้หัวเชื้อผสมในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพโดยปราศจากสารเคมีซึ่งมีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการทำเกษตรอินทรีย์

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิบัติสำหรับการควบคุมโรคข้าวบริเวณผิวดิน (rhizoplane) ที่เกิดจาก *R. solani* สามารถทำได้โดยหลายวิธี อาทิ การคลุกแบคทีเรียปฏิบัติกับเมล็ดข้าวที่ใช้เพาะปลูกก่อนนำไปปลูก, การราดแบคทีเรียปฏิบัติลงบนดินที่ใช้ปลูก, การคลุกผสมแบคทีเรียปฏิบัติกับดินที่ใช้เพาะปลูก และการจุ่มรากของต้นกล้าในสารละลายแบคทีเรียปฏิบัติ เป็นต้น (นิพนธ์ ทวีชัย, 2538)

เป้าหมายของงานวิจัยการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ คือ การเพิ่มเครื่องมือในการจัดการกับโรคพืชและสามารถนำไปใช้ได้จริงในพื้นที่การเกษตร โดยเข้าสู่ระบบการพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ (Fravel, 2005) การควบคุมโรคทางชีวภาพต้องใช้เชื้อปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดโรคพืช โดยผลการทดลองที่ดีที่สุดที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่ดีของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ศึกษา อย่างไรก็ตามการนำสายพันธุ์ของเชื้อปฏิบัติไปพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการเกษตรและผลิตขายในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะต้องผ่านการคัดเลือกและการทดสอบถึงความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้ดีทั้งในห้วงปฏิบัติการและในสภาพแปลงเกษตร และพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถใช้งานได้ง่าย สะดวกต่อการนำไปใช้และเก็บรักษา เช่น รูปแบบผงและรูปแบบเม็ด อีกทั้งมีการศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของชีวผลิตภัณฑ์เพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้นาน (นิพนธ์ ทวีชัย, 2538)

จากผลที่มีประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากน้ำทะเล *B. aryabhatai* TW1-1N9 และ *B. subtilis* TD12-11 ในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ที่ก่อโรคกาบใบแห้งในต้นข้าว อีกทั้งสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำทะเล และ *Azospirillum* ไอโซเลตต่างๆ ในต้น

ข้าว และความสามารถในการยับยั้งอาการของโรคกาบใบแห้งในต้นข้าวที่ได้จากงานวิจัยนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญในข้าว และควบคุมการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจาก *R. solani* โดยใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีหรือสารเคมีกำจัดรา อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้แบคทีเรีย เพื่อความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมถึงผู้ใช้และผู้บริโภค และไม่ให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป



รายการอ้างอิง

- Agarwal, P.C., Mortensen, C.N. and Mathur, S.B., 1989 Seed-borne diseases and seed health testing of rice. In: Phytopathological Papers, pp. 106.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. and Steinberg, C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184(3): 529-544.
- Alabouvette, C., Olivain, C. and Steinberg, C. 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114(3): 329-341.
- Antoun, H. and Klopper, J. 2001. Plant growth promoting rhizobacteria. New York, Academic, pp. 1477-1480.
- Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S.J. and Ramana, K.V. 2009. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1): 58-64.
- Arkhipova, T.N. et al. 2007. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil*, 292(1): 301-305.
- Armstrong, E., Yan, L., Boyd, K.G., Wright, P.C. and Burgess, J.G. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia*, 461(1): 37-40.
- Asaka, O. and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4081-4085.
- Asghar, H., Zahir, Z., Arshad, M. and Khaliq, A. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35(4): 231-237.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266.
- Baldan, E. et al. 2015. Beneficial bacteria isolated from grapevine inner tissues shape *Arabidopsis thaliana* roots. *PloS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0140252.
- Bandurski, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J.P. and Reinecke, D.M., 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. In: *Plant hormones*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 39-65.

- Banik, S. and Dey, B. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 69(3): 353-364.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4): 729-770.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6): 2637-2643.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. In: *Advances in Agronomy*, pp. 77-136.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1044-1051.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. and Samiyappan, R. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23(9): 835-843.
- Bhaskara Rao, K.V. and Charyulu, P.B.B.N. 2005. Evaluation of effect of inoculation of *Azospirillum* on the yield of *Setaria italica* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 4(9): 989-995.
- Bouillant, M.L. et al. 1997. Inhibition of *Striga* seed germination associated with sorghum growth promotion by soil bacteria. *Comptes Rendus De l'académie Des Sciences*, 320(2): 159-162.
- Bouizgarne, B., 2013. Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: *Bacteria in agrobiolgy: disease management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 15-47.
- Brady, N.C., 1977. *Advances in Agronomy*. In: Academic press, New York, pp. 400.
- Broughton, W., J. and Dilworth, M., J. 1971. Control of leghemoglobin synthesis in snakebean. *Biochemical Journal*, 125: 1075-1080.
- Burdman, S., Kigel, J. and Okon, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5): 923-929.

- Cao, L. et al. 2004. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5): 501-504.
- Carrillo-Castañeda, G. et al. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*, 6(3): 391-399.
- Cassán, F.D., Okon, Y. and Creus, C.M. 2015. Handbook for *Azospirillum*. Springer, Switzerland, pp. 514.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P. and Ongena, M., 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: Pesticides in the modern world - pesticides use and management. InTech, Croatia, pp. 520.
- Chaiham, M., Chunchaleuchanon, S. and Lumyong, S. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 1919-1928.
- Chamam, A. et al. 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87: 65-77.
- Chen, J., Lin, M. and Huang, J. 2015. Efficacy of spent blewit mushroom compost and *Bacillus aryabhatai* combination on control of *Pythium* damping-off in cucumber. *The Journal of Agricultural Science*, 153(7): 1257-1266.
- Chen, L., Wang, N., Wang, X., Hu, J. and Wang, S. 2010. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology*, 101(22): 8822-8827.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 129(1): 85-92.
- Chung, H. et al. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10): 1970-1974.
- Cintas, N.A. and Webster, R.K. 2001. Effects of rice straw management on *Sclerotium oryzae* inoculum, stem rot severity, and yield of rice in California. *Plant Disease*, 85(11): 1140-1144.
- Compant, S.p., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.d.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.

- Costacurta, A., Keijers, V. and Vanderleyden, J. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 243(4): 463-472.
- Crosa, J.H. and Walsh, C.T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2): 223-249.
- Crowley, D.E. 2006. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Dordrecht, pp. 477.
- Dadona, T. and Bar Nuna, N.M., Alfred M. 2004. A factor from *Azospirillum brasilense* inhibits germination and radicle growth of *Orobancha aegyptiaca*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 52(3): 83-86.
- De Vleeschauwer, D., Yang, Y., Cruz Vera, C. and Hofte, M. 2010. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiology*, 152(4): 2036-2052.
- Debbab, A., Aly, A.H., Lin, W.H. and Proksch, P. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotechnology*, 3(5): 544-563.
- Deniele, M., Vandeir Francisco, G., Janaína, D., Maria do Carmo, L. and Artur Soares, P.J. 2015. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. *Revista Ceres*, 62(1): 117-123.
- Dobbelaere, S. et al. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, 28(9): 871-879.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. and Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212(2): 155-164.
- El-Khawas, H. and Adachi, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils*, 28(4): 377-381.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Physiology and Biochemistry*, 73(1): 85-88.
- Emmert, E.A. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1): 1-9.

- Felici, C. et al. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40(2): 260-270.
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S. and Okon, Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 326(2): 99-108.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20(8): 338-343.
- Ghazanfar, U.M., Waqas, W., Sahi, S.T. and Saleem-il-Yasin. 2009. Influence of various fungicides on the management of rice blast disease. *Mycopathology*, 7(1): 29-34.
- Gnanamanickam, S.S. 2009. *Biological control of rice diseases*. Springer Science and Business Media, USA, pp. 120.
- Gohel, V., Chaudhary, T., Vyas, P. and Chhatpar, H.S. 2004. Isolation and identification of marine chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Indian Journal Experiment Biology*, 42(7): 715-720.
- Goncalves, S., Felipe, A., De Oliveira, B. and Da Gloria, R. 1998. Cyanide production by Brazilian strains of *Azospirillum*. *Revista De Microbiologia*, 29(1): 36-39.
- Gonzalez, M. et al. 2011. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Molecular Plant Pathology*, 12(3): 209-216.
- Gupta, S., Arora, D.K. and Srivastava, A.K. 1995. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8): 1051-1058.
- Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4): 307-319.
- Haggag, W.M. 2008. Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis* grey mould in strawberry. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(7): 477-491.
- Hagström, A. et al. 2002. Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7): 3628-3633.

- Handelsman, J. and Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, 8(10): 1855-1869.
- Hassounaa, M.G., El-Saedyb , M.A.M. and Saleh, H.M.A. 1998. Biocontrol of soil-borne plant pathogens attacking cucumber (*Cucumis sativus*) by rhizobacteria in a semiarid environment. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 12(4): 345-357.
- Ho, H.H., Chen, X.X., Zeng, H.C. and Zheng, F.C. 2012. The occurrence and distribution of *Pythium* species on Hainan Island of South China. *Botanical Studies* 53(4): 525-534.
- Hofman, T. and Jongebloed, P. 1988. Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94(5): 243-252.
- Holguin, G. and Bashan, Y. 1993. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12): 1651-1660.
- Hollier, C.A. and Rush, M.C. 2012. Sheath blight of rice. (online). <https://www.lsuagcenter.com/NR/rdonlyres/C93A494B-8105-4804-9DFA-81190EC3F68B/58166/pub3123SheathBlightofRiceHIGHRES.pdf>. (5 November 2015).
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* The Williams and Wilkins Co., Maryland, USA, pp. 787.
- Howard, R.J. and Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.491.
- Illmer, P. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4): 389-395.
- Jensen, P.R. and Fenical, W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1): 559-584.
- Jia, P. et al. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 36(3): 358-367.
- Kapulnik, Y., Kigel, J., Okon, Y., Nur, I. and Henis, Y. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant and Soil*, 61(2): 65-70.

- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S. and Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1): 48-58.
- Khan, M.R. and Kounsar, K. 2000. Effect of seed treatment with certain bacteria and fungi on the growth of mungbean and reproduction of *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 28(2): 221-226.
- Kim, C. et al. 2005. Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(11): 948-956.
- Kondoh, M., Hirai, M. and Shoda, M. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2): 173-177.
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X. and Yu, F. 2010. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2): 31-35.
- Krishnaraj, P. and Dahale, S. 2014. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2): 389-405
- Kumar, A., Prakash, A. and Johri, B.N., 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 434.
- Kumar, M.P. et al., 2013. Impact on fungicides on rice production in India. In: *Fungicides-Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. In tech, India, pp. 77-98.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8): 493-499.
- Lee, F.N. and Ruch, M.C. 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease*, 67(7): 829-832.
- Leveau, J.H.J. and Lindow, S.E. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2365-2371.

- Li, Z., Pinson, S.R., Marchetti, M.A., Stansel, J.W. and Park, W.D. 1995. Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theoretical and Applied Genetics*, 91(2): 382-388.
- Lian, L., Xie, L., Zheng, L. and Lin, Q. 2011. Induction of systemic resistance in tobacco against Tobacco Mosaic Virus by *Bacillus* spp. *Biocontrol Science and Technology*, 21(3): 281-292.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85(10): 1064-1068.
- Loper, J.E. and Henkels, M.D. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1): 99-105.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Malik, K.A., Mirza, M.S. and Ladha, J.K. 1996. Nitrogen fixation with non-legumes, *Proceedings of the 7th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Springer Science and Business Media, Faisalabad, Pakistan.
- Manidipa, R., Dutta, S.G. and Venkata, R.C. 2013. Pseudomonads: potential biocontrol agents of rice diseases. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences* 1(9): 19-25.
- Mari, J.L. 2009. *Rhizoctonia solani* as a potato pathogen-variation of isolations in Finland and host response. University of Helsinki, Finland, pp. 81.
- Matsuura, K. 1986. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. *Phytopathology*, 76(8): 811-814.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J.P. and Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84(2): 139-146.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B. and Lazarovits, G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10): 1848-1856.

- Mehnaz, S., Weselowski, B. and Lazarovits, G. 2007. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(12): 2805-2809.
- Milagres, A.M., Machuca, A. and Napoleao, D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Methods, 37(1): 1-6.
- Mishra, R.P., Singh, R.K., Jaiswal, H.K., Kumar, V. and Maurya, S. 2006. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). Current Microbiology, 52(5): 383-389.
- Munn, C. 2011. Marine microbiology. Garland Science, USA, pp. 367.
- Naik, P.R., Raman, G., Narayanan, K.B. and Sakthivel, N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiology, doi: 10.1186/1471-2180-8-230.
- Nandakumara, R., Babua, S., Viswanathanb, R., Raguchandera, T. and Samiyappana, R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biology and Biochemistry, 33 (4-5): 603-612.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1): 265-270.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review of Phytopathology, 25: 125-143.
- Okon, Y. 1993. *Azospirillum*-plant associations. CRC Press, Boca Raton, pp. 167.
- Okon, Y. and Itzigsohn, R. 1995. The development of *Azospirillum* as commercial inoculant for improving crop yields. Biotechnology Advances, 13(3): 415-424.
- Okon, Y. and Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, 26(12): 1591-1601.
- Ortega-Morales, B.O. et al. 2009. Antagonism of *Bacillus* spp. isolated from marine biofilms against terrestrial phytopathogenic fungi. Marine Biotechnology, 11(3): 375-383.
- Pal, K.K. and Gardener, M.B. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, doi: 10.1094/phi-a-2006-1117-02.
- Palumbo, J.D., Baker, J.L. and Mahoney, N.E. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. Microbial Ecology, 52(1): 45-52.

- Pedraza, R.O., Motok, J., Tortora, M.L., Salazar, S.M. and Díaz-Ricci, J.C. 2007. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant and Soil*, 295(1): 169-178.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, doi: doi:10.1038/nchembio.164.
- Prathuangwong, S. et al. 2011. *Pseudomonas fluorescens* SP007s reduces plant infection and increases γ -aminobutyric acid in seed infected by a complex pathogens of rice, IPPC Joint Meeting. *Phytopathology*, Honolulu, Hawaii, pp. S146.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4): 537-547.
- Radtke, C., Cook, W.S. and Anderson, A. 1994. Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2): 274-280.
- Raupach, G.S. and Kloepper, J.W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11): 1158-1164.
- Rechcigl, N.A. and Rechcigl, J.E. 1997. Environmentally safe approaches to crop disease control. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 400.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4): 319-339.
- Roesch, L.F., W., de Quadros, P., Dörr, Camargo, F.A., O. and Triplett, E., W. 2007. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(10): 1377-1383.
- Romero, A.M., Correa, O.S., Moccia, S. and Rivas, J.G. 2003. Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4): 832-838.
- Rosales, A.M. and Mew, T.W. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice associated antagonistic bacteria. *Plant Disease*, 81(1): 49-52.
- Ryu, C.M. et al. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3): 1017-1026.

- Sagoie, C.I., Ando, T., Kouno, K. and Nagaoka, T. 1998. Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphaterock dissolution by organic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44(4): 617-625.
- Saikia, R. et al. 2011. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. *Microbiological Research*, 166(3): 216-225.
- Sandy, M. and Butler, A. 2009. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chemical Reviews*, 109(10): 4580-4595.
- Saubidet, M.I., Fatta, N. and Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, 245(2): 215-222.
- Schwyn, B. and Neilands, J., B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.
- Shah, S., Karkhanis, V. and Desai, A. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum*. *Current Microbiology*, 25(6): 347-351.
- Shobha, G. and Kumudini, B. 2012. Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus* spp. on *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Applied Science and Engineering Research*, 1(3): 463-474.
- Silo-Suh, L.A. et al. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 2023-2030.
- Singh, H.B., Singh, B.N., Singh, S.P., Singh, S.R. and Sarma, B.K., 2009. Biological control of plant diseases current status and future prospects. In: *Recent Advances in Biopesticides Biotechnological Applications*. New India Publishing Agency, pp. 338.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9): 1669-1679.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 578.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M. and Vanderleyden, J. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for

- indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environment Microbiology*, 71(4): 1803-1810.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. and Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312(1): 15-23.
- Spence, C. et al. 2014. Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, doi: 10.1186/1471-2229-14-130.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4): 487-506.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857.
- Su'udi, M. et al. 2013. Quantification of rice sheath blight progression caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Microbiology*, 51(3): 380-388.
- Sudhakar, P., Chattopahyay, G.N., Gangwar, S.K. and Ghosh, J.K. 2000. Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). *The Journal of Agricultural Science*, 134(2): 227-234.
- Sumanon, P. and Traiperm, P. 2013. An investigation of lemma micromorphology in Thai *Oryzae* (Poaceae). *ScienceAsia*, 39(6): 567-573.
- Sundaramoorthy, S., Karthiba, L., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2013. Ecofriendly approaches of potential microbial bioagents in management of sheath rot disease in rice caused by *Sarocladium oryzae* (Sawada). *Plant Pathology*, 12(2): 98-103.
- Swedrzyńska, D. 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 9(5): 423-428.
- Sweeney, M. and McCouch, S. 2007. The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5): 951-957.
- Tapia-Hernández, A., Mascarúa-Esparza, M. and Caballero-Mellado, J. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios*, 64(259): 73-83.
- Tian, B., Yang, J. and Zhang, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2): 197-213.

- Tilak, K.V.B.R. et al. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89(1): 136-150.
- Tortora, M.L., Diaz-Ricci, J.C. and Pedraza, R.O. 2011a. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193(4): 275-286.
- Tortora, M.L., Diaz-Ricci, J.C. and Pedraza, R.O. 2011b. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 356(1): 279-290.
- Tunbridge, N. and Fitzpatrick, K. 2008. Soil and plant nutrition. Benjamin Cummings, Chicago, USA, pp. 1448.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B. and Prigent Combaret, C. 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2013.00356.
- Van Wees, S.C. et al. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 10(6): 716-724.
- Verona, O.P. 1980. Cultural characteristics of the rice leaf scald fungus, *Rhynchosporium oryzae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3): 509-514.
- Vijayan, K.K. et al. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture*, 251(2-4): 192-200.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8(2): 351-358.
- Win, J. et al. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933.
- Wisser, R.J., Sun, Q., Hulbert, S.H., Kresovich, S. and Nelson, R.J. 2005. Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. *Genetics*, 169(4): 2277-2293.
- Woomer, P., L. , Karanja, N., Kisamuli, S., M. , Murwira, M. and Bala, A. 2011. Surface sterilization of grain legume seeds. A Revised Manual for Rhizobium Methods and Standard Protocols Available on the Project Website. (online). www.N2Africa.org. (11 February 2015).

- Wrather, J.A. and Sweets, L. 2009. Rice sheath blight control. (online). <http://extension.missouri.edu/explorepdf/miscpubs/mp0646.pdf>. (4 November 2015).
- Yang, D., Wang, B., Wang, J., Chen, Y. and Zhou, M. 2009a. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. *Biological Control*, 51(1): 61-65.
- Yang, J., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M. 2009b. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1): 1-4.
- Yang, M. et al. 2014. Plant-plant-microbe mechanisms involved in soil-borne disease suppression on a maize and pepper intercropping system. *PloS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0115052.
- Yasuda, M., Isawa, T., Shinozaki, S., Minamisawa, K. and Nakashita, H. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(12): 2595-2599.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91(2): 181-187.
- Yu, G., Sinclair, J., Hartman, G. and Bertagnolli, B. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7): 955-963.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L. and Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2): 138-145.
- Zakharova, E.A., Iosipenko, A.D. and Ignatov, V.V. 2000. Effect of water-soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Microbiological Research*, 155(3): 209-214.
- Zhang, B., Xie, C. and Yang, X. 2008. A novel small antifungal peptide from *Bacillus* strain B-TL2 isolated from tobacco stems. *Peptides*, 29(3): 350-355.
- Zhang, D.J., Liu, R.F., Li, Y.G., Tao, L.M. and Tian, L. 2010. Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58(12): 1630-1634.
- Zimmer, W., Wesche, M. and Timmermans, L. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7:

sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current Microbiology*, 36(6): 327-331.

- โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. 2553a. ชาติอาหารพืชในดิน. (ออนไลน์).
<http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=18&chap=8&page=t18-8-infodetail05.html>. (5 พฤศจิกายน 2558).
- โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. 2553b. โรคพืช. (ออนไลน์).
<http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=7&chap=4&page=t7-4-infodetail01.html>. (21 มกราคม 2558).
- ดร.ณิ จิวเจริญ. 2555. แบคทีเรียจากน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราโรคพืช, วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 65.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. สัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้อีโกลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 297.
- สำนักงานคณะกรรมการซื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า. 2556. ศูนย์พัฒนาความรู้การซื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า. (ออนไลน์).
http://www.aftc.or.th/itc/products_analyze.php?id=56&fgrp_id=5&fmnu_id=18. (2 พฤศจิกายน 2558).
- สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2552. การปรับโครงสร้างและการเพิ่มประสิทธิภาพทางเศรษฐกิจ. (ออนไลน์).
www.nesdb.go.th/portals/0/news/plan/p5/M3_2.doc. (26 กันยายน 2558).
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2554. ประวัติความเป็นมาของข้าว. (ออนไลน์).
<http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice-histories.html>. (2 พฤศจิกายน 2558).
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2556. (ออนไลน์).
www.oae.go.th/download/download_journal/yearbook56.pdf. (21 มกราคม 2558).
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2556. (ออนไลน์).
http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_web/download/journal/trends2556. (2 พฤศจิกายน 2558).



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวสำเร็จรูปสำหรับ *Azospirillum* (NFb medium)

ส่วนที่ 1

| | | |
|--------------------|-------|------|
| กรดมาลิก | 5.00 | กรัม |
| ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต | 0.50 | กรัม |
| เฟอร์รัสฟอสเฟต | 0.50 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 0.01 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 0.20 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 0.10 | กรัม |
| โบรโมไทมอล บลู | 0.002 | กรัม |
| โซเดียมโมลิบเดต | 0.002 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 0.02 | กรัม |
| ผงวุ้น | 1.75 | กรัม |

ส่วนที่ 2

| | | |
|----------------------|------|------|
| โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ | 4.00 | กรัม |
|----------------------|------|------|

ชั่งส่วนที่ 1 8.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดจนอาหารละลายในน้ำจนหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเติม 1.3-1.5 กรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร

2. Nutrient broth

| | | |
|-----------------|------|-----------|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3.0 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 5.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Potato Dextrose agar

| | | |
|--------------------|------|-----------|
| อาหารสำเร็จรูป PDB | 24.0 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. *Azospirillum* agar medium

| | | |
|----------------------------|-------|-----------|
| ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต | 0.5 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 0.2 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 0.1 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ | 0.5 | กรัม |
| เฟอร์ริกคลอไรด์ | 0.015 | กรัม |
| กรดมาลิก | 5.0 | กรัม |
| โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ | 4.8 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient agar

| | | |
|-----------------|------|-----------|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3.0 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 5.0 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 2x Potato Dextrose agar

| | | |
|--------------------|------|-----------|
| อาหารสำเร็จรูป PDB | 48.0 | กรัม |
| ผงวุ้น | 30.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. National Botanical Research Institute's Phosphate Growth medium (NBRIP)

| | | |
|-------------------|------|-----------|
| กลูโคส | 10.0 | กรัม |
| แคลเซียมฟอสเฟต | 5.0 | กรัม |
| แมกนีเซียมคลอไรด์ | 5.0 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 0.25 | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ | 0.2 | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 0.1 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Chrome Azurol Sulfonate (CAS) agar

ส่วนที่ 1

ส่วนที่ 1.1

โครมอะซุรอล เอส 0.061 กรัม ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ส่วนที่ 1.2

เพอร์ริกคลอไรด์ 0.0027 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ส่วนที่ 1.3

HDTMA 0.073 กรัม ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 40 มิลลิลิตร

นำสารส่วนที่ 1.1 ผสมกับสารส่วนที่ 1.2 จากนั้นตามด้วยสารส่วนที่ 1.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ส่วนที่ 2

ส่วนที่ 2.1

| | | |
|----------------------------|------|-----------|
| MOPs | 30.0 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 0.5 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 0.3 | กรัม |
| แอมโมเนียมคลอไรด์ | 0.1 | กรัม |
| แอล-แอสพาราจिन | 0.5 | กรัม |
| น้ำกลั่นสองครั้ง | 880 | มิลลิลิตร |

ส่วนที่ 2.2

สารละลายกลูโคส 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ผสมกับสารละลายส่วนที่ 2.1 ปริมาตร 880 มิลลิลิตรและสารละลายส่วนที่ 2.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายส่วนที่ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล 15 %

| | | |
|----------------|-------|-----------|
| กลีเซอรอล 87 % | 17.24 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 82.76 | มิลลิลิตร |

ผสมกลีเซอรอลและน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (Broughton และ Dilworth, 1971)

สารละลายเข้มข้นส่วนที่ 1

| | | |
|-----------------|-------|-----------|
| แคลเซียมคลอไรด์ | 294.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

สารละลายเข้มข้นส่วนที่ 2

| | | |
|----------------------------|-------|-----------|
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 136.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

สารละลายเข้มข้นส่วนที่ 3

| | | |
|--------------------|-------|-----------|
| เฟอร์ริกซิเตรต | 6.7 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 123.3 | กรัม |
| ไดโพแทสเซียมซัลเฟต | 87.0 | กรัม |
| แมงกานีสซัลเฟต | 0.338 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

สารละลายเข้มข้นส่วนที่ 4

| | | |
|-----------------|-------|-----------|
| กรดบอริก | 0.247 | กรัม |
| ซิงค์ซัลเฟต | 0.288 | กรัม |
| คอปเปอร์ซัลเฟต | 0.100 | กรัม |
| โคบอลต์ซัลเฟต | 0.056 | กรัม |
| โซเดียมโมลิบเดต | 0.048 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

สำหรับการเตรียมสารละลายอาหารสำหรับพืชที่ปราศจากไนโตรเจนปริมาตร 10.0 ลิตรโดยใช้สารละลายส่วนที่ 1-4 ส่วนละ 5.0 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 5.0 ลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10.0 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.6-6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อะการโรสเจลเข้มข้น 1.0%

| | | |
|----------------|-----|-----------|
| ผงอะการโรสเจล | 1.0 | กรัม |
| 1XTAE บัฟเฟอร์ | 100 | มิลลิลิตร |

ละลายผงอะการโรสเจลใน 1XTAE บัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในแม่พิมพ์ที่มีช่องใส่ตัวอย่างระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนอะการโรสเจลแข็งตัว

4. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate TAE

| | | |
|----------------------------------|-------|-----------|
| Trizma base | 121 | กรัม |
| กรดอะซีติกเข้มข้น | 28.55 | กรัม |
| สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 50 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 6X loading dye

บรอมฟินอลบลู 0.025%

ซูโครส 40%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตาม

1 kb DNA ladder 3 ไมโครลิตร

6X loading dye 1 ไมโครลิตร

น้ำปลอดประจุ 2 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน

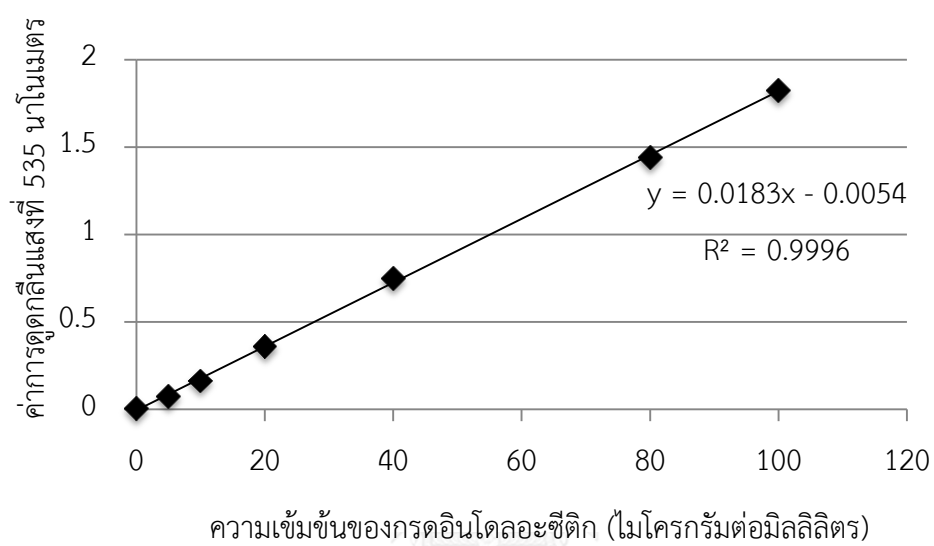
7. เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะปิดสนิท

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานกรดอินโดลอะซีติก วิเคราะห์ด้วยสารละลาย Salkowski



ภาคผนวก ง

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

1.1 PNPB3

ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTTCGGTTTCG
 GAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCCGGATACGTCTTCGGGAGAAAGTTCACGCCGAG
 AGAGGGGCCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGTA
 GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACT
 GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGCCTGTTTAGTCAGAAAGTAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 AATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAGTGTAGAGG
 TGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGAC
 GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
 GATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGCATTAAGCATTCGG
 CCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCCTTGACATGTCCACTAT
 GGTGCCGAGAGATTGGGTTCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTTGTGCG
 TCAGCCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAGCTGCAACCCCTACCGTCAG
 TTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGA
 TGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAG
 TGGGACGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACCTCT
 GCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC
 GTTCCCCGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCAT

1.2 PNPB5

ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTTCGGTTTCG
 GAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCCGGATACGTCTTCGGGAGAAAGTTCACGCCGAG
 AGAGGGGCCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGTA
 GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACT
 GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGCCTGTTTAGTCAGAAAGTAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 AATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAGTGTAGAGG
 TGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGAC
 GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
 GATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGGCATTAAAGCATTCG
 GCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAGACTCAAAGGAATTTGACGGGGGGCCCCGACAAGCG
 GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCCTTGACATGTCCAC
 TATGGTGCAGAGATTGGCATCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTTT
 GTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCA
 GTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGG
 ATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACA
 GTGGGACGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACCTC
 TGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA
 CGTCCCCGGCCTTGTACACACCCG

1.3 PNPB6

AACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTTCGGTTC
 GGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCTTCGGGAGAAAGTTCACGCCGA
 GAGAGGGGCCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGT
 AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGAGTGATG
 AAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGAAGC
 CCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAC
 TGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGG
 GAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAGTGTAGAG
 GTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGA
 CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 CGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGCATTAAGCATTC
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGT
 GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTAT
 GGTGCCGAGAGATTGGGTTCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGT
 CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGC
 CATCATTACAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGAC
 GTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGG
 ACGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAA
 CTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTT
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGACGGTGCCT
 AAC

1.4 PNPB7

GTCGACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTTCGG
 TTCGGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCTTCGGGAGAAAGTTCACGC
 CGAGAGAGGGGCCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATC
 CGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGAGTG
 ATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGA
 AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAAT
 TACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACC
 TGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAGTGT
 GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACAC
 TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGCATTAAGCAT
 TCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCAC
 TATGGTGCCGAGAGATTGGGATCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGT
 TGCCATCATTACAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGAT
 GACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGT
 GGGACCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTCTG
 CAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCCATG

1.5 PNPB9

TTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGAATAACG
 TCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCTTTCGGGAGAAAAGTTCACGCCGAGAGAGGGGC
 CCGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGTAGCTGGTCT
 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTA
 GGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAA
 CTTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAA
 AGGGCGGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTT
 TTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAGAGGATGGTGGAATTCCAGTGATAGAGGTGAAATTC
 GTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGC
 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATG
 CTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGA
 GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCCGAG
 AGATTGGGACCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTCA
 GTTGGGCACTCTGGTGGAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCC
 TCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAGT
 CGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGC
 ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA

1.6 TS24

CGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGGATAACGTC
 TGGAACCGGACGCTAACACCGGATACGTCTTTCGGGAGAAAAGTTTACGCCGAGAGAGGGGGCC
 GCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGCCGACGATCCGTAGCTGGTCTGA
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGG
 GTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACT
 TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG
 GCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACGGCTTTT
 GATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAGAGGATGGTGGAATTCCAGTGATAGAGGTGAAATTCGT
 AGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGC
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCT
 AGACGCTGGGGTGCATGCACTTCGGTGTGCGCCGTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
 TTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTACCGGCTCGAGAG
 ATCGGGCTTTCAGTTCGGCTGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTACCGCCAGTTGCCATCATTAGTT
 GGGCACTCTGGTGGAACCTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCTCA
 TGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCGAAGTGC
 AAGATGGAGCCAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATG
 AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGGTGGTGCGTAACCCGCAAGG
 AGGCAGCCAACCACGGTCAGGTCA

2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ

ฐานข้อมูลใน GenBank

2.1 PNPB3

Azospirillum zeae strain U31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KT345631.1|](#)

Length = 1317, Strand = Plus/Plus

Score = 2324 bits (1258), Expect = 0.0

Identities = 1283/1294 (99%), Gap = 5/1294 (0%)

```

Query 1      ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACCGTGGGAACCTGCCTTTCGGT 60
            |||
Sbjct 7      ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACCGTGGGAACCTGCCTTTCGGT 66

Query 61     TCGGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTTAC 120
            |||
Sbjct 67     TCGGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTTAC 126

Query 121    GCCGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGA 180
            |||
Sbjct 127    GCCGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGA 186

Query 181    CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC 240
            |||
Sbjct 187    CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC 246

Query 241    TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG 300
            |||
Sbjct 247    TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG 306

Query 301    CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACG 360
            |||
Sbjct 307    CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACG 366

Query 361    GTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG 420
            |||
Sbjct 367    GTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG 426

Query 421    CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGCCTGTTTAGTCAGAAG 480
            |||
Sbjct 427    CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGCCTGTTTAGTCAGAAG 486

Query 481    TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAG 540
            |||
Sbjct 487    TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAG 546

Query 541    AGGATGGTGGAATTCACAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG 600
            |||
Sbjct 547    AGGATGGTGGAATTCACAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG 606

Query 601    GCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA 660
            |||
Sbjct 607    GCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA 666

Query 661    GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATG 720
            |||
Sbjct 667    GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATG 726

Query 721    CACTTCGGTGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT 780
            |||
Sbjct 727    CACTTCGGTGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT 786

```



```

Query 781 AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA 840
      |||
Sbjct 787 AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA 846

Query 841 GCAACGCGCAGAACCTTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCCGAGAGATTGGGT 900
      |||
Sbjct 847 GCAACGCGCAGAACCTTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCTGAGAGATTGGGT 905

Query 901 TCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTTGTTCGTGAGCCTCGTGTTCGT 960
      |||
Sbjct 906 CCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCT-GTCGTGAG-CGTGTTCGT 963

Query 961 GAGATGTTGGGTTAAAGTCCCACAACGAGCTGCAACCCTACCGTCAGTTGCCATCATTC 1020
      |||
Sbjct 964 GAGATGTTGGGTT-AAAGTCCCACAACGAGC-GCAACCCTACCGTCAGTTGCCATCATTC 1021

Query 1021 AGTTGGGCACCTCTGGTGGAAACCGCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAA 1080
      |||
Sbjct 1022 AGTTGGGCACCTCTGGTGGAAACCGCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAA 1081

Query 1081 GTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAC 1140
      |||
Sbjct 1082 GTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAC 1141

Query 1141 GCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA 1200
      |||
Sbjct 1142 GCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA 1201

Query 1201 ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATAC 1260
      |||
Sbjct 1202 ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATAC 1261

Query 1261 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC 1294
      |||
Sbjct 1262 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC 1295

```

2.2 PNPB5

Azospirillum zeae strain U31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KT345631.1|](#)

Length = 1317, Strand = Plus/Plus

Score = 2298 bits (1244), Expect = 0.0

Identities = 1274/1287 (99%), Gap = 7/1287 (0%)

```

Query 1 ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGT 60
      |||
Sbjct 7 ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGT 66

Query 61 TCGGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTAC 120
      |||
Sbjct 67 TCGGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGGAGAAAGTTTAC 126

Query 121 GCCGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGA 180
      |||
Sbjct 127 GCCGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGA 186

Query 181 CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC 240
      |||
Sbjct 187 CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC 246

Query 241 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG 300
      |||
Sbjct 247 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG 306

Query 301 CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACG 360
      |||
Sbjct 307 CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACG 366

```

| | | | |
|-------|------|---|------|
| Query | 361 | GTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGG | 420 |
| | | | |
| Sbjct | 367 | GTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGG | 426 |
| Query | 421 | CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTGTAGTCAGAAG | 480 |
| | | | |
| Sbjct | 427 | CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTGTAGTCAGAAG | 486 |
| Query | 481 | TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAG | 540 |
| | | | |
| Sbjct | 487 | TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAG | 546 |
| Query | 541 | AGGATGGTGAATTTCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG | 600 |
| | | | |
| Sbjct | 547 | AGGATGGTGAATTTCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG | 606 |
| Query | 601 | GCGAAGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACA | 660 |
| | | | |
| Sbjct | 607 | GCGAAGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACA | 666 |
| Query | 661 | GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATG | 720 |
| | | | |
| Sbjct | 667 | GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATG | 726 |
| Query | 721 | CACTTCGGTGTGCGCCGCTAACGGCATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGT | 780 |
| | | | |
| Sbjct | 727 | CACTTCGGTGTGCGCCGCTAAC-GCATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGT | 785 |
| Query | 781 | TAAAGACTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC | 840 |
| | | | |
| Sbjct | 786 | TAAA-ACTCAAAGGAA-TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC | 843 |
| Query | 841 | GAAGCAACGCGCAGAACCTTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCCGAGAGATTG | 900 |
| | | | |
| Sbjct | 844 | GAAGCAACGCGCAGAACCTTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCTGAGAGATTG | 902 |
| Query | 901 | GCATCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTTTGTCGTCAGCTCGTGT | 960 |
| | | | |
| Sbjct | 903 | GCTCCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGC--TGTCGTCAGCTCGTGT | 960 |
| Query | 961 | CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATT | 1020 |
| | | | |
| Sbjct | 961 | CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATT | 1020 |
| Query | 1021 | CAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA | 1080 |
| | | | |
| Sbjct | 1021 | CAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA | 1080 |
| Query | 1081 | AGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGA | 1140 |
| | | | |
| Sbjct | 1081 | AGTCCTCATGGCCCTTATGGGTTGGGTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGA | 1140 |
| Query | 1141 | CGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTTCGATTGCACTCTGC | 1200 |
| | | | |
| Sbjct | 1141 | CGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTTCGATTGCACTCTGC | 1200 |
| Query | 1201 | AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATA | 1260 |
| | | | |
| Sbjct | 1201 | AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATA | 1260 |
| Query | 1261 | CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC | 1287 |
| | | | |
| Sbjct | 1261 | CGTT-CCCGGGCCTTGTACACACCGCC | 1286 |

2.3 PNPB6

Azospirillum zeae strain U31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KT345631.1|](#)

Length = 1317, Strand = Plus/Plus

Score = 2385 bits (1291), Expect = 0.0

Identities = 1306/1313 (99%), Gap = 1/1313 (0%)

```

Query 1      AACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCCG 60
            |||
Sbjct 6      AACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCCG 65

Query 61     TTCGGAATAACGTCTGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCTTCGGGAGAAAGTTCA 120
            |||
Sbjct 66     TTCGGAATAACGTCTGAAACGGACGCTAACACCGGATACGTCTTCGGGGAAAGTTTA 125

Query 121    CGCCGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCG 180
            |||
Sbjct 126    CGCCGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCG 185

Query 181    ACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA 240
            |||
Sbjct 186    ACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA 245

Query 241    CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAAT 300
            |||
Sbjct 246    CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAAT 305

Query 301    GCCCGGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGAC 360
            |||
Sbjct 306    GCCCGGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGAC 365

Query 361    GGTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGG 420
            |||
Sbjct 366    GGTAGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGG 425

Query 421    GCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAA 480
            |||
Sbjct 426    GCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAA 485

Query 481    GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGA 540
            |||
Sbjct 486    GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGA 545

Query 541    GAGGATGGTGGAAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGT 600
            |||
Sbjct 546    GAGGATGGTGGAAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGT 605

Query 601    GGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC 660
            |||
Sbjct 606    GGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC 665

Query 661    AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCAT 720
            |||
Sbjct 666    AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCAT 725

Query 721    GCACTTCGGTGTGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT 780
            |||
Sbjct 726    GCACTTCGGTGTGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT 785

Query 781    TAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA 840
            |||
Sbjct 786    TAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA 845

Query 841    AGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCCTTGACATGTCCACTATGGTGCCGAGAGATTGGGT 900
            |||
Sbjct 846    AGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCCTTGACATGTCCACTATGGTGCTGAGAGATGGGCT 905

```

```

Query 901 TCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 960
          |||
Sbjct 906 CCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 965

Query 961 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTAGTT 1020
          |||
Sbjct 966 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTAGTT 1025

Query 1021 GGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCC 1080
          |||
Sbjct 1026 GGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCC 1085

Query 1081 TCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGA 1140
          |||
Sbjct 1086 TCATGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGA 1145

Query 1141 AGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTC 1200
          |||
Sbjct 1146 AGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTC 1205

Query 1201 GAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGGTGAATACGTTTC 1260
          |||
Sbjct 1206 GAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGGTGAATACGTTTC 1265

Query 1261 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAG 1313
          |||
Sbjct 1266 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACC-TGGGAGTTGGCTTTACCCGAAG 1317

```

2.4 PNPB7

Azospirillum zae strain U31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KT345631.1|](#)

Length = 1317, Strand = Plus/Plus

Score = 2350 bits (1272), Expect = 0.0

Identities = 1288/1295 (99%), Gap = 3/1295 (0%)

```

Query 1 GTCG-ACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTT 59
          |||
Sbjct 2 GTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTT 61

Query 60 TCGGTTTCGGAATAACGCTCTGGAAACGGACGCTAACACCCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAG 119
          |||
Sbjct 62 TCGGTTTCGGAATAACGCTCTGGAAACGGACGCTAACACCCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAG 121

Query 120 TTCACGCCGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAA 179
          |||
Sbjct 122 TTTACGCCGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAA 181

Query 180 GCCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC 239
          |||
Sbjct 182 GCCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC 241

Query 240 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG 299
          |||
Sbjct 242 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG 301

Query 300 CAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGA 359
          |||
Sbjct 302 CAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGA 361

Query 360 TGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAA 419
          |||
Sbjct 362 TGACGGTAGCGTGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAA 421

Query 420 GGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTC 479
          |||
Sbjct 422 GGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTC 481

```

| | | | |
|-------|------|---|------|
| Query | 480 | AGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTC | 539 |
| | | | |
| Sbjct | 482 | AGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTC | 541 |
| Query | 540 | CGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACAC | 599 |
| | | | |
| Sbjct | 542 | CGGAGAGGATGGTGGAAATCCCAAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACAC | 601 |
| Query | 600 | CGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC | 659 |
| | | | |
| Sbjct | 602 | CGGTGGCGAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC | 661 |
| Query | 660 | AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGT | 719 |
| | | | |
| Sbjct | 662 | AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGT | 721 |
| Query | 720 | GCATGCACTTCGGTGTGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGGCCGCA | 779 |
| | | | |
| Sbjct | 722 | GCATGCACTTCGGTGTGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGGCCGCA | 781 |
| Query | 780 | AGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT | 839 |
| | | | |
| Sbjct | 782 | AGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT | 841 |
| Query | 840 | TCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCCGAGAGATT | 899 |
| | | | |
| Sbjct | 842 | TCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGCTGAGAGAT- | 900 |
| Query | 900 | GGGAT-CTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT | 958 |
| | | | |
| Sbjct | 901 | GGGCTCCTTCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT | 960 |
| Query | 959 | CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATT | 1018 |
| | | | |
| Sbjct | 961 | CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATT | 1020 |
| Query | 1019 | CAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA | 1078 |
| | | | |
| Sbjct | 1021 | CAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA | 1080 |
| Query | 1079 | AGTCCTCATGGCCCTTATGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGA | 1138 |
| | | | |
| Sbjct | 1081 | AGTCCTCATGGCCCTTATGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGA | 1140 |
| Query | 1139 | CGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGC | 1198 |
| | | | |
| Sbjct | 1141 | CGCGAAGTCGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGC | 1200 |
| Query | 1199 | AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATA | 1258 |
| | | | |
| Sbjct | 1201 | AACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATA | 1260 |
| Query | 1259 | CGTTCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACC | 1293 |
| | | | |
| Sbjct | 1261 | CGTTCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACC | 1295 |

2.5 PNPB9

Azospirillum zeae strain U31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KT345631.1|](#)

Length = 1317, Strand = Plus/Plus

Score = 2337 bits (1265), Expect = 0.0

Identities = 1280/1287 (99%), Gap = 1/1287 (0%)

```

Query 1      TTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGAATA 60
          |||
Sbjct 67      TTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGAATA 126

Query 61      ACGTCTGGAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTCACGCCGAGAG 120
          |||
Sbjct 127      ACGTCTGGAACGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTTACGCCGAGAG 186

Query 121     AGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGT 180
          |||
Sbjct 187     AGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACGATCCGT 246

Query 181     AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG 240
          |||
Sbjct 247     AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG 306

Query 241     GAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGA 300
          |||
Sbjct 307     GAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGA 366

Query 301     GTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTG 360
          |||
Sbjct 367     GTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTG 426

Query 361     AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT 420
          |||
Sbjct 427     AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT 486

Query 421     GTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCC 480
          |||
Sbjct 487     GTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCC 546

Query 481     CCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAGAGGATGGT 540
          |||
Sbjct 547     CCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCGGGAGAGGATGGT 606

Query 541     GGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGC 600
          |||
Sbjct 607     GGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGC 666

Query 601     GGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA 660
          |||
Sbjct 667     GGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA 726

Query 661     TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGG 720
          |||
Sbjct 727     TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCACTTCGG 786

Query 721     TGTCCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA 780
          |||
Sbjct 787     TGTCCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA 846

Query 781     AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG 840
          |||
Sbjct 847     AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG 906

Query 841     CAGAACCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGTGC-CGAGAGATTGGGACCTTCGGT 899
          |||
Sbjct 907     CAGAACCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTTGG-GCTCGAGAGATCGGGTCCCTTCAGT 965

```

```

Query 900   TCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG   959
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 966   TCGGCTGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG   1025

Query 960   GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTC   1019
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1026  GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTC   1085

Query 1020  TGGTGAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCCATGGCC   1079
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1086  TGGTGAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCCATGGCC   1145

Query 1080  CTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAGTCGCGA   1139
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1146  CTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAGTCGCGA   1205

Query 1140  GATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAT   1199
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1206  GATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAT   1265

Query 1200  GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT   1259
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1266  GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT   1325

Query 1260  TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA   1287
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1326  TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA   1353

```

2.6 TS24

Azospirillum brasilense strain Az39 plasmid AbAZ39_p4, complete sequence

Sequence ID: [gb|CP007797.1|](#)

Length = 641573, Strand = Plus/Minus

Score = 2471 bits (1338), Expect = 0.0

Identities = 1344/1347 (99%), Gap = 0/1347 (0%)

```

Query 1      CGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGGATAAC   60
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511963  CGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTCGGGATAAC   511904

Query 61     GTCTGGAACCGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTTACGCCGAGAGAG   120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511903  GTCTGGAACCGGACGCTAACACCGGATACGTCCTTCGGGAGAAAGTTTACGCCGAGAGAG   511844

Query 121    GGGCCCGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGCCGACGATCGGTAG   180
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511843  GGGCCCGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGCCGACGATCGGTAG   511784

Query 181    CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA   240
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511783  CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA   511724

Query 241    GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGT   300
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511723  GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGT   511664

Query 301    GATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAG   360
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511663  GATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGTAGCGTGAG   511604

Query 361    AAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCGAGCGTTGT   420
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 511603  AAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCGAGCGTTGT   511544

```

| | | | |
|-------|--------|--|--------|
| Query | 421 | TCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCCCC | 480 |
| Sbjct | 511543 | TCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTGAAAGCCCC | 511484 |
| Query | 481 | GGGCTTAACCTGGGAACGGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGG | 540 |
| Sbjct | 511483 | GGGCTTAACCTGGGAACGGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAGGATGGTGG | 511424 |
| Query | 541 | AATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGG | 600 |
| Sbjct | 511423 | AATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGG | 511364 |
| Query | 601 | CCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA | 660 |
| Sbjct | 511363 | CCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA | 511304 |
| Query | 661 | CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGCTGGGGTGCATGCACTTCGGTG | 720 |
| Sbjct | 511303 | CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGCTGGGGTGCATGCACTTCGGTG | 511244 |
| Query | 721 | TCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAA | 780 |
| Sbjct | 511243 | TCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAA | 511184 |
| Query | 781 | GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCA | 840 |
| Sbjct | 511183 | GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCA | 511124 |
| Query | 841 | GAACCTTACCAACCCCTTGACATGTCCACTACCGGCTCGAGAGATCGGGCTTTCAGTTCGG | 900 |
| Sbjct | 511123 | GAACCTTACCAACCCCTTGACATGTCCACTACCGGCTCGAGAGATCGGGCTTTCAGTTCGG | 511064 |
| Query | 901 | CTGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA | 960 |
| Sbjct | 511063 | CTGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA | 511004 |
| Query | 961 | AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGCCAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTGGT | 1020 |
| Sbjct | 511003 | AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGCCAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTGGT | 510944 |
| Query | 1021 | GGAAGTCCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTA | 1080 |
| Sbjct | 510943 | GGAAGTCCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTA | 510884 |
| Query | 1081 | TGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCGAAGTCGCAAGATG | 1140 |
| Sbjct | 510883 | TGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAGTCGCAAGATG | 510824 |
| Query | 1141 | GAGCCAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAG | 1200 |
| Sbjct | 510823 | GAGCCAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAG | 510764 |
| Query | 1201 | TTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA | 1260 |
| Sbjct | 510763 | TTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA | 510704 |
| Query | 1261 | CACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGGTGGTGCCTAACCCGCAA | 1320 |
| Sbjct | 510703 | CACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGGTGGTGCCTAACCCGCAA | 510644 |
| Query | 1321 | GGGAGGCAGCCAACCACGGTCAGGTCA | 1347 |
| Sbjct | 510643 | GGGAGGCAGCCAACCACGGTCAGGTCA | 510617 |

ภาคผนวก จ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของ *Azospirillum* sp. ต่อดันข้าวด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

Test of Homogeneity of Variances

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|--------------|------------------|-----|-----|------|
| Weightofroot | 1.529 | 16 | 34 | .146 |
| weightoftree | 1.891 | 16 | 34 | .058 |
| highofroot | 1.073 | 16 | 34 | .415 |
| heightoftree | .739 | 16 | 34 | .736 |
| yellowleaf | .688 | 16 | 34 | .786 |

ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Weightofroot | Between Groups | 54.583 | 16 | 3.411 | 3.507 | .001 |
| | Within Groups | 33.073 | 34 | .973 | | |
| | Total | 87.656 | 50 | | | |
| weightoftree | Between Groups | 152.634 | 16 | 9.540 | 6.733 | .000 |
| | Within Groups | 48.173 | 34 | 1.417 | | |
| | Total | 200.807 | 50 | | | |
| highofroot | Between Groups | 3313.412 | 16 | 207.088 | 4.487 | .000 |
| | Within Groups | 1569.333 | 34 | 46.157 | | |
| | Total | 4882.745 | 50 | | | |
| heightoftree | Between Groups | 24574.824 | 16 | 1535.926 | 24.947 | .000 |
| | Within Groups | 2093.333 | 34 | 61.569 | | |
| | Total | 26668.157 | 50 | | | |
| yellowleaf | Between Groups | 39.176 | 16 | 2.449 | 5.203 | .000 |
| | Within Groups | 16.000 | 34 | .471 | | |
| | Total | 55.176 | 50 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Weightofroot

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| PNPHB7 | 3 | 10.4333 | | | | |
| control | 3 | 10.6333 | 10.6333 | | | |
| control plus no3 | 3 | 11.1667 | 11.1667 | 11.1667 | | |
| TS8 | 3 | 11.4667 | 11.4667 | 11.4667 | | |
| PNPHB6 | 3 | 11.5333 | 11.5333 | 11.5333 | | |
| PNPHB3 | 3 | 11.8667 | 11.8667 | 11.8667 | 11.8667 | |
| PNPHB5 | 3 | 12.1333 | 12.1333 | 12.1333 | 12.1333 | 12.1333 |
| PE8 | 3 | | 12.3667 | 12.3667 | 12.3667 | 12.3667 |
| PNCNX7 | 3 | | 12.5000 | 12.5000 | 12.5000 | 12.5000 |
| SBUT9 | 3 | | | 12.7667 | 12.7667 | 12.7667 |
| PE9 | 3 | | | 12.8000 | 12.8000 | 12.8000 |
| PNPHB9 | 3 | | | 12.8667 | 12.8667 | 12.8667 |
| SBUT6 | 3 | | | 13.1000 | 13.1000 | 13.1000 |
| TS14 | 3 | | | 13.1000 | 13.1000 | 13.1000 |
| TS24 | 3 | | | | 13.5000 | 13.5000 |
| TS11 | 3 | | | | | 13.9667 |
| PNCNX8 | 3 | | | | | 14.0000 |
| Sig. | | .074 | .052 | .050 | .093 | .057 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

weightofree

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| PNPHB3 | 3 | 8.3333 | | | | |
| PNPHB9 | 3 | 8.6000 | 8.6000 | | | |
| control | 3 | 8.6333 | 8.6333 | | | |
| PNPHB5 | 3 | 9.0667 | 9.0667 | | | |
| PNPHB6 | 3 | 9.1000 | 9.1000 | | | |
| PE8 | 3 | 9.6333 | 9.6333 | | | |
| PE9 | 3 | 9.7667 | 9.7667 | | | |
| PNPHB7 | 3 | 9.9667 | 9.9667 | 9.9667 | | |
| control plus no3 | 3 | 10.2333 | 10.2333 | 10.2333 | | |
| TS8 | 3 | | 10.8000 | 10.8000 | 10.8000 | |
| SBUT9 | 3 | | | 12.0000 | 12.0000 | 12.0000 |
| PNCNX8 | 3 | | | 12.1333 | 12.1333 | 12.1333 |
| TS24 | 3 | | | | 12.4333 | 12.4333 |
| PNCNX7 | 3 | | | | 12.6667 | 12.6667 |
| SBUT6 | 3 | | | | 13.0000 | 13.0000 |
| TS14 | 3 | | | | 13.0333 | 13.0333 |
| TS11 | 3 | | | | | 13.4000 |
| Sig. | | .104 | .060 | .052 | .052 | .221 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

heightofroot

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| control | 3 | 40.6667 | | | | | |
| SBUT6 | 3 | 49.3333 | 49.3333 | | | | |
| SBUT9 | 3 | 50.0000 | 50.0000 | | | | |
| PE9 | 3 | 51.3333 | 51.3333 | 51.3333 | | | |
| PNCNX8 | 3 | 51.6667 | 51.6667 | 51.6667 | | | |
| PNPHB6 | 3 | 52.6667 | 52.6667 | 52.6667 | | | |
| PNCNX7 | 3 | 53.3333 | 53.3333 | 53.3333 | | | |
| TS14 | 3 | 53.3333 | 53.3333 | 53.3333 | | | |
| PNPHB7 | 3 | | 56.0000 | 56.0000 | 56.0000 | | |
| PNPHB9 | 3 | | 56.0000 | 56.0000 | 56.0000 | | |
| TS24 | 3 | | 57.0000 | 57.0000 | 57.0000 | 57.0000 | |
| TS8 | 3 | | 62.0000 | 62.0000 | 62.0000 | 62.0000 | 62.0000 |
| PNPHB3 | 3 | | | 63.6667 | 63.6667 | 63.6667 | 63.6667 |
| TS11 | 3 | | | | 67.0000 | 67.0000 | 67.0000 |
| PNPHB5 | 3 | | | | 67.6667 | 67.6667 | 67.6667 |
| control plus no3 | 3 | | | | | 69.3333 | 69.3333 |
| PE8 | 3 | | | | | | 70.6667 |
| Sig. | | .056 | .061 | .066 | .075 | .057 | .179 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

heightoftree

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| control | 3 | 134.6667 | | | | | | | |
| PNPHB3 | 3 | 142.6667 | 142.6667 | | | | | | |
| PNPHB5 | 3 | | 151.3333 | 151.3333 | | | | | |
| PNPHB7 | 3 | | 152.3333 | 152.3333 | | | | | |
| PNPHB6 | 3 | | 156.6667 | 156.6667 | | | | | |
| PNPHB9 | 3 | | | 160.6667 | 160.6667 | | | | |
| PNCNX7 | 3 | | | 165.6667 | 165.6667 | 165.6667 | | | |
| SBUT9 | 3 | | | | 174.0000 | 174.0000 | 174.0000 | | |
| PNCNX8 | 3 | | | | | 175.6667 | 175.6667 | | |
| PE9 | 3 | | | | | 176.3333 | 176.3333 | | |
| TS8 | 3 | | | | | | 181.3333 | 181.3333 | |
| PE8 | 3 | | | | | | 182.6667 | 182.6667 | |
| SBUT6 | 3 | | | | | | | 193.6667 | 193.6667 |
| control plus no3 | 3 | | | | | | | | 196.6667 |
| TS11 | 3 | | | | | | | | 205.0000 |
| TS24 | 3 | | | | | | | | 206.3333 |
| TS14 | 3 | | | | | | | | 207.0000 |
| Sig. | | .220 | .052 | .052 | .056 | .137 | .237 | .076 | .070 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

yellowleaf

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| PE9 | 3 | .0000 | | | |
| PE8 | 3 | .3333 | .3333 | | |
| SBUT6 | 3 | .3333 | .3333 | | |
| SBUT9 | 3 | .6667 | .6667 | .6667 | |
| TS14 | 3 | .6667 | .6667 | .6667 | |
| TS24 | 3 | .6667 | .6667 | .6667 | |
| PNCNX7 | 3 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |
| PNCNX8 | 3 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |
| PNPHB6 | 3 | 1.3333 | 1.3333 | 1.3333 | |
| PNPHB7 | 3 | 1.3333 | 1.3333 | 1.3333 | |
| PNPHB9 | 3 | 1.3333 | 1.3333 | 1.3333 | |
| TS8 | 3 | 1.3333 | 1.3333 | 1.3333 | |
| PNPHB5 | 3 | | 1.6667 | 1.6667 | |
| TS11 | 3 | | 1.6667 | 1.6667 | |
| control plus no3 | 3 | | 1.6667 | 1.6667 | |
| PNPHB3 | 3 | | | 2.0000 | |
| control | 3 | | | | 4.0000 |
| Sig. | | .052 | .054 | .053 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลการส่งเสริมการเจริญทางกายภาพของแบคทีเรียจากน้ำ
ทะเลต่อต้นข้าวด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

Test of Homogeneity of Variances

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|--------------|------------------|-----|-----|------|
| weightofroot | .253 | 3 | 16 | .858 |
| weightofree | 1.071 | 3 | 16 | .389 |
| heightofroot | 3.009 | 3 | 16 | .061 |
| heightofree | 2.286 | 3 | 16 | .118 |
| yellowleaf | .125 | 3 | 16 | .944 |



ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| weightofroot | Between Groups | 3.066 | 3 | 1.022 | 4.629 | .016 |
| | Within Groups | 3.532 | 16 | .221 | | |
| | Total | 6.598 | 19 | | | |
| weightofree | Between Groups | 43.708 | 3 | 14.569 | 4.628 | .016 |
| | Within Groups | 50.364 | 16 | 3.148 | | |
| | Total | 94.072 | 19 | | | |
| heightofroot | Between Groups | 4748.950 | 3 | 1582.983 | 11.429 | .000 |
| | Within Groups | 2216.000 | 16 | 138.500 | | |
| | Total | 6964.950 | 19 | | | |
| heightofree | Between Groups | 8287.600 | 3 | 2762.533 | 3.297 | .048 |
| | Within Groups | 13407.200 | 16 | 837.950 | | |
| | Total | 21694.800 | 19 | | | |
| yellowleaf | Between Groups | .950 | 3 | .317 | .844 | .489 |
| | Within Groups | 6.000 | 16 | .375 | | |
| | Total | 6.950 | 19 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

weightofroot

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| control | 5 | 12.1000 | |
| TD12-11 | 5 | 12.1600 | |
| TU13-9 | 5 | 12.5600 | 12.5600 |
| TW1-1N9 | 5 | | 13.0800 |
| Sig. | | .161 | .099 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

weightofree

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| control | 5 | 12.2600 | |
| TD12-11 | 5 | 12.6600 | |
| TU13-9 | 5 | | 15.1200 |
| TW1-1N9 | 5 | | 15.6400 |
| Sig. | | .726 | .649 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

heightofrootDuncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| TW1-1N9 | 5 | 27.2000 | |
| TD12-11 | 5 | 33.0000 | |
| TU13-9 | 5 | 36.6000 | |
| control | 5 | | 67.0000 |
| Sig. | | .249 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

heightoftreeDuncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| control | 5 | 193.4000 | |
| TD12-11 | 5 | 227.8000 | 227.8000 |
| TW1-1N9 | 5 | | 236.4000 |
| TU13-9 | 5 | | 248.0000 |
| Sig. | | .079 | .311 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

yellowleaf

Duncan^a

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 |
|-----------|---|----------------------------|
| | | 1 |
| TU13-9 | 5 | .8000 |
| control | 5 | 1.0000 |
| TD12-11 | 5 | 1.0000 |
| TW1-1N9 | 5 | 1.4000 |
| Sig. | | .172 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลการทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในต้นข้าวที่เกิดจากราด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

Test of Homogeneity of Variances

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|--------------|------------------|-----|-----|------|
| weightofroot | 1.769 | 6 | 62 | .120 |
| weightoftree | 1.738 | 6 | 62 | .127 |
| heightofroot | .764 | 6 | 62 | .601 |
| heightoftree | .299 | 6 | 62 | .935 |

ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| weightofroot | Between Groups | 25.495 | 6 | 4.249 | 2.115 | .064 |
| | Within Groups | 124.543 | 62 | 2.009 | | |
| | Total | 150.038 | 68 | | | |
| weightoftree | Between Groups | 298.593 | 6 | 49.765 | 5.995 | .000 |
| | Within Groups | 514.638 | 62 | 8.301 | | |
| | Total | 813.231 | 68 | | | |
| heightofroot | Between Groups | 5605.689 | 6 | 934.282 | 5.086 | .000 |
| | Within Groups | 11389.789 | 62 | 183.706 | | |
| | Total | 16995.478 | 68 | | | |
| heightoftree | Between Groups | 49380.379 | 6 | 8230.063 | 9.659 | .000 |
| | Within Groups | 52830.447 | 62 | 852.104 | | |
| | Total | 102210.826 | 68 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

weightofroot

Duncan^{a,b}

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|----------------|----|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| control | 10 | 11.2600 | | |
| PNPHB9+TD12-11 | 10 | 11.4900 | 11.4900 | |
| PNPHB3+TD12-11 | 10 | 12.4300 | 12.4300 | 12.4300 |
| PNPHB5+TD12-11 | 10 | 12.4400 | 12.4400 | 12.4400 |
| PNPHB3+TW1-1N9 | 10 | 12.5200 | 12.5200 | 12.5200 |
| PNPHB5+TW1-1N9 | 9 | | 12.8333 | 12.8333 |
| PNPHB9+TW1-1N9 | 10 | | | 12.9900 |
| Sig. | | .083 | .064 | .444 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.844.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

weightoftreeDuncan^{a,b}

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|----------------|----|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| control | 10 | 8.5000 | |
| PNPHB9+TD12-11 | 10 | | 12.1000 |
| PNPHB5+TD12-11 | 10 | | 12.8900 |
| PNPHB3+TW1-1N9 | 10 | | 13.8000 |
| PNPHB3+TD12-11 | 10 | | 14.3400 |
| PNPHB5+TW1-1N9 | 9 | | 14.5889 |
| PNPHB9+TW1-1N9 | 10 | | 15.0200 |
| Sig. | | 1.000 | .051 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.844.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

heightofrootDuncan^{a,b}

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|----------------|----|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| PNPHB5+TD12-11 | 10 | 32.6000 | | |
| PNPHB3+TD12-11 | 10 | 35.7000 | | |
| control | 10 | 36.0000 | | |
| PNPHB9+TD12-11 | 10 | 36.6000 | | |
| PNPHB3+TW1-1N9 | 10 | 45.8000 | 45.8000 | |
| PNPHB9+TW1-1N9 | 10 | | 49.6000 | 49.6000 |
| PNPHB5+TW1-1N9 | 9 | | | 60.1111 |
| Sig. | | .057 | .536 | .090 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.844.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

heightoftree

Duncan^{a,b}

| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|----------------|----|-------------------------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| control | 10 | 137.5000 | | |
| PNPHB3+TW1-1N9 | 10 | | 175.3000 | |
| PNPHB5+TD12-11 | 10 | | 196.0500 | 196.0500 |
| PNPHB9+TD12-11 | 10 | | 202.9000 | 202.9000 |
| PNPHB5+TW1-1N9 | 9 | | | 214.4444 |
| PNPHB9+TW1-1N9 | 10 | | | 215.6000 |
| PNPHB3+TD12-11 | 10 | | | 215.7000 |
| Sig. | | 1.000 | .051 | .191 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.844.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used.

Type I error levels are not guaranteed.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ลินดา อารีย์ เกิดวันศุกร์ที่ 14 กันยายน 2533 ที่จังหวัดสมุทรปราการ จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ปัจจุบัน 41 หมู่ 17 ถนนนครเขื่อนขันธ์ ตำบลบางพึ่ง อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง “Characterization of *Azospirillum* spp. with plant promoting abilities, and biocontrol of rice disease caused by *Rhizoctonia solani* using marine bacteria”