



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุ
โรคขอบใบแห้งของข้าว และการควบคุมโรคโดยชีววิธี

Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Caused Bacterial Leaf
Blight of Rice and Its Biological Control

นามผู้วิจัย นางสาววราภรณ์ ภูักดีพันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อนงค์นุช สาสนรักกิจ, วท.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

()

รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุ
โรคขอบใบแห้งของข้าว และการควบคุมโรคโดยชีววิธี

Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Caused Bacterial Leaf Blight of
Rice and Its Biological Control

โดย

นางสาววารกรณ์ ภูักคี่พันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2554

วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ 2554: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และการควบคุมโรคโดยชีววิธี ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D. 151 หน้า

แบคทีเรียโคลิโนสียเหลืองที่แยกเชื้อจากข้าวเป็นโรคขอบใบแห้ง (BLB) จำนวน 231 สายพันธุ์ ได้วิเคราะห์ความสามารถในการก่อโรค ลักษณะชีววิทยาและโมเลกุล (16S rDNA) พบว่าเชื้อสาเหตุทุกสายพันธุ์คือ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama 1922) Swings et al. 1990 (Xoo) เชื้อเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างกัน 2 กลุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วย rep-PCR โดยกลุ่มใหญ่ (69.7%) เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงที่ทำให้ลายใบข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ 105) เป็นโรครุนแรง 13-50 % เชื้ออีกกลุ่มเป็นสายพันธุ์อ่อนแอที่ก่อให้เกิดโรค 1-12 % และพบว่าเฉพาะเชื้อสายพันธุ์รุนแรงเท่านั้นที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp จากไพรเมอร์ ERIC และ BOX ได้ชัดเจน ขณะที่แถบ 495 bp ของเชื้อทั้งสองกลุ่มสามารถสังเคราะห์ได้โดย BOX เมื่อพัฒนากลยุทธ์การควบคุมโรคนี้ด้วยเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ (*Bacillus subtilis* XA6) ผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดต่าง ๆ พบว่า XA6 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์ชนิดใหม่ (MSP-medium) และมีชีวิตรอดได้ดีที่สุด (1×10^8 CFU/g) ในผลิตภัณฑ์แบบผงชนิดใหม่ (XA6 talc-based formulation) หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน ชีวภัณฑ์ชนิดนี้ลดความรุนแรงโรค BLB ที่เกิดกับข้าวพันธุ์ด้านทาน (สุพรรณบุรี 1) และอ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ 105) 72 และ 65 % ตามลำดับ รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชซึ่งสัมพันธ์กับการกระตุ้นให้ข้าวสะสม β -1,3-glucanase ปกป้องตนเองเพิ่มขึ้นได้ดีที่สุด เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ ISR-B (*B. amyloliquefaciens* KPS46) และสารควบคุมโรคแบคทีเรีย copper hydroxide เมื่อนำไปทดสอบในสภาพไร่ด้วยการคลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวม 6 ครั้ง ชีวผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ยังคงมีประสิทธิภาพสม่ำเสมอในการลดความรุนแรงโรค BLB 61 % และเพิ่มการสะสมเอนไซม์ ปกป้องพืชตลอดจนเพิ่มผลผลิตข้าว 67.7% ได้ดีที่สุดในแง่ต่างทางสถิติ ($P=0.05$)

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Waraporn Pupakdeepon 2011: Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Caused Bacterial Leaf Blight of Rice and Its Biological Control. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 151 pages

The 231 strains of a yellow pigment colony isolated from bacterial leaf blight (BLB) of rice were first characterized for pathogenicity, biological and molecular (16s rDNA) analyses that they all found to be *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama 1922) Swings *et al.* 1990 (Xoo). The diversity of these bacterial strains were assessed with polymerase chain reaction and repetitive DNA sequence (rep-PCR). Genetic diversity among Xoo strains revealed two-distinct groups, one majority (69.7%) was virulent that correlated with induced 13-50% leaf area infection on susceptible cv. KDML105, and another minority consisted less virulence strains of 1-12% leaf area infected. The ERIC and BOX primers were accurate to yield a specific 800 bp fragment that could be detected from virulent strains only, where the 495 bp was found in all 231-Xoo strains with BOX. The development of control strategy with the new antagonist strain *Bacillus subtilis* XA6 was prepared in different formulations. Strain XA6 grew profusely in a new MSP medium for biomass production and survived in a new powder formulation (XA6 talc-based) at 1×10^8 cfu/g for 12 months at room temperature. This formulated product greatly decreased BLB severity on resistant Supanburi1 and susceptible KDML105 by 72 and 65% respectively and increased plant growth promotion that was correlated with highest accumulation of defense related enzymes β -1,3 glucanase compared to ISR-B (*B. amyloliquefaciens* KPS46) and copper hydroxide. Seed and 6-foliar-spray treatments of cv. KDML105 with this XA6 talc-based formulation was also the most consistent in significantly 61% BLB reduction under field experiment that correlated with increased defense-related enzyme and 67.7 % yield increased (P=0.05).

Student' s signature

Thesis Advisor' s signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุทธฤดี ประเทืองวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำทางด้านวิชาการ แนวคิดในการทำงานวิจัย ตลอดจนการแนะนำเอาใจใส่ในทุกด้าน ทั้งในการให้กำลังใจในการเรียนและการดำเนินชีวิตที่ดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อนงกันขุ สาสนรักกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทางด้านวิชาการ ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ด้วยดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.สมศิริ แสงโชติ อาจารย์วันเพ็ญ ศรีทองชัย ที่ได้กรุณาตรวจ แก้ไข และแนะนำทางด้านวิชาการในการเขียนวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สาทิตร ตระกูลนำเลื่อมใส อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุพจน์ กาเข้ม และอาจารย์ ดร. จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ ดร. คุณิต อธิวัฒน์ น.ส.ติยากร นัตรนภารัตน์ น.ส.วิลาวรรณ เชื้อบุญ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ แนวคิดในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ น.ส.นลินา เหมสนิท น.ส.สุนันทนา นุราชักดิ์ น.ส.อนิสรา สุโลมาน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่ดีตลอดการทำงานวิจัยจนแล้วเสร็จ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของกรมวิชาการเกษตรที่ได้สนับสนุนด้านเมล็ดพันธุ์ข้าวและเชื้อสาเหตุโรคสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่เอื้ออำนวยความสะดวกและความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่เป็นกำลังใจ กำลังกาย กำลังความคิดและให้การสนับสนุนด้วยดีมาตลอด

ประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ คุณลุง คุณป้า พี่สาว น้องชาย และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้มีความรู้มา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

วราภรณ์ ภูักดีพันธ์
มีนาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	46
ผล	46
วิจารณ์	120
สรุปและข้อเสนอแนะ	130
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	133
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	144
ภาคผนวก ข ลำดับเบสเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์XA6 ด้วย	
โปรแกรม Blast เปรียบเทียบข้อมูล	
Genbank	148
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	150

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตในสภาพเรือนทดลอง	32
2	สารพาที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6	39
3	สูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ส่วนประกอบและอัตราส่วนที่เหมาะสม	40
4	กรรมวิธีการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบข้าวด้วยสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง	42
5	กรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพทางด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรสำเร็จชนิดผงในสภาพไร่	45
6	สายพันธุ์เชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องที่ได้จากการแยกและรวบรวมในการศึกษา	47
7	ระดับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง	58
8	การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ	61
9	การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่ได้จาก การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BOX โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010	69
10	การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่ได้จาก การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ERIC โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010	72
11	การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่ได้จาก การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ REP โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010	75
12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคลนแบคทีเรียที่แยกจากส่วนของดิน น้ำ ลำต้น ใบ และรากต้นข้าวบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง	82

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากใบข้าว ราก และดินที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวด้วยวิธี dual culture	85
14	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สาเหตุโรคขอบใบแห้ง ข้าวด้วยวิธี agar diffusion	87
15	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากส่วนต่างของข้าว และดิน น้ำในแปลงนา ต่อการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค blotter test	91
16	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากส่วนต่างของข้าว และดิน น้ำในแปลงนา ต่อการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค blotter test	92
17	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่จากการคลุกเมล็ด ร่วมกับการพ่นใบที่จำนวนครั้งในการพ่นรวม 6 ครั้ง และ 10 ครั้ง ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการประเมินอัตราการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพเรือนทดลอง	94
18	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง	96
19	คุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Bacillus</i> spp.	100
20	การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์	106
21	อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหาร MSP-medium (Molass Soybean Potato-medium)	107
22	ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหาร MSP-medium ทางด้านความเป็นกรดด่าง และความเร็วรอบ/นาที่ ที่เวลา 24 ชั่วโมง	108
23	ประสิทธิภาพสารพาแต่ละชนิดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6	110
24	ประสิทธิภาพสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพแต่ละชนิดในการผสมสูตร	111

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
25	ประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์XA6 ในสภาพเรือนทดลอง	113
26	ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และอัตราการแตกกอข้าว ที่อายุ 45 วัน และผลผลิตในระดับไร้สด และอัตราการแตกกอข้าว อายุ 45 วัน ในระดับไร้	115
27	ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับไร้	116
28	ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ระดับไร้	119

สารบัญภาพ

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
1	ภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ทดสอบในห้องปฏิบัติการบนอาหาร NGA โดยวิธีการ Dual culture (ก) และ Agar diffusion (ข)	28
2	ลักษณะอาการโรคบนใบข้าว (ก) และ (ข) ลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบเป็นมัน เยิ้ม ของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA (ค) ปฏิกริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันต่อเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> บนใบยาสูบภายใน 24-48 ชั่วโมง (ง)	59
3	ลักษณะอาการโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> โดยแบ่งตามระดับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวพันธุ์ขาวหอมมะลิ105 ตามเกณฑ์ของ IRRI (1980) โดย A = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ (ก) B = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ (ข) C = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง (ค) และ D = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมดขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (ง)	60
4	แถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp จากการตรวจสอบชนิดเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ด้วยไพรเมอร์ XOR-F และ XOR-R ออกแบบมาจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA โดยจะพบในเชื้อเป้าหมายทุกสายพันธุ์ โดยตำแหน่งที่ 1-11 คือ เชื้อสายพันธุ์ TB0037, Xoo1, Xoo17, Xoo13-1, Xoo19, KT24, ISO1, NI0030 AR9, AR208 และ CH320 ตามลำดับ โดยใช้ 100 bp DNA marker (ตำแหน่ง M)	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่สังเคราะห์ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ BOX แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ 231 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010	71
6	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่สังเคราะห์ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ ERIC แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ 231 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010	74
7	Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ที่สังเคราะห์ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ REP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ 231 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010	77
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สายพันธุ์รุนแรงและอ่อนแอ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ BOX โดย lane ที่ 1-8 (เชื้อสายพันธุ์รุนแรงในกลุ่มย่อย 2C) ได้แก่ สายพันธุ์ S250, AR218, PT264, CH008, NI0052, NI0063, AR201, AR208 ตามลำดับ และ lane ที่ 9-16 (เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ในกลุ่มที่ 1) ได้แก่ สายพันธุ์ X00S001, NIOO46, NI0040, J71, Su9, S268, C2, Su10.1 ตามลำดับ ลูกศรสีเหลืองแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) ระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2	78
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> กลุ่มสายพันธุ์รุนแรงและอ่อนแอ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ ERIC โดย lane ที่ 1-8 (เชื้อสายพันธุ์รุนแรงในกลุ่มย่อย 2F) ได้แก่ สายพันธุ์ NK052, Su6, C5, S250, NK102, AR218, CH125, CH304 และ lane ที่ 9-16 (เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ในกลุ่ม 1 หรือกลุ่มอ่อนแอ) ได้แก่ สายพันธุ์ X0012, X00S001, J41, J83, Su12, S238, NI0040, NI0046 ตามลำดับ ลูกศรสีเหลืองแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) ระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
10	ลักษณะพื้นฐานวิทยาโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว 10 กลุ่มได้แก่กลุ่ม 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (ภาพ ก ข ค ง จ ฉ ช ฎ และ ฌ ตามลำดับ) กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีขาวขุ่น ตรงกลางสีเข้ม รอบนอกสีขาวใส ขอบหยักเล็กน้อย กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีส้มอ่อน กลม แบน ขนาดปานกลาง ขอบเรียบ เป็นมันวาว มีขนาดเล็ก กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นเส้น ๆ คล้ายรูปพุ่มไม้ ขอบหยัก กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ๆ ขอบหยัก มีลักษณะเหนียวหนืด เยิ้ม กลุ่มที่ 5 โคโลนีสีขาว เป็นเส้น ๆ คล้ายดอกไม้ ขอบหยัก ตรงกลางนูนเล็กน้อย กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน ขรุขระ กลุ่มที่ 7 โคโลนีกลม รี แบน สีขาวนวล ขอบเรียบ เป็นมันวาวกลุ่มที่ 8 โคโลนีสีชมพู กลม รี แบน ๆ ขนาดเล็ก ขอบเรียบ กลุ่มที่ 9 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ เป็นมันวาว กลุ่มที่ 10 โคโลนีสีขาวครีม ขอบหยัก ผิวหน้าลื่น ๆ รูปร่างไม่แน่นอน แผ่ขยายเต็มจานอาหาร เรียบ เป็นมันวาว รูปร่างกลม	83
11	ประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี agar diffusion และลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยไอโซเลท XA6 (ก) ไอโซเลท D10 (ข) ไอโซเลท XA1 (ค) ไอโซเลท XA22 (ง) ตามลำดับ	88
12	ประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี agar diffusion และลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยไอโซเลท XA31 (จ) ไอโซเลท XA49 (ฉ) ไอโซเลท XA57 (ช) และสายพันธุ์เปรียบเทียบ KPS46 (ซ) ตามลำดับ	89
13	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีแนวโน้มในการส่งเสริมการเจริญเติบโตกล้าข้าว (PGPR) ได้แก่ ไอโซเลท D10 จากดินแปลงนา (ก) ไอโซเลท XA6 จากดินแปลงนา (ข) ไอโซเลท XA22 จากดินแปลงนา (ค) ไอโซเลท BCA039 จากรากข้าว (ง) และไอโซเลท BCA082 จากรากข้าว (จ) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ KPS46 (ฉ)	93
14	ปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพเรือนทดลอง	97

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพเรือนทดลอง	97
16	การลดการเกิดโรค <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในการตรวจสอบปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพเรือนทดลอง	98
17	การลดการเกิดโรค <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในการตรวจสอบปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ในสภาพเรือนทดลอง	98
18	โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 (ก) ลักษณะเซลล์และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 (ข) การทดสอบ Motility test (ค) การทดสอบ Starch hydrolysis (ง) การทดสอบ Gelatin hydrolysis (จ) และการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันบนใบยาสูบที่อายุ 45 วัน (ฉ)	101
19	การตรวจสอบการเป็นเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA ขนาด 595 bp โดยตำแหน่งที่1-3 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 (สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ) 2 = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP009s (<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์SP009s จากห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มก.) และ 3= เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6	102
20	การวิเคราะห์ Phylogeny ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ XA6 เปรียบเทียบกับข้อมูลใน Genbank แบคทีเรียสายพันธุ์ XA6 มีความเหมือนกับ <i>Bacillus subtilis</i> strain S433139-90 เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	103
21	อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MSP medium , NGA และ MS medium ที่อายุ 0-84 ชั่วโมง	109
22	อัตราการคงความมีชีวิตรอดของเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จชนิดต่าง ๆ ที่อายุ 0-12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง	112

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ปริมาณและปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่มีการใช้สูตร Formula1XA6 คลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง และประเมินผลที่ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วันหลังปลูกเชื้อ (น้ำกลั่นแทนเชื้อสาเหตุโรค)	118
24	ปริมาณและปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่มีการใช้สูตร Formula1XA6 คลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง และประเมินผลที่ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค	118

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและการควบคุมโรคโดยชีววิธี

Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Caused Bacterial Leaf Blight of Rice and Its Biological Control

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งต่อการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกสู่ตลาดโลก ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวนาปีที่ทำให้ผลผลิตแล้วประมาณ 54 ล้านไร่ และข้าวนาปรัง 9 ล้านไร่ ให้ผลผลิตเฉลี่ยปีละ 23 ล้านตันและ 6 ล้านตัน ตามลำดับ (กรมการข้าว, 2551) โดยข้าวสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย ซึ่งปริมาณการส่งออกในปี 2550 สูงถึง 9.4 ล้านตัน (ชูเกียรติ, 2551) ทั้งนี้อุปสรรคและปัญหาในการผลิตข้าวมีเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะปัญหาผลผลิตข้าวเสียหายจากโรคต่าง ๆ ทั้งที่เกิดจากรา เช่น ใบไหม้ ใบจุดสีน้ำตาล ใบจุดสีน้ำตาล ใบวงสีน้ำตาล เมล็ดต่างโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ได้แก่ ขอบใบแห้ง ใบจุดโปร่งแสง โรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ ใบสีแสด เหลืองเขียว ตลอดจนโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ ใบสีส้ม ใบหงิก โรคหูด ซึ่งโรคเหล่านี้ประสบตั้งแต่เริ่มปลูกข้าว เก็บเกี่ยว และเกษตรกรจะใช้สารเคมีในการควบคุมเป็นหลักทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมและผลผลิตข้าว แนวโน้มการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมีอัตราสูงขึ้นทุกปี ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าสารเคมี 37,039 ตัน ปี 2545 และเพิ่มเป็น 39,634 ตัน ปี 2545 และในปี 2546 เป็น 50,331 ตัน ตามลำดับ (ชูเกียรติ, 2551)

ทั้งนี้โรคขอบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ถือว่าเป็นโรคแบคทีเรียที่ทำความเสียหายมากเป็นอันดับต้น ๆ ทั้งในประเทศไทยและทวีปเอเชีย พบครั้งแรกในประเทศไทยที่ จ.ปทุมธานี เมื่อปี พ.ศ. 2506 เนื่องจากการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะนาในเขตชลประทาน ในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ซึ่งโรคจะแพร่ระบาดไปกับน้ำ สภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง ฝนตก ลมพัดแรง มีพายุเข้า โดยเฉพาะในข้าวพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ105 กข6 เหนียวสันป่าตอง พิษณุโลก2 ชัยนาท1 กข10 และ กข15 เป็นต้น (ทรงเชาว์, 2545) ส่วนในนาข้าวไร่ หากสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีระดับน้ำในนาสูง การระบายน้ำไม่ดี

ฝนตกพริ้ว มีพายุ น้ำท่วม ใช้พันธุ์ข้าวพันธุ์เดียว การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูงและระยะปักดำถี่ก็สามารถทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งระบาดรุนแรงและรวดเร็วได้ ต้นข้าวที่โรคขอบใบแห้งเข้าทำลายยังไม่มีวิธีการจัดการ โรคที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวสามารถติดไปกับเมล็ดและเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงออกรวง เกษตรกรเน้นการใช้สารเคมีในกลุ่ม copper หรือสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรคซึ่งมักก่อให้เกิดปัญหาเชื้อโรคคือยา นอกจากนี้เทคโนโลยีและความก้าวหน้าในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจริญรุดหน้าเป็นอย่างมากจนได้ข้าวที่มีคุณสมบัติที่หลากหลายแตกต่างกัน การปรับปรุงพันธุ์พืชคำนึงเฉพาะด้านคุณภาพผลผลิต แต่ไม่คำนึงถึงลักษณะความต้านทานโรคซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อทั้งคุณภาพและปริมาณผลผลิตข้าว ทำให้ข้าวสายพันธุ์ใหม่บางพันธุ์อาจแสดงความอ่อนแอต่อโรคบางชนิดได้เมื่อนำไปปลูกในพื้นที่ที่ต่างกันรวมทั้งโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วย หรือพันธุ์ข้าวใหม่อาจชักนำให้เชื้อสาเหตุโรคพัฒนาความรุนแรงในการเข้าทำลายพืช ส่งผลให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมเชื้อและก่อให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงและยากต่อการควบคุม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจากแหล่งปลูกข้าวสำคัญและเปรียบเทียบความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยใช้เกณฑ์ระดับความรุนแรงอาการโรค และความผันแปรทางพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการติดตามตรวจสอบการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการควบคุมโรค โดยการพัฒนาหรือการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรค นอกจากนี้การศึกษายังเป็นการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว ซึ่งถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถนำมาปรับใช้ควบคุมโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ทดแทนการใช้สารเคมี หรือสารปฏิชีวนะที่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม การตกค้างในผลผลิต ตลอดจนชักนำให้เชื้อโรคคือต่อสารเหล่านั้นหากใช้ผิดวิธีและคำแนะนำ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นพื้นฐานและแนวทางในการวางแผนการจัดการโรคขอบใบแห้ง และโรคสำคัญอื่น ๆ ของข้าวต่อไป รวมถึงการพัฒนาและปรับปรุงสูตรสำเร็จผลิตภัณฑ์แบคทีเรียต้นแบบชนิดผงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ศักยภาพสูง สะดวก พร้อมใช้ และเก็บรักษาได้ยาวนาน เพื่อสร้างความเข้มแข็งในการสนับสนุนภาคการผลิตและถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยส่งเสริมให้มีการผลิตสูตรต่าง ๆ ที่มีทั้งเชื้อปฏิปักษ์แบบเดี่ยว และเชื้อปฏิปักษ์แบบผสมหลายสายพันธุ์ร่วมกับสารธรรมชาติที่มีประโยชน์อื่น

วัตถุประสงค์

1. รวบรวมและศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจากแหล่งปลูกข้าวสำคัญต่าง ๆ ในประเทศไทย
2. คัดเลือกและศึกษาคูณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จาก ส่วนต่าง ๆ ของข้าวและประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46
3. พัฒนาผลิตภัณฑ์สูตรชนิดผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้ควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว

การตรวจเอกสาร

ข้าวและความสำคัญ

ข้าว (Rice) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ใน Family Gramineae ข้าวที่นิยมบริโภคมีอยู่ 2 species คือ *O. glaberrima* ปลูกเฉพาะในเขตร้อนของแอฟริกาเท่านั้น และ *O. sativa* ปลูกทั่วไปทุกประเทศ ซึ่งแยกออกเป็น indica มีปลูกมากในเขตร้อนและ japonica มีปลูกมากในเขตอบอุ่น (กรมการข้าว, 2551) โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจัดเป็นชนิด indica มีใบยาวและบาง เส้นใบเป็นแบบขนาน มีลำข้อ และดอก ในฤดูเก็บเกี่ยวที่ปลายยอดของแต่ละข้อจะมีก้านอ่อนเล็ก ๆ แต่ละก้านจะมีเมล็ดข้าวติดอยู่เป็นแถว มีเปลือกสีน้ำตาลหุ้มเมล็ดข้างใน

พื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก รวมทั้งการปลูกข้าวยังสามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ โดยพื้นที่ภาคกลางปลูกข้าวมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ชัยนาท สุพรรณบุรี สระบุรี นครนายก ปทุมธานี และสิงห์บุรี ภาคกลางจัดได้ว่ามีสภาพพื้นที่ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ทั้งคุณภาพดิน ระบบน้ำ ดินสามารถอุ้มน้ำได้ดี มีธาตุอาหารหลักที่เป็นประโยชน์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0–6.5 หน้าดินลึกประมาณ 30–50 เซนติเมตร ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ ยโสธร บุรีรัมย์ นครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี และ มหาสารคาม ซึ่งสภาพพื้นที่ในเขตนี้นับเป็น ที่ดอน มีสภาพดินฟ้าอากาศเหมาะสม ทำให้ผลผลิตข้าวที่ได้มีคุณภาพดี ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดพัทลุง นครศรีธรรมราช ปัตตานี ตรัง และสงขลา ดินนาทางภาคใต้ส่วนใหญ่เป็นดินร่วนปนดินเหนียว มีบางส่วนเป็นดินร่วนปนทรายแต่ความอุดมสมบูรณ์ดีกว่าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรื่องระบบน้ำนั้นภาคใต้ไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องขาดน้ำ แต่มีลมมรสุมที่จะทำให้ใบข้าวเสียดสีเกิดบาดแผลเป็นช่องทางให้เชื้อเข้าทำลายได้ง่ายขึ้นซึ่งจะส่งเสริมต่อการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก กำแพงเพชร อุทัยธานี สุโขทัย พิจิตร เชียงราย อุดรดิตถ์ พื้นที่เพาะปลูกข้าวของภาคเหนืออยู่ตามที่ราบก้นหุบเขา และตามไหล่เขา ปริมาณน้ำที่ใช้ยังไม่เพียงพอ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ชลบุรี และตราด ตามลำดับ (พะยอม, 2551)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจำแนกชนิดข้าว

ข้าวมีรากเป็นชนิดรากฝอยโดยปกติจะหยั่งลึกลงไปในดินประมาณ 6-18 นิ้ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ พันธุ์ข้าวและชนิดของดินเป็นส่วนใหญ่

ลำต้น ของข้าวเป็นรูปทรงกระบอกประกอบไปด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) เมื่อ โตเต็มที่ภายในปล้องจะกลวง ความสูงของต้นข้าวมีตั้งแต่ 30-40 เซนติเมตร ซึ่งเป็นพันธุ์เตี้ย ไป จนถึงมากกว่า 7 เมตร ความสูงของข้าวขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ และสภาพแวดล้อม

ใบ เกิดจากมุมหนึ่งของลำต้นประกอบไปด้วย แผ่นใบ (leaf blade) ลักษณะเรียวยาว มีขน และแกนกลาง มีเส้นใบแบบเส้นขนาน ใบสุดท้ายของข้าวเรียกว่าใบธง (flag leaf) เป็นใบที่ห่อหุ้ม ช่อดอก กาบใบ (leaf sheath) เชื่อมกันฝั้น (ligule) เป็นเยื่อบาง ๆ รูปสามเหลี่ยมมุมแหลมอยู่ที่รอยต่อ ระหว่างแผ่นใบ และตัวใบ เขี้ยวใบ (auricle) รูปโค้งเรียวยาวเส้นเล็ก ๆ มักมีขนยาว ๆ อยู่ด้านหนึ่งคล้าย ฟันเลื่อย จะมีหนึ่งคู่อยู่ที่ฐานของใบ

ช่อดอก ช่อดอกของข้าวเรียกว่า รวง เกิดต่อจากปล้องสุดท้ายของลำต้น ช่อระหว่างปล้อง สุดท้ายของลำต้นกับแกนกลางของรวง รวงจะตั้งตรงตั้งแต่เริ่มออกรวงจนถึงระยะดอกบาน และจะ เริ่มโน้มเอียงเมื่อเมล็ดสร้างแป้งจนเต็มเมล็ดแล้ว ขนาดของรวงและมุมของแขนงรวงที่แตกออกมา นั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์ (วาสนา, 2523)

การจำแนกชนิดข้าวสามารถจำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้หลายชนิดตามวิธีการคือ จำแนก ตามสภาพพื้นที่ปลูกได้ 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวไร่ คือ ข้าวที่ปลูกในที่ดอนไม่มีน้ำขัง ไม่มีคันนา โดย ปลูกในพื้นที่เหมือนกับพืชไร่ทั่ว ๆ ไป เช่น ข้าวแม่จัน กุ้งเมืองหลวง และดอกพะยอม ข้าวนาสวน คือ ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีระดับน้ำตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร จนถึงระดับน้ำ 70-80 เซนติเมตร ส่วนใหญ่ ปลูกโดยวิธีปักดำ เช่น ข้าวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว นางพญา 132 เป็นต้น และข้าวนาเมืองหรือ ข้าวขึ้นน้ำ คือ การปลูกข้าวในพื้นที่ระดับน้ำ ตั้งแต่ 80 เซนติเมตร ขึ้นไป จนถึง 3-4 เมตร จะปลูก โดยวิธีหว่านข้าวแห้ง เช่น พันธุ์ กข.17 กข.19 ปิ่นแก้ว 56 เล็บมือนาง 111 เป็นต้น การจำแนกตาม ฤดูกาลปลูก แบ่งได้ 2 ประเภท คือ ข้าวนาปี คือปลูกในฤดูฝน เช่น พันธุ์ กข.6 กข.19 ข้าวตาแห้ง เป็น ต้น และข้าวนาปรัง หรือ ข้าวนอกฤดู เช่น ข้าว กข. พันธุ์ต่าง ๆ การจำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยวได้ 3 ชนิด คือ ข้าวเบา ข้าวกลาง และข้าวหนัก (ปราณีต, 2531) และการจำแนกชนิดข้าวตามการ

ตอบสนองต่อช่วงแสงคือ ข้าวไวต่อช่วงแสง (sensitive to photoperiod) จะออกดอกเฉพาะเมื่อช่วงเวลากลางวันสั้นกว่า 12 ชั่วโมง โดยพบว่าข้าวไวต่อช่วงแสงในประเทศไทยจะออกดอกในเดือนที่มีความยาวของกลางวันประมาณ 11 ชั่วโมง 40 นาที หรือสั้นกว่าข้าวที่ออกดอกเดือนที่มีความยาวกลางวัน 11 ชั่วโมง 40-50 นาที จึงเป็นข้าวที่มีความไวน้อยต่อช่วงแสง (less sensitive to photoperiod) และพันธุ์ที่ออกดอกเฉพาะเดือนที่มีความยาวกลางวันประมาณ 11 ชั่วโมง 10-20 นาที ก็ได้ชื่อว่าเป็นพันธุ์ที่มีความไวมากต่อช่วงแสง (strongly sensitive to photoperiod) เช่น พัทลุง60 ขาวดอกมะลิ105 เฌียง เล็บนก ส้มหยด เป็นต้น ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง (non-sensitive to photoperiod) จะออกดอกเมื่อต้นข้าวมีระยะเวลาการเจริญเติบโตครบตามกำหนดของแต่ละพันธุ์ ไม่ขึ้นกับความยาวของกลางวัน ช่วงแสงในแต่ละวันจะไม่มีผลในการออกดอกจะปลูกในช่วงฤดูใดก็จะออกดอกตามวันเวลาที่เคยเป็น สามารถคลาดเคลื่อนได้บ้างตามสภาพแวดล้อมประมาณ 10 วัน จึงเหมาะในการปลูกข้าวนอกฤดูทำนาปี (วาสนา, 2523) เช่น ชัยนาท1 สุพรรณบุรี1 สุพรรณบุรี90 พิษณุโลก2 ปทุมธานี1 บางเตน เป็นต้น (มูลนิธิข้าวไทย, 2551)

ระยะการเจริญเติบโต

ข้าวแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ คือ 1) vegetative growth period และ 2) generative period โดยระยะ vegetative growth period หมายถึง การเจริญเติบโตในช่วงแรกตั้งแต่เริ่มงอก แตกกอ จนถึงช่วงก่อนออกรวง (ระยะต้นกล้าและระยะแตกกอ) ประมาณ 30-45 วันหลังปลูก ระยะ generative period หมายถึง การเจริญเติบโตเพื่อที่จะสร้างส่วนที่แพร่กระจายใน generation ต่อไป คือการสร้างเมล็ดใหม่ ระยะนี้จะนับจาก vegetative ใช้ช่วงเวลาที่ข้าวเริ่มสร้างช่อดอกเป็นตัวแทนจนกระทั่งถึงช่วงเมล็ดแก่เก็บเกี่ยวได้

การปฏิบัติและการดูแลรักษา

การให้น้ำในแปลงนา จะต้องให้น้ำหล่อเลี้ยงต้นข้าวอยู่ตลอดเวลา ระดับน้ำช่วงข้าวแตกกอจะอยู่ที่ประมาณ 5-10 เซนติเมตร ระดับน้ำระยะข้าวสร้างรวงอ่อนถึงข้าวออกดอกอยู่ที่ระดับน้ำประมาณ 10-20 เซนติเมตร และระดับน้ำหลังข้าวออกดอกจะรักษาระดับน้ำไปจนข้าวออกดอกแล้ว 15-20 วัน จึงปล่อยน้ำออก ช่วงที่ข้าวแตกกอระดับน้ำไม่ควรสูงเกินไปเพราะจะทำให้การแตกกอน้อยลง แต่เมื่อข้าวแตกกอเต็มที่แล้วระดับน้ำอาจจะสูงกว่าปกติได้ แต่ไม่ควรสูงเกิน 2 ใน 3 ของความสูงต้นข้าว การใส่ปุ๋ย หลักสำคัญที่ต้องพิจารณาการเลือกปุ๋ยที่ตรงตามลักษณะดินและพันธุ์

ข้าวที่ปลูก ชนิด อัตรา และวิธีการให้ปุ๋ยแก่ข้าว สูตรปุ๋ยที่แนะนำให้ใช้ในนาข้าว ใส่ปุ๋ยในโตรเจน ประมาณครึ่งหนึ่งและฟอสฟอรัสกับโปแตสเซียมทั้งหมดตามอัตราที่แนะนำ (ทรงเขาว์, 2545) ควร มีการจัดการป้องกันศัตรูพืชต่าง ๆ เช่น ทั้งโรค แมลง วัชพืช และศัตรูพืชชนิดต่างๆ

โรคขอบใบแห้งของข้าว

โรคขอบใบแห้งของข้าวเกิดจากแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* จัดอยู่ใน Division Protophyta, Class Schizomycetes, Order Pseudomonadales, Family Pseudomonadaceae, Genus *Xanthomonas* Species *oryzae* (Specific approval and amendment, 2007) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจัดเป็นเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นท่อนสั้นปลายมนมีขนาดประมาณ $0.55\text{--}0.73 \times 1.35\text{--}2.17$ ไมครอน มีแฟลกเจลลา 1 เส้น ขนาดความกว้างประมาณ 8.75 ไมครอน และความยาวประมาณ 30 ไมครอน (Ghasemie *et al.*, 2008) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเจริญบนอาหาร nutrient agar โคโลนีมีลักษณะกลมมน สีเหลืองซีด ผิวเรียบ มีเมือก สร้างรงควัตถุสีเหลือง ขอบเรียบเป็นมันวาว และแบคทีเรียจะสร้าง mucous สามารถละลายได้ใน acetone

ลักษณะอาการโรค

ลักษณะ โรคขอบใบแห้งแผลจะเริ่มจากขอบใบข้าวซึ่งอยู่ห่างจากปลายใบประมาณ 5-6 เซนติเมตร ใบที่เป็นโรคครั้งแรกจะเกิดเป็นรอยแผลขีดข่วน ต่อมาเป็นสีเหลืองส้ม แผลจะพัฒนากลายเป็นสีน้ำตาล แผลจะขยายไปตามความกว้าง และความยาวของใบข้าว ที่แผลมีหยดน้ำสีครีม คล้ายยางสนขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด แผลที่เกิดจากขอบใบบางครั้งจะขยายเข้าไปข้างในตามเส้นใบ (veins) ทำให้ขอบแผลเป็นขอบลายหยัก แผลนี้เมื่อนานเข้าจะเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือเทา ขอบใบจะแห้งและม้วนตามความยาวใบ สีเขียวจะเหลืออยู่เฉพาะที่ก้านกลางใบ (midrib) ถ้าเชื้อมีปริมาณสูงจะเข้าทำลายท่อน้ำท่ออาหารทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตันต้นข้าวจะเหี่ยวเฉาและตายอย่างรวดเร็ว ในระยะนี้บางทีอาจสับสนกับต้นข้าวที่ถูกทำลายโดยหนอนกอ (*Chilo polychrysus* (Meyrick) (ประสาทพร, 2534; Ghasemie *et al.*, 2008)

การแพร่ระบาด

เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงออกรวง ระยะที่รุนแรงที่สุดของโรคคือระยะกล้าหรือปักดำ โดยแบคทีเรียจะเข้าไปทางแผลที่แมลงกัดหรือดูดกิน แผลที่เกิดจากการเสียดสีของใบข้าวเมื่อถูกลมพัด และเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น water pore และ hydrathode โรคนี้สามารถแพร่ระบาดได้กว้างขวางถ้ามีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 28-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสูง ระดับน้ำสูง การระบายน้ำไม่ดี ฝนตกพำ มีได้ฝุ่นลมพัดแรง เพราะจะทำให้เกิดบาดแผลที่ใบเป็นช่องทางให้เชื้อเข้าทำลายต้นข้าว อีกทั้งจะนำไปสู่การระบาดของต้นสู่ต้น จากแปลงสู่แปลง ทำให้เชื้อระบาดอย่างรวดเร็วโดยการไหลไปกับน้ำฝน รวมทั้งการใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ในปริมาณมาก และเชื้อสามารถที่จะถ่ายทอดไปกับเมล็ดพันธุ์ เป็นช่องทางให้เชื้อแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว (Davi et al., 2006)

การควบคุมโรคขอบใบแห้ง

การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร คือ การใช้พันธุ์ต้านทาน เช่น กข5 กข7 กข23 เหลืองประทิว123 พัทลุง60 พิชณุโลก60-1 สันป่าตอง1 สุรินทร์1 หรือการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชในเวลาที่เหมาะสมตามคำแนะนำของนักวิชาการ และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไปในดินที่อุดมสมบูรณ์อยู่แล้ว ไม่ระบายน้ำในนาที่เป็นโรคลงในแปลงนาอื่น การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยวิธีแบบเดิมจะเป็นการใช้สารเคมีเป็นหลัก โดยเมื่อพบว่าข้าวที่ปลูกเริ่มแสดงอาการโรคก็จะเริ่มทำการพ่นสารเคมี โรคขอบใบแห้งนี้ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพแบบเฉพาะเจาะจงจึงควรเฝ้าระวังการเกิดโรคหากปลูกข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 กข6 เหนียวสันป่าตอง พิชณุโลก2 อย่างสม่ำเสมอ การใช้สารเคมีควบคุมควรใช้ในลักษณะสลับกัน หรือร่วมกัน เช่น เซตรีฟโดมัยซินซัลเฟต ร่วมกับออกซีเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ หรือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ หรือ ไอโซโพรโทโอเลน และฟินาซีน (Phenazin) โดยใช้เมื่อเริ่มพบอาการของโรคบนใบข้าวหรือในระยะที่เหมาะสม คือก่อนนำกล้าไปปักดำ 1 ครั้ง ระยะแตกกอ 1 ครั้ง และระยะข้าวตั้งท้องอีก 1 ครั้ง และไม่ควรรีใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไปเพราะจะทำให้ต้นข้าวอ่อนแอและถูกทำลายจากเชื้อสาเหตุโรคได้ง่าย หลีกเลี่ยงการใช้พันธุ์อ่อนแอในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 กข6 เหนียวสันป่าตอง พิชณุโลก2 หรือการปลูกข้าวพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี1 สุพรรณบุรี2 หอมคลองหลวง1 หอมสุพรรณบุรี พิชณุโลก60-2 พิชณุโลก60-1 พัทลุง60 ปทุมธานี1

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control of plant disease) หมายถึง การนำ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลผลิตจาก พันธุกรรม (gene or gene product) ที่มีอยู่ทั่วไปตามบริเวณผิวพืชส่วนเหนือดิน (Munk vald and Marois, 1993; Handelsman and Parke, 1989) บริเวณรากและดินรอบราก (Larkin *et al.*, 1989) ที่มี ความสามารถในการแข่งขัน (competition) ทางด้านแหล่งแร่ธาตุอาหาร และแหล่งที่อยู่อาศัย การ เป็นปรสิต (parasite) รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิด อื่น (Campbell, 1989) ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช ทดแทนการใช้สารเคมี (นิพนธ์, 2546) ในปัจจุบันนี้ก็ได้มีการนำวิธีการในการควบคุมโรคโดยชีววิธี ดังกล่าวมาใช้ในการควบคุมโรคสำคัญ ๆ ของข้าว กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อปฏิปักษ์จะเป็นไปในลักษณะ ของ epiphytic fitness โดยการดำรงชีวิตและเพิ่มปริมาณประชากรอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพใน การแข่งขันแย่งชิงทั้งทางด้านอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัยได้ดี (Brown and Rovira, 1976; Suwanto *et al.*, 1996) นอกจากนี้มีรายงานความก้าวหน้าเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการ ควบคุมโรคของพืชหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพที่คณะผู้วิจัย ภาควิชาโรคพืช คณะ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้รวบรวมและศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็น ประโยชน์ต่อการพัฒนาการของพืชปลูกหลายแนวทางจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Paenibacillus* sp. SW01/4 จากผิวใบถั่วเหลือง (สุทธฤดี และ สุพจน์, 2544; สุทธฤดี และคณะ, 2548ก; Prathuangwong and Kasem, 2003) *Pseudomonas fluorescens* SP007s และ *B subtilis* SP009s จากผิวใบกะหล่ำดอก (วิลาวรรณ และคณะ, 2549) *Serratia macescens* Spt360 และ *B. cereus* Spt245 จากดินป่า *P. aeruginosa* Spd155 จากเมล็ดถั่ว (Phiriyaprasath *et al.*, 2002) *B. licheniformis* Spd20 จากเมล็ดงา และ *Bacillus* sp. (YP04, YP28, KP96 และ KP25) จากผิวใบข้าวโพด (Prathuangwong *et al.*, 2004) และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 จากดินแปลงถั่วเหลืองซึ่ง *B. amyloliquefaciens* KPS46 มี ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสด สามารถควบคุมโรคใบจุด นูนที่เกิดจาก *X. axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งเชืื่อนี้อยู่ในจินัสเดียวกับ *X. oryzae* pv. *oryzae* นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับข้าวโอกาสใน การควบคุมโรคก็น่าจะมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน นอกจากนี้สามารถควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า จากเชื้อ *Sclerotium* sp. เน่าคอดิน และแอนแทรคโนส เป็นต้น (สุพจน์, 2545) และ KPS46 ยัง สามารถควบคุมโรคเน่าและ ขอบใบทอง และใบจุด *Alternaria* ของพืชตระกูลกะหล่ำ (วิลาวรรณ และคณะ, 2549) และควบคุมโรคสำคัญของข้าวโพดซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ โรคใบขีดโปรงแสง

โรคเหี่ยว โรคใบไหม้แผลใหญ่ ใบไหม้แผลเล็ก และโรคลำต้นเน่า (นันทยา, 2551; สุกฤดี และคณะ, 2548ข) นอกจากนี้ KPS46 ยังมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานโรคสำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองฝักสด ข้าวโพด งาม้า ลักกระถินเทพา หน่วว่ว และพืชตระกูลกะหล่ำ โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคของพืช เช่น phenylalanine ammonia lyase (PAL) peroxidase (POX) และ β -1,3-glucanase แสดงให้เห็นว่า KPS46 มีประโยชน์คุณภาพการต่อระบบการผลิตพืชเศรษฐกิจหลายชนิด นำมาซึ่งวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระดับความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคต่อพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย และพัฒนากรรมวิธีในการนำเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นและ KPS46 ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของใบแห้งของข้าว มาปรับใช้ในการจัดการโรคของใบแห้งของข้าวเพื่อลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในระบบการผลิต และเพิ่มศักยภาพการผลิตข้าวอย่างยั่งยืน

กลไกการควบคุมโรคโดยชีววิธี

ในธรรมชาติจะมีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชทั้งที่มีกลไกเดียวหรือหลายกลไก เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยเชื่อนี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคแตกต่างกัน คือ

1) การแข่งขัน (Competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า (Suwanto *et. al.*, 1996) ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงให้ผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมาก คือ การแข่งขันโดยการแย่งแย่งอาหารเป็นลักษณะของ biocontrol agent (BCA) ที่จะไปลดปริมาณสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค

2) การผลิตสารทำลายชีวิต (Antibiosis) เชื้อปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ(toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Campbell, 1989) พบว่ากลไกชนิดนี้เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 จะผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืชได้

3) การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืช ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต

4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced systemic resistance; ISR) เป็นกลไกที่สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิต้านทานขึ้นได้โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรคเมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ (สฤตฤติ และคณะ, 2548(ก)) เช่น เกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง จะไม่ทำให้เกิดโรคแต่จะเจริญอยู่ในพืช และช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้

5) การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถครอบครองพื้นที่บริเวณรากของพืช และแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่บริเวณรากได้ นอกจากนี้ PGPR ยังช่วยเพิ่มพูนการทำหน้าที่ของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

6) การผลิตสารส่งเสริมประสิทธิภาพการยึดติดแนบแน่นกับผิวพืช (Biosurfactant) แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถยึดติดครอบครองผิวพืชได้แนบแน่น ซึ่งนอกจากจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในลักษณะของการลดแรงตึงผิวของพืชแล้ว จะเชื่อมสารที่มีประโยชน์ให้พืชสามารถรับได้เต็มที่ และยังกีดกันหรือจำกัดช่องทางเชื้อโรคไม่ให้เข้าทำลายพืชได้

7) การรักษาและแก้ไขความผิดปกติตลอดจนการปรับสภาพความสมดุลให้พืช (Bioremediators) ช่วยส่งเสริมควบคุมกระบวนการทางชีวเคมีหรือ metabolism ให้เป็นไปตามปกติตามลักษณะทางพันธุกรรมพืช

8) การกระตุ้น และชักนำขีดความสามารถของลักษณะทางสรีรวิทยาพืชให้แสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ (Physiostimulator) เช่น การคายน้ำ การหายใจ

9) การผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ (Biopesticides) มักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น

แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillaceae และ Pseudomonadaceae โดยเฉพาะ *Bacillus sp.* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด และสปอร์สามารถทนร้อนได้ดี

10) การผลิตสารไซเคอร์โอฟอร์ (Siderophore) เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีความสามารถในการจับ Ferric ion (Fe^{+3}) ซึ่งการใช้ประโยชน์ของ Siderophore คือ การนำเหล็กเข้าไปใช้ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย พบว่าการที่แบคทีเรียผลิต Siderophore มีความสามารถในการนำธาตุเหล็ก (Fe^{+3}) มาใช้ประโยชน์โดยเฉพาะในสภาพที่มีธาตุเหล็กอยู่ปริมาณน้อย Siderophore ที่ผลิตจากแบคทีเรียจะไปจับธาตุเหล็กเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Siderophore เป็นสาเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคพืชขาดธาตุเหล็กในการดำรงชีวิต

11) คุณสมบัติในการส่งเสริม และการสนับสนุนการใช้ปุ๋ยหรือธาตุอาหารของพืช (Biofertilizers) บทบาทของแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้ธาตุอาหารต่าง ๆ ของพืช โดยปรับเปลี่ยนธาตุอาหารให้อยู่ในรูป (Form) ที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

การประยุกต์ใช้เทคนิค rep-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืช

การนำเทคนิค rep-PCR มาใช้ในทางด้านอนุกรมวิธาน ความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ (genetic variation) และพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic) ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การศึกษาความผันแปรหลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค repetitive element PCR (rep-PCR) โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นส่วนของ repetitive sequence 3 ชนิด คือ REP (repetitive extragenic palindromic) ERIC (enterobacterial consensus) และ BOX (interspersed repetitive BOX sequence) โดยแต่ละไพรเมอร์จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่าง repetitive sequence เทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

REP (repetitive extragenic palindromic) เป็นส่วนของ palindromic unit (PU) พบในแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* มีขนาด 38 bp มีความสำคัญในการจัดเรียงลำดับเบสบริเวณที่มีการแปลรหัส สร้างโครงสร้าง stem loop ที่มีความเสถียรในการคัดลอก

RNA และมีบทบาทในการช่วยให้ mRNA มีความเสถียรด้วย ซึ่ง Versalovic *et al.* (1991) ออกแบบไพรเมอร์ REP จากดีเอ็นเอตัวตรวจ REPATT โดยใช้ลำดับเบสทางปลายแต่ละข้างของ palindrome sequence ของดีเอ็นเอตัวตรวจนี้ จากการทำ PCR ในแบคทีเรียแกรมลบ หลายชนิด พบว่าจะได้แถบดีเอ็นเอเฉพาะในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (strain specific) เช่น *E. coli* สายพันธุ์ 4038 มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 300 1638 1400 800 และ 700 คู่เบสตามลำดับ

ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) หรืออาจเรียกว่า intergenic repeat units (IRUs) พบใน *E. coli* และ *S. typhimurium* เช่นเดียวกับ REP แต่มีขนาดใหญ่กว่า พบว่า ERIC มีขนาด 126 bp แพร่กระจายทั่วไปบริเวณที่มีการถอดรหัส (transcribe region) ระหว่าง polycistronic operon และ downstream ของ open reading frames (Hulton *et al.*, 1991)

BOX (Interspersed Repetitive BOX Sequence) เป็น repetitive sequence ที่มีลักษณะอนุรักษสูง พบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* ประกอบด้วย 3 หน่วย คือ BOX A B และ C มีขนาด 59 45 และ 50 bp ตามลำดับ จากการศึกษาลำดับเบสพบว่าเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างโปรโมเตอร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *S. pneumoniae* ถึงแม้ลำดับเบสในแต่ละหน่วยย่อยของ BOX จะแตกต่างกันบ้างแต่โดยทั่วไปแล้วมีลำดับเบสคล้ายกับ ERIC และ REP ที่พบในแบคทีเรียพวก enterobacteria (Martin *et al.*, 1992)

จากข้อมูลลำดับเบสของ repetitive element ทั้ง 3 ชนิด จึงมีการนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์ BOX A1R (Louws *et al.*, 1994) คู่ไพรเมอร์ ERIC 1R กับ ERIC 2 และ REP 1R กับ REP 2 (Versalovic *et al.*, 1991) เพื่อใช้ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเนื่องจากสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงระดับสายพันธุ์ และ pathovar

การประยุกต์ใช้เทคนิค rep-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชเป็นวิธีที่นิยม โดย Vera *et al.* (1996) ศึกษาโครงสร้างของประชากร *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 130 สายพันธุ์ จากแปลงข้าวของเกษตรกรในประเทศฟิลิปปินส์ด้วยเทคนิค rep-PCR และ RFLP โดยไพรเมอร์ที่ใช้ คือ ERIC และ REP เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP พบว่า *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการจัดกลุ่มจากทั้ง 2 เทคนิคให้ผลเหมือนกัน กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ race 2 3 และ 7 อีกกลุ่มหนึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ใน race 1 และ 4 เช่นเดียวกับ Tika *et al.* (1999) ที่นำเทคนิค rep-PCR มาศึกษาประชากรเชื้อ *X.*

oryzae pv. *oryzae* ที่แยกได้จากแปลงปลูกข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าลักษณะทาง genotype คล้ายคลึงกัน แสดงว่าความแตกต่างของพืชอาศัยไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุศาสตร์ นอกจากนี้ Bouzar *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค rep-PCR ศึกษาประชากรเชื้อ *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดของ มะเขือเทศและพริก ผลการทดลองพบว่ามีความสัมพันธ์กันเพียงเล็กน้อยระหว่างลักษณะทาง phenotype และ genotype ซึ่งงานทดลองหลายเรื่องที่ต้องการเปรียบเทียบลักษณะทาง genotype และ phenotype ซึ่งได้เทคนิค rep-PCR มักเป็นที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์ลักษณะทาง genotype อัน ได้แก่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่สามารถผลิตได้จากไพรเมอร์ 3 ชนิด สอดคล้องกับ Louws *et al.* (1994) ที่ได้ศึกษาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรค spot disease ของพริก และมะเขือเทศโดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และจัดแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับมะเขือเทศ และพริก และให้ผลลบในปฏิกิริยา starch hydrolysis และ pectinolytic กลุ่ม B ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับมะเขือเทศ และให้ผลบวกในปฏิกิริยาชีวเคมีข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับการจัดแบ่งด้วยเทคนิค rep-PCR โดยแต่ละกลุ่มจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะจากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์แต่ละชนิด รวมทั้ง กุลขนา (2546) ได้นำเทคนิค rep-PCR มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อ และความรุนแรงในการก่อโรคของพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนของถั่วเหลือง

นอกจากนี้มีรายงานถึงการใช้เทคนิค rep-PCR ในการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการจำแนกเชื้อ *S. scabies* สาเหตุโรคพืชออกจากเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยการใช้ไพรเมอร์ BOX A1R ผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง และชัดเจน (Sadowsky *et al.*, 1996) โดยอีกงานทดลองของ Louws *et al.* (1998) ได้นำเทคนิค rep-PCR มาใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Clavibacter* subspies ต่าง ๆ ได้แก่ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, และ *C. michiganensis* subsp. *insidiosum*, พบว่า rep-PCR สามารถสร้างลายพิมพ์ที่แตกต่างกันแยกได้อย่างน้อย 4 กลุ่ม (A B C และ D) ภายในกลุ่มใหญ่ของ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, เป็นงานทดลองที่ยืนยันว่าเทคนิค rep-PCR สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ต่ำถึงระดับ subspecies และ Judd *et al.* (1993) ได้รายงานถึงการใช้เทคนิค rep-PCR และ RFLP มาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ serocluster ของเชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้ทั้ง 2 วิธี เมื่อนำลักษณะทาง phenotype ได้แก่ การสร้างปมปมมาเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน

นอกจากนี้ลักษณะทาง phenotype อื่น ๆ ที่มีการนำมาเปรียบเทียบศึกษาหาความสัมพันธ์ เช่น ความสามารถในการย่อยแป้ง ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน และสารประกอบทองแดง งานของ McManus and Jones. (1995) ใช้เทคนิค rep-PCR ศึกษาเชื้อ *E. amylovora* พบว่าสามารถใช้เทคนิค rep-PCR จำแนกความแตกต่างระหว่าง *E. amylovora* แต่ละสายพันธุ์ได้ ทั้งนี้เทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคที่ช่วยยืนยันถึงความแตกต่างของเชื้อแต่ละกลุ่มจากลักษณะทางพันธุกรรมที่อาจมีความแตกต่างกันกับการแบ่งกลุ่มเชื้อจากลักษณะอื่น ๆ เช่น พืชอาศัยที่แตกต่างกันหรือลักษณะภูมิประเทศที่แตกต่างกันได้ Wonyong *et al.* (2003) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียในดิน Family Rhizobiaceae จินัสต่าง ๆ คือ *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* และ *Agrobacterium* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกันมาก จึงได้นำเทคนิค rep-PCR มาใช้ร่วมกับการจำแนกเชื้อด้วยวิธี multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) ซึ่งจากการทดลอง rep-PCR สามารถสร้างลายพิมพ์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดและยังสามารถจำแนกเชื้อ *Rhizobium* strains ที่มีความใกล้เคียงกันมาก ๆ ได้ เช่นเดียวกับวิธี MLEE ที่มีวิธีการและขั้นตอนที่ซับซ้อนกว่า อีกทั้ง Mehta *et al.* (2002a, 2002b) ได้นำเทคนิค rep-PCR โดยไพรเมอร์ ERIC และ REP ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความหลากหลายของเชื้อ *Drechslera avenae* และ *Stemphylium solani* อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ และรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

1.1 การเก็บรวบรวมพืชเป็นโรค

เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* จากแปลงปลูกข้าวที่สำคัญในพื้นที่ปลูกภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดอ่างทอง สุพรรณบุรี นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา สระบุรี ชัยนาท สมุทรปราการ และภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช กำหนดพื้นที่สำรวจแบบสุ่มกระจายทั่วแปลงเป็นจำนวน 10 จุด ต่อแปลง ในลักษณะตัวอักษร W ตามวิธีของ (Delp *et al.*, 1986) ในพื้นที่ 1 ไร่ พิจารณาลักษณะอาการโรคโดยเปรียบเทียบกับอาการกับคู่มือ Compendium of Rice Diseases (Webster *et al.*, 1992) และเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งที่มีลักษณะเป็นแผลชำน้ำน้ำ แผลไหม้จากขอบลามเข้าเส้นกลางใบ รอยต่อของแผลกับเนื้อเยื่อใบที่ปกติจะเป็นขอบหยักสีเหลืองส้ม และเก็บใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด รัดปากถุงให้แน่น บันทึกข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ สถานที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับนำไปวินิจฉัยโรคตามขั้นตอนต่อไป

1.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

นำตัวอย่างใบข้าวที่สุ่มเก็บในแหล่งปลูกข้าวและมีแนวโน้มเป็นโรคขอบใบแห้งมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting โดยตัดบริเวณแผลที่เชื่อมต่อกับบริเวณเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร แช่ลงใน clorox 10% นาน 2-3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววางชิ้นพืชบนอาหารแข็ง nutrient glucose agar (NGA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกลูกเชื้อโคโลนีของแบคทีเรียที่ลักษณะสีเหลืองซีด กลมมน ขอบเรียบ เป็นมันวาว ที่เจริญอยู่บนอาหาร NGA มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.3 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อคัดเลือเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

1.3.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีและการทดสอบแกรม

ศึกษาการติดสีแกรมโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* บนอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียมากระจายลงแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อและทำลายคราบมันแล้วยึด (fixed) เซลล์ด้วยการลนเปลวไฟห่าง ๆ ประมาณ 1–2 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์ไปย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) ด้วยสาร crystal violet และ safranin-o โดยที่เซลล์แบคทีเรียที่ติดสีม่วงของ crystal violet จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ safranin-o จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ยืนยันด้วยการใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (3% KOH) ตามวิธีการของ (Schaad, 1988)

1.3.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน

ปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน (hypersensitive response: HR) จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากข้อ 1.2 ที่มีแนวโน้มเป็น *X. oryzae* pv. *oryzae* เลี้ยงในอาหารเหลว nutrient glucose broth (NGB) นาน 24 ชั่วโมง โดยปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร) ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้หลอดฉีดยาแบบพลาสติกโดยปลดเข็มฉีดยาออกและใช้เฉพาะหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อดูด suspension เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศออก กดปลายกระบอกเข็ม เพื่อฉีด suspension แบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าสู่เนื้อใบด้านใต้ใบของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanti) อายุ 45 วัน อย่างช้า ๆ ใบยาสูบจะมีลักษณะชุ่มน้ำ (water soak) หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ ตรวจสอบผลโดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคจะเกิดอาการตายของเซลล์บนใบยาสูบ โดยทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคภายในระยะเวลา 24–48 ชั่วโมง (Schaad, 1988)

1.3.3 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวพันธุ์อ่อนแอ

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 (มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2551) โดยการเตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NGB นาน 24 ชั่วโมง และวัดค่าการ

ดูคลิ่นแสงที่ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร ของเชื้อที่ผ่านการทดสอบปฏิกิริยา HR แล้วนำมาปลูกเชื้อบนใบข้าวอายุ 45 วันหลังปลูก ด้วยวิธีการตัดปลายใบ (clipping method) (Akhtar *et al.*, 2008) โดยใช้กรรไกรจุ่ม suspension เชื้อที่เตรียมไว้แล้วนำมาตัดที่ปลายใบข้าว (ประมาณ 1 – 2 นิ้ว) ที่ 3 ถึง 4 ใบบน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส และให้ความชื้นสูงเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ประเมินผลการเกิดโรคที่ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อตามระบบ SES (Standard Evaluation System) ของสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (IRRI, 1980) โดยการวัดขนาดความยาวของบาดแผล (lesion length) หน่วยวัดเป็นเซนติเมตร เพื่ออธิบายลักษณะความรุนแรงหรืออ่อนแอของเชื้อสาเหตุโรค และแยกประเภทของระดับความรุนแรงตามเกณฑ์การให้คะแนนการเป็นโรค (disease scores) 4 ระดับ ตามวิธีดัดแปลงมาจากระบบ SES ที่ใช้สำหรับการคัดพันธุ์ข้าวต้านทานโรคดังนี้

ระดับ A ความยาวแผล 0-1 เซนติเมตร จัดเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ ไม่พบบาดแผลหรือบาดแผลขยายเพียงเล็กน้อย พื้นที่ใบถูกทำลาย 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ B ความยาวแผล 1.1-3 เซนติเมตร จัดเป็นสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ พื้นที่ใบถูกทำลาย 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ C ความยาวแผล 3.1-6.9 เซนติเมตร จัดเป็นสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง พื้นที่ใบถูกทำลาย 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ D ความยาวแผล 7 ขึ้นไป จัดเป็นสายพันธุ์รุนแรง พื้นที่ใบถูกทำลาย 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบขึ้นไป

1.4 การศึกษาคุณสมบัติและการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

1.4.1 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวตามมาตรฐานสากล ได้แก่ oxygen relationship, gelatin hydrolysis, catalase production, starch hydrolysis, oxidase test, motility, growth on potato โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มี

แนวโน้มนำเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* บนอาหาร NGA นาน 24-36 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบแต่
ละคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (Holt *et al.*, 2007)

Oxygen relationship โดยนำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา stab inoculation ในอาหาร
NGA หลอมให้เหลวที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อละ 1 หลอด เข้ามือหมุนหลอดให้เชื้อผสมกับ
อาหารโดยอย่าให้เกิดฟองอากาศ เมื่ออาหารแข็งนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
1-3 วัน ถ้าเชื้อเจริญเฉพาะผิวหน้าวุ้นแสดงว่าเป็น aerobe ถ้าเจริญที่ก้นหลอดเป็นพวก anaerobe ถ้า
เจริญจากผิวหน้าลงมากลางหลอดเป็น facultative anaerobe และถ้าเจริญได้ผิวอาหารลงมาเล็กน้อย
จัดเป็น microaerophilic

Gelatin hydrolysis โดยนำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา stab inoculation ในอาหาร
NGB+12% gelatin ในหลอดทดสอบ หลอดละ 1 เชื้อ เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม โดย stab
inoculation ด้วยเข็มเจาะที่ไม่ได้เจาะเชื้อ นำหลอดทดสอบบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 7-14 วัน ตรวจผลโดยนำไปแช่น้ำแข็ง หรือตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบ
ความสามารถในการย่อย gelatin ของเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อที่สามารถย่อยสลาย gelatin ได้นั้นจะทำ
ให้อาหารไม่แข็งตัวหลังจากนำไปแช่เย็น

Catalase production โดยนำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมงมา streak บนอาหารเอียง NGA
ในหลอดทดลองเชื้อละ 1 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
นำหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้มาเติมด้วย 3% H₂O₂ ให้ท่วมอาหารสังเกตการสร้างฟองอากาศดัง
สมการ



ถ้าเชื้อสร้างเอ็นไซม์ catalase จะเกิดฟองอากาศขึ้นที่ผิว

Starch hydrolysis โดยปลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบน starch agar โดย streak
เป็นเส้นตรงบนอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
จากนั้นนำสารทดสอบ Gram's iodine (potassium iodine) เทให้ท่วมอาหารในจานแล้วสังเกตการ
เกิดสีถ้าเกิดสี แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งในอาหารได้ และแป้งจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็น

สีน้ำตาลปนม่วงเกิดขึ้น แต่หากเกิดบริเวณใส ๆ รอบรอยที่มีเชื้อเจริญอยู่ แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้

Oxidase test โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NGA ที่อายุ 16-24 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย 1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride (Kovac's oxidase reagent) ในน้ำเกลือที่ sterile แล้วหยดลงบนกระดาษกรอง smear เชื้อด้วย loop ลงบนกระดาษกรองบริเวณดังกล่าวถ้าผลการทดสอบปฏิกิริยาเป็นบวก กระดาษกรองบริเวณที่ smear เชื้อลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 10 วินาที และถ้าปฏิกิริยาเป็นลบกระดาษกรองบริเวณที่ Smear เชื้อลงไปจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

Motility โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร NGA ที่อายุ 16-24 ชั่วโมง Stab เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปอาหาร lysine indole-motile medium แล้วบ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง การตรวจสอบผล โดยถ้าปฏิกิริยาเป็นบวก เชื้อจะเจริญออกนอกกรอบ stab ทำให้อาหารขุ่น หากปฏิกิริยาเป็นลบ เชื้อเจริญอยู่ที่บริเวณรอย stab เท่านั้น แสดงว่าเชื้อไม่เคลื่อนที่

Growth on potato โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบบนอาหาร NGA ที่อายุ 16-24 ชั่วโมง และนำเข็มเจาะเชื้อ แล้ว step เชื้อลงบนชิ้นมันฝรั่งที่หั่นเป็นแว่นขนาดชิ้นหนาประมาณ 1 เซนติเมตร สังเกตการย่อยชิ้นมันฝรั่ง

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาข้างต้นนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงการจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามข้อมูลในตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition เพื่อจำแนกชนิด (Holt *et al.*, 2007)

1.5 การจำแนกชนิดเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

1.5.1 การเตรียมเชื้อเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มาเลี้ยงในอาหาร NGA จนได้โคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จึงนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี miniprep preparation วิธีของ Chen and

Kuo (1993) โดยแบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งไป เติม lysis buffer (Tris-acetate pH 7.8 40 mM, sodium acetate 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บน้ำใสใส่หลอดใหม่โดยวัดปริมาตร จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วย chloroform ปริมาตรเท่ากับน้ำใสที่ดูดเก็บไว้ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกคว่ำหลอดเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ของเหลวแยกชั้น จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตร สกัดซ้ำด้วย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตรเท่ากันผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตรเติม isopropanol ที่เข้มข้นปริมาตรเท่ากับน้ำใสผสมให้เข้ากันจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาในตู้ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาระยะยาวต่อไป

1.5.2 การตรวจสอบลำดับเบสจำเพาะบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่บริสุทธิ์และผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค แกรม ลักษณะโคโลนี และคุณสมบัติทางชีวเคมี มาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA (Naoto and Takashi, 2000) ได้แก่ XOR-F (5'-GCATGACGTCATCGTCCTGT-3') และ XOR-R2 (5'-CTCGGAGCTATATGCCGTGC-3') ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp น้ำดีเอ็นเอของเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคข้างต้นมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะ (XOR-F และ XOR-R2) และเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR เปรียบเทียบกับ types strain ของ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยปริมาตร PCR-Mixes ที่ใช้ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายปริมาตร 100 นาโนกรัม 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, dNTP 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA

polymerase 0.5 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Zotobowska, 1997) ดังนี้

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาทื)
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	2
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3.ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	58	1
4.สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	5
5.สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Thermal cycle) MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Controller ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Agarose electrophoresis) ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หากดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบเป็น *X. oryzae* pv. *oryzae* และจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบจะต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเทคนิค rep-PCR

2.1 การเตรียมเชื้อเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อสาเหตุโรค การตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA และผ่านการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวม 231 สายพันธุ์ และเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบคือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ TS8208 จากกลุ่มงานบัณฑิตวิทยา กรมวิชาการเกษตร และ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* สาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียของข้าวโพด สายพันธุ์ Aaa9 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ด้วยวิธี minipreparation ตามวิธีการของ Chen and Kuo, (1993) ตามวิธีการในข้อที่ 1.5.1

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งโดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR และ electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิดในการทดลองได้แก่ (1.) primer REP (REP1R) 5'-IIICGZAGCTICGICATCIGGC-3' และ REP (REP2I) 5'-ICGITTATCIGGCCTAC-3' I = Inosine :ซึ่งถูกออกแบบมาจากดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ repetitive extragenic palindromic (REP), (2.) ERIC (ERIC1R) 5'-ATGTAAGCGC TCCTGGGGATTAC-3' และ (ERIC2) 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' ถูกออกแบบมาจากดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC) และ 3. BOX (BOXA1R) 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' ซึ่งถูกออกแบบมาจากดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสของ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al.*, 1994) ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR Mixture เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* 50 นาโนกรัม ผสมกับ 10X PCR buffer (67 mM Tris-HCl (pH 8.8) 83 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 30 mM 2-mercaptoethanol, 10 % dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin) dNTPs ชนิดละ 125 uM, เอนไซม์ *Taq* DNA-polymerase 1.0 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ ERIC หรือ REP ชนิดละ 50 pmol และ BOX จำนวน 100 pmol แล้วเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน บ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Controller โดยกำหนดอุณหภูมิ

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	53 (BOX)	1
	51.5 (ERIC)	1
	42.8 (REP)	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dry ประกอบด้วย 0.4% Bromophenol blue, 0.4% xylene cyanol EF, 30% glycerol, 1mM EDTA – pH 8.0) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ใช้ 2.0 % agarose ใน 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากข้อที่ 2.2 มาวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนไทป์ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ ตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและชัดเจนโดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเท่ากับ 1 ถ้าไม่ปรากฏให้คะแนนเท่ากับ 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ TREECON (Rohlf, 1993) วิเคราะห์ dendrogram โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการจัดกลุ่มของเชื้อตามแหล่งที่มาของเชื้อและความสามารถหรือความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคบนพืชอาศัยข้าว

3. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าวโดยชีววิธี

เก็บตัวอย่างใบ ดิน ลำต้น น้ำ จากแปลงนาที่สมบูรณ์ในจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง ปทุมธานี นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา โดยกำหนดพื้นที่สำรวจแบบสุ่มกระจายทั่วแปลงเป็นจำนวน 10 จุด ต่อแปลงในลักษณะตัวอักษร W ตามวิธีของ (Delp *et al.*, 1986) แล้วนำมาแยกเชื้อตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว

3.1.1 การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบข้าว

แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบข้าวด้วยวิธี leaf wash technique โดยนำใบข้าวตัวอย่างละ 5 กรัม แช่ลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร หยอดสารลดแรงตึงผิว

(Tension-T7) ลงไป 1-2 หยด ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที่ ประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียออกมาอยู่ในน้ำและใช้เป็น stock suspension เนื่องจากความเข้มข้นของ suspension ด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution ที่ 10^2 และ 10^3 เท่า ใช้ micropipette คูด suspension แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกลำต้นโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

3.1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากภายในรากและลำต้น

โดยนำรากและลำต้นข้าวตัวอย่างละ 1 กรัม แช่ลงใน clorox 10% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 2-3 ครั้ง บดตัวอย่างพืชในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใช้ micropipette คูด suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

3.1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณราก (rhizosphere soil)

ด้วยวิธีการดัดแปลงจาก surface soil dilution plate โดยการนำตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 90 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 15-30 นาที บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที่ เพื่อให้เชื้อออกมาอยู่ในน้ำ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ปลอ่ยให้ดินตกตะกอน และเก็บเฉพาะส่วนของน้ำมาเนื่องจากความเข้มข้นเช่นเดียวกับวิธีที่ 3.1.1 ใช้ micropipette คูด suspension แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีของเชื้อที่เจริญทั้งหมดมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.1.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในแปลงนา

แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำในแปลงนาข้าวด้วยวิธีการดัดแปลงจาก dilution plate โดยการนำตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วทำให้เจือจางความเข้มข้นเช่นเดียวกับวิธีที่ 3.1.1

ใช้ micropipette คูด suspension ที่ความเข้มข้น 10^8 10^{10} และ 10^{12} CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA อย่างละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีของเชื้อที่เจริญทั้งหมดมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.2 การคัดเลือกและการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

ทดสอบด้วยวิธี Dual culture technique ใช้ loop เผลาไฟฆ่าเชื้อตะเคียนโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 นำไป streak ลงบนอาหารแข็ง NGA จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อตะเคียนโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak บนอาหาร NGA ในแนวนานกับเชื้อปฏิปักษ์ให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง (สุพจน์, 2545) บันทึกผลโดยการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใน 1 จานเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วย 4 ซ้ำ ของเชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น streak ขนานกันทั้ง 2 เส้น แทนการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ภาพที่ 1 ก)

3.2.2 การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลว NGB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร) ใช้ micropipette คูด suspension เชื้อ

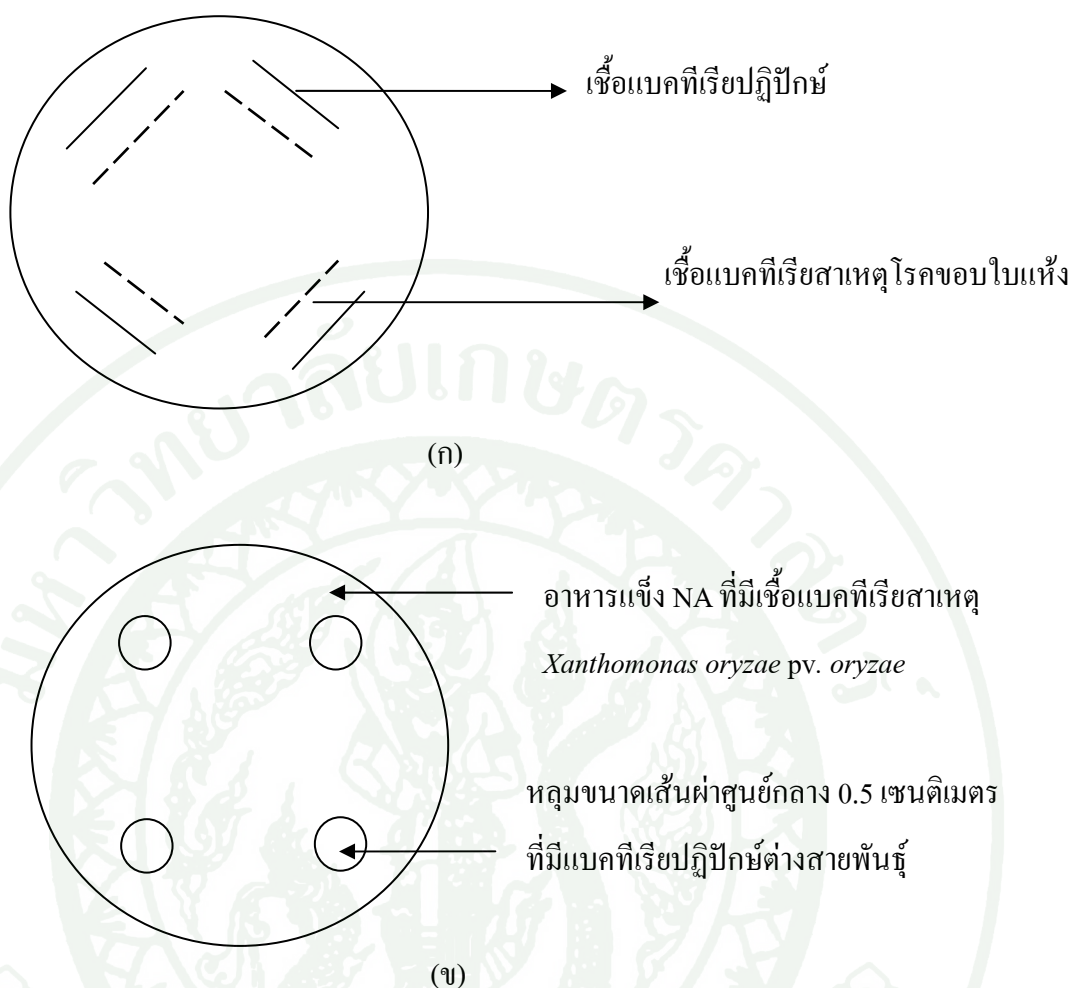
แบคทีเรียสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้แห้งให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ออมน้ำเชื้อแล้วบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA ผสมเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่เตรียมไว้บนเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมบนเชื้อที่อุณหภูมิห้องหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งบนอาหาร NGA เปรียบเทียบกับการมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 (สุพจน์, 2545) เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์สายพันธุ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งดี กว้างที่สุดไปทดสอบต่อในระดับเรือนทดลองและระดับไร่โดยคำนวณจากสูตร (ภาพที่ 1 ข)

$$\text{บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของ cork borer}}{2}$$

2

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ในการกระตุ้นการออกเมล็ด และส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์จากข้อ 3.2.2 และ PGPR มาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของกล้าข้าว โดยการนำเมล็ดข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ในสารละลาย clorox 10% นาน 3-5 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง นาน 3 นาที แล้วนำเมล็ดข้าวดังกล่าวแช่ลงใน suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แต่ละสายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ที่วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปทดสอบในกระดวยเพาะเมล็ดโดยวิธี blotter method อย่างละ 10 ซ้ำ บันทึกผลหลังงอก 14 วัน โดยวัดอัตราการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงต้น เปรียบเทียบกับการมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 1 ภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในห้องปฏิบัติการบนอาหาร NGA โดยวิธีการ dual culture (ก) และ agar diffusion (ข)

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในเรือนทดลอง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA บ่มเชื้อไว้ที่สภาพอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ย้ายโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว NGB นาน 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ปรับค่าความขุ่นของ suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 คลุกเมล็ดข้าวทดสอบด้วย suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ตามวิธีการ (ตารางที่ 1) จากนั้นนำมาปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่ผสมดินปลอด

เชื้อและดูแลในสภาพเรือนทดลอง โดยวัดอัตราการงอกของเมล็ด ความยาวราก ความสูงของต้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่อายุข้าว 14 วัน

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง

3.3.1 การเตรียมพืชทดสอบ และการวางแผนการทดลอง

ปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีรายงานว่าอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยการปลูกข้าวจำนวน 100 เมล็ดต่อกระถาง ใช้ขนาดกระถางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี โดยการคลุกเมล็ดข้าวด้วยเชื้อปฏิชีวนะแต่ละชนิดก่อนปลูกตามวิธีการในข้อ 3.3.2 (ตารางที่ 1) และวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ศึกษาทดลองในสภาพเรือนทดลองของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบและการประยุกต์ใช้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกแล้วจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง และเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์คุณภาพ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่มีรายงานเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมโรคสำคัญของพืชหลายชนิด โดยแยกเลี้ยงในอาหาร NGB นาน 24-48 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (10^8 CFU/มิลลิลิตร) สำหรับคลุกเมล็ด และพ่นใบข้าว ตามโปรแกรมศึกษาในตารางที่ 1 อัตราการคลุกเมล็ด 10 มิลลิลิตร ต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม และพ่นใบที่ 20 มิลลิลิตร ต่อกระถาง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคกับสารเคมี copper hydroxide อัตราคลุกเมล็ด 1 กิโลกรัมต่อสารเคมี 1 กรัม โดยมีการใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ที่อายุพืช 30 และ 60 วัน ในทุกกรรมวิธี

ประเมินโรคโดยสมการการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค การลดการเกิดโรค และระดับความรุนแรงโรค

อัตราการเกิดโรค (disease incident) = จำนวนต้นที่เกิดโรคทั้งหมด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \right]$$

ทั้งนี้ระดับความรุนแรงที่ใช้ประเมินตามเกณฑ์การให้คะแนนการเป็นโรค (disease scores) 4 ระดับ ตามวิธีดัดแปลงมาจากระบบ SES ดังนี้

ระดับ 1 ความยาวแผล 0-1 เซนติเมตร พื้นที่ใบถูกทำลาย 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
 ระดับ 2 ความยาวแผล 1.1-3 เซนติเมตร พื้นที่ใบถูกทำลาย 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
 ระดับ 3 ความยาวแผล 3.1-6.9 เซนติเมตร พื้นที่ใบถูกทำลาย 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
 ระดับ 4 ความยาวแผล 7 ขึ้นไป พื้นที่ใบถูกทำลาย 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบขึ้นไป

3.3.3 การเตรียมเชื้อสาเหตุและการปลูกเชื้อ

เตรียม suspension เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยการนำเชื้อจาก stock culture มาเพิ่มจำนวนบนอาหาร NGA นาน 24-48 ชั่วโมง และย้ายลงเลี้ยงในอาหาร NGB นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ให้มีค่าการดูดกลืนแสง O.D. เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (10^8 CFU/มิลลิลิตร) เมื่อข้าวอายุ 30-35 วัน ซึ่งเป็นระยะอ่อนแอต่อโรคมากที่สุด ปลูกเชื้อดังกล่าวลงบนต้นข้าวแต่ละกรรมวิธีด้วยวิธีการปั่น cell suspension ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร บันทึกผลบนต้นข้าวที่มีการควบคุมโรคด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ตรวจสอบและวิเคราะห์อัตราการเกิดโรค และระดับความรุนแรงโรคขอบใบแห้งที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี copper hydroxide และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ในการชักนำการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่มีผลต่อการชักนำความต้านทานโรคขอบใบแห้งในเรณูทดลอง

3.4.1 การเตรียมต้นข้าวและการปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

เตรียมเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์สุพรรณบุรี1 ซึ่งเป็นตัวแทนข้าวพันธุ์อ่อนแอ และต้านทานตามลำดับ กรรมวิธีละ 100 เมล็ด ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วย clorox 10 % 3 ครั้ง และแช่เมล็ดในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อไว้นาน 1 คืน เพื่อให้เมล็ดงอก ปลุกเมล็ดข้าวที่ผ่านการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามวิธีการต่างๆ คือ กรรมวิธีที่ 1 การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบด้วยน้ำเปล่าหนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อายุ 7 14 21 และ 28 วันหลังปลูก กรรมวิธีที่ 2 การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 (เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง) ที่อายุ 7 15 และ 30 วันหลังปลูก กรรมวิธีที่ 3 การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KPS46 ที่อายุ 7 15 และ 30 วันหลังปลูก และกรรมวิธีที่ 4 การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบด้วยสารเคมี copper hydroxide และกรรมวิธีที่ 5-8 ทำเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1-4 ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคในวันที่ 31 หลังปลูก ที่ความเข้มข้นเชื้อ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง และเก็บตัวอย่างใบข้าวก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค และหลังปลูกเชื้อทุก 24 ชั่วโมง นาน 6 วัน เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมเอนไซม์ ประเมินอัตราการเกิดโรค และการลดการเกิดโรคตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.4.2 การสกัดโปรตีนรวมของข้าว

โดยบดใบข้าวปริมาตร 0.1 กรัม ใน homogenization buffer (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7, 0.1 M KCl, 1mM PMSF, 1 μ g /ml leupeptin, 1 % (v/v) Triton X-100 3 % (w/v), Polyvinylpyrrolidone (PVPP) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ (Bradford, 1976) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm โดยใช้ BSA เป็น standard

3.4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase

นำ homogenate ที่สกัดได้จากตัวอย่างใบข้าว ทำปฏิกิริยากับ 4% ของ Laminarin ในอัตราส่วนต่อปริมาตร (v/v) คือ 65 ไมโครลิตร / 65 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมด ต้มในน้ำร้อนพร้อมกับเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 375 ไมโครลิตร ของ dinitrosalicylic acid และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าโดยใช้สมการ standard curve โดยแสดงค่าเป็น μ g glucose released min⁻¹ mg⁻¹ protein ตามวิธีการดัดแปลงของ (Pan *et al.*, 1991) คือ

$$\frac{\text{ค่าปฏิกิริยาเอนไซม์ } \beta\text{-1,3-glucanase}}{\text{total protein}}$$

$$\text{ปฏิกิริยาเอนไซม์ } \beta\text{-1,3-glucanase} = (1.4622 \times \text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}) + 0.0152$$

$$\text{Total protein} = (0.1074 \times \text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}) + 0.1329$$

ตารางที่ 1 กรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตกล้าในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี	รายละเอียดกรรมวิธี ^{1/}
1	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ร่วมกับพ่นใบ ทุก 7 วัน รวม 10 ครั้ง (7 14 21 28 35 42 49 56 63 และ 70 วันหลังปลูก)
2	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ D10 ร่วมกับพ่นใบทุก 7 วัน รวม 10 ครั้ง (7 14 21 28 35 42 49 56 63 และ 70 วันหลังปลูก)
3	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรีย KPS46 ร่วมกับพ่นแบคทีเรีย KPS46 ทุก 7 วัน รวม 10 ครั้ง (7 14 21 28 35 42 49 56 63 และ 70 วันหลังปลูก)
4	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ร่วมกับพ่นใบทุก 15 วัน รวม 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก)
5	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ D10 ร่วมกับพ่นใบทุก 15 วัน รวม 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก)
6	คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรีย KPS46 ร่วมกับพ่นแบคทีเรีย KPS46 ทุก 15 วัน รวม 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก)
7	คลุกเมล็ดด้วยสารเคมี copper hydroxide ร่วมกับการพ่นทุก 15 วันหลังปลูก
8	กรรมวิธีควบคุม (negative control); ที่ไม่มีการควบคุมโดยวิธีใด ๆ

^{1/} = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 และ D10 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่ผ่านการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ และ KPS46 คือ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด

3.5 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการจำแนกชนิด

จากการคัดเลือกประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ ไอโซเลต XA6 ที่แยกจากดินแปลงนา จึงได้นำมาจำแนกชนิดต่อไป

3.5.1 ศึกษาคุณสมบัติการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์กระจายลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อและทำลายคราบมันแล้วยึด (fixed) เซลล์ด้วยการลนเปลวไฟห่าง ๆ 1-2 ครั้ง นำไปย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) ด้วยสาร crystal violet และ safranin-O ตามวิธีการของ (Schaad, 1988) โดยที่เซลล์แบคทีเรียที่ติดสีม่วงของ crystal violet เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ถ้าติดสีแดงของ safranin -O เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขึ้นชั้นการทดสอบด้วย 3%

3.5.2 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA นาน 24-36 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ oxygen relationship, motility, gelatin hydrolysis, catalase production, levan formation, starch hydrolysis, growth on potato, citrate utilization, oxidase test, lipolytic activity และ tobacco hypersensitive ตามวิธีการดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ในข้อที่ 1.4.1 ข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงการจำแนกเชื้อแบคทีเรียจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition เพื่อจำแนก (Holt *et al.*, 2007)

3.5.3 ทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันบนใบยาสูบ

การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน โดยเตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เลี้ยงในอาหารเหลว nutrient glucose broth (NGB) นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเชื้อด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ด้วยหลอดชนิดยาแบบพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ปลอดเชื้อที่ปลอดเชื้อชนิดยาออก ดูด suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เตรียมปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศออก กดปลายกระบอกเข็มเพื่อฉีด suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเข้าสู่

เนื้อใบด้านใต้ใบของต้นยาสูบ (*N. tabacum* cv. Xanti) อายุ 45 วัน อย่างช้า ๆ ใบยาสูบจะมีลักษณะชุ่มน้ำ (water soak) หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ ตรวจสอบผลโดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคจะเกิดอาการตายของเซลล์บนใบยาสูบ โดยทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลไหม้รอบบริเวณที่ฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคภายในระยะเวลา 24–48 ชั่วโมง (Schaad, 1988)

3.5.4 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส Universal Primer บริเวณ 16S rRNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ทำการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากขั้นตอนข้างต้น โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย Universal Primer บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Bacillus atrophaeus* โดยใช้ไพรเมอร์ Bbub5F (5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3') และ Bbub3R (5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3') ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ที่ขนาด 595 bp โดยการสกัดดีเอ็นเอและนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะแล้วเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR ใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR Mixture เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายปริมาตร 100 นาโนกรัม 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, dNTP 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์อย่างละ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรที่เหลือด้วยน้ำ ddH₂O ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ (Wattiau *et al.*, 2001)

	อุณหภูมิ(°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	4
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	2
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Thermal cycle รุ่น MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Controller ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง ultraviolet

นำผลที่ได้จากการทำการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ด้วย Universal Primer บริเวณ 16S rDNA และเมื่อทำการแยกสกัดแถบ DNA ดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Sequence analysis (Biodesign) นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยโปรแกรม phylogeny phylogenetic tree version 7.0

4. การพัฒนาสูตรเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติสหายพันธุ์ใหม่เป็นสูตรสำเร็จชนิดผงเพื่อปรับใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว

4.1 อาหารเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อ

4.1.1 การศึกษาชนิดและองค์ประกอบอาหาร

การคัดเลือกชนิดพืชและแหล่งของธาตุพืชที่คาดว่าจะสามารถใช้เป็นแหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติสหายได้แก่ มันฝรั่ง มันเทศ ปลาข้าว รำ ข้าว ฟางข้าว แกลบ และกากน้ำตาล ที่สามารถแทนเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต และให้พลังงานต่อแบคทีเรียได้ และในส่วนของแหล่งไนโตรเจนได้แก่ ถั่วชนิดต่าง ๆ คือ ถั่วขาว ถั่วเหลือง ถั่วเขียว โดยการนำเอาส่วนผสมแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วชั่งน้ำหนักจำนวน 10 กรัม ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว กรองแยกกากและเก็บส่วนที่เป็นสารละลายน้ำจากการนึ่งขึ้นพืชและถั่วต่าง ๆ (น้ำต้มธัญพืช) ให้เย็น จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติสหายพันธุ์ XA6 ที่เป็นสายพันธุ์คุณภาพที่คัดเลือกแล้วจากวิธีการต่าง ๆ ข้างต้น ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว NGB และปรับค่าความขุ่น suspension ที่ 0.2 O.D. (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมลงในน้ำต้มธัญพืชที่ดัดแปลงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อดังกล่าวโดยบ่มเชือบนเครื่องเขย่านาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่

เจริญในสารอาหารในทุกกรณีวิธีด้วยวิธี 10-fold serial dilution และใช้ micropipette คูดสารแขวนลอยเชื้อที่เลี้ยงแล้วที่ปริมาตร 10^{-5} มาทำการ spreadplate แล้วนับจำนวนประชากรเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีบนผิวหน้าอาหารทดสอบ และคำนวณค่าประชากร/ปริมาตรอาหาร 1 มิลลิลิตร ตามสูตร colony x 10^n x 10 โดย 10^n คือ จำนวนยกลำกล้องที่ทำการเจือจาง

4.2 การศึกษาอัตราส่วน และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์อาหารคัดแปลงสำหรับการนำมาใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จชนิดผง

4.2.1 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนผสมอาหารเพิ่มปริมาณเซลล์

คัดเลือกตัวแทนน้ำต้มพืชและเมล็ดธัญพืชที่มีแนวโน้มเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์สายพันธุ์ XA6 ที่ดีที่สุด ได้แก่ น้ำต้มมันฝรั่ง กากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง โดยใช้อัตราส่วนของกากน้ำตาลต่อกากถั่วเหลืองอัตรา 1:1 กรัม (10:10 ในน้ำ 1 ลิตร) โดยเปรียบเทียบสัดส่วน (ซัยลิทรี, 2548) ของมันฝรั่งที่สัดส่วนเริ่มต้นต่างกันคือ 100, 150, 200, 250 และ 300 กรัมในปริมาตรน้ำ 1 ลิตร เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดและมีสารอาหาร (C:N) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ และสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ได้อย่างรวดเร็ว เปรียบเทียบกับอาหารคัดแปลง MS (ซัยลิทรี, 2548) และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป NGB โดยอาหารแต่ละชนิดจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำ suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปรับค่าความขุ่นที่ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU /มิลลิลิตร) เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลวสูตรเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ดีที่สุด คือ สูตร น้ำต้มมันฝรั่ง: กากน้ำตาล : กากถั่วเหลือง อัตราส่วนเท่ากับ 250:10:10 (กรัม) โดยใช้ micropipette คูด suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSP medium (อาหารคัดแปลงจากการใช้วัตถุดิบที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 4.2.1) NGB medium, MS medium (ซัยลิทรี, 2548) ในฟาร์สขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร ต่อชนิดอาหารทดสอบ ตรวจสอบปริมาณเซลล์ทุกชั่วโมงด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร NGA ตั้งแต่ช่วงเวลา 0-96 ชั่วโมง

4.2.3 การศึกษาสภาพการเป็นกรด-ด่าง ของสูตรอาหารคัดแปลงเพิ่มปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วย น้ำต้มมันฝรั่ง: กากน้ำตาล : กากถั่วเหลือง อัตราส่วนเท่ากับ 250:10:10 (กรัม) และมีการปรับค่ากรด-ด่าง โดยการใช้ 1 N HCL และ 1 N NaOH ปรับ pH เริ่มต้นที่ระดับ 5 6 7 8 9 และ 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ดังกล่าว เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที่ ในสภาพอุณหภูมิห้อง เลี้ยงเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์ด้วยการทำ 10-fold serial dilution ที่ 10^{16} 10^{18} และ 10^{20} โดยใช้เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์เริ่มต้นที่เลี้ยงในอาหาร NGB ปรับค่าความขุ่นของเชื้อที่ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU /มิลลิลิตร)

4.2.4 การศึกษาผลของอัตราเร็วของการเขย่าที่สัมพันธ์กับการกระจายตัวออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์ในสูตรอาหารดัดแปลงเพิ่มปริมาณเซลล์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วย น้ำต้มมันฝรั่ง: กากน้ำตาล : กากถั่วเหลือง อัตราส่วนเท่ากับ 250:10:10 (กรัม) และมีการปรับค่ากรด-ด่าง ที่ระดับ 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยนำไปเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเร็วของการเขย่าที่แตกต่างกันเริ่มต้นที่ 100 120 130 140 และ 150 รอบต่อนาที ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ดังกล่าว ระดับละ 500 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้อง โดยใช้เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์เริ่มต้นที่เลี้ยงในอาหาร NGB ปริมาตร 2 ไมโครลิตรที่ปรับค่าความขุ่นของเชื้อที่ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร) ตรวจสอบปริมาณเซลล์ทุกชั่วโมงด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร NGA

4.3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดผงแบคทีเรียปฏิกรณ์

4.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์

เตรียมเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์สายพันธุ์ XA6 เพื่อผสมกับสารพา โดยใช้เจียปลดเชื้อตะไคร่โคโคโคนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์สายพันธุ์ XA6 อายุประมาณ 24 ชั่วโมง บนอาหาร NGA ย้ายลงในอาหาร NGB ประมาณ 5 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อดังกล่าวต่อโดยบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที่ นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ micropipette ดูด cell culture ของเชื้อเติมลงไปใน flaste ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพิ่มปริมาณสูตรดัดแปลง 500 มิลลิลิตร หลังจาก

นั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสและเก็บตะกอนมาทำการละลายด้วยน้ำกลั่น และนำไปปรับค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 0.7 O.D. ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีประชากรของเชื้อที่มีการศึกษา dillution plate count ที่ 6×10^{15} CFU /มิลลิลิตร) เพื่อนำไปผสมกับสารพาในกระบวนการผลิตสูตรผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

4.3.2 การคัดเลือกชนิดของสารพา และอัตราส่วนผสมที่เหมาะสม ต่อการคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

ประเมินคุณสมบัติสารพานิต่างๆ เพื่อคัดเลือกชนิดที่มีคุณสมบัติในการกระจายตัวในน้ำ และเป็นที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียปฏิชีวนะได้ดีคือ ทาลคัม โดโลไมด์ และผงแคลเซียม (CaCO_3) ทั้งแบบเดี่ยว และแบบผสม ตามอัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 2 ในส่วนของอัตราน้ำหนักรวม 90 กรัม และผสม cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะประมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าถุงพลาสติกเพื่อให้ cell suspension กระจายตัวในสารพา จากนั้นนำไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำผงเชื้อแบ่งใส่ถุงพลาสติกประมาณถุงละ 5 กรัม ปิดผนึกถุงให้แน่นเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง ($28-30^\circ\text{C} \pm 2$) ประเมินประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์ แต่ละสูตร โดยตรวจสอบความมีชีวิตรอดของประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทุกเดือนโดยวิธี dilution plate บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24-28 ชั่วโมง ติดต่อกันนาน 6 เดือน

ทั้งนี้หลังการผสมสูตรต่าง ๆ แล้ว มีการประเมินประสิทธิภาพการแขวนลอย และการกระจายตัวสม่ำเสมอในน้ำของสารพาที่ผสมเชื้อปฏิชีวนะเรียบร้อยแล้ว แต่ละสูตร โดยการนำผงสูตรแต่ละสูตรอัตรา 1 กรัม เทลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่บรรจุหลอดแก้ว 9 มิลลิลิตร มาจับเวลาความสามารถในการแขวนลอยหลังผสมสารพาในน้ำทันที แบ่งการประเมินออกเป็น 5 ระดับ โดยการจับเวลาการละลายน้ำของสารพา 5 ระดับ

ระดับที่ 1 สารพากระจายตัวในน้ำสม่ำเสมอ และไม่ตกตะกอนทันทีได้ภายใน 1-5 นาที (ประสิทธิภาพดีที่สุด)

ระดับที่ 2 สารพากระจายตัวแขวนลอยได้ภายใน 5-10 นาที และไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพดี)

ระดับที่ 3 สารพากระยตัวและแขวนลอยในน้ำได้สม่ำเสมอภายใน 11-30 นาที ไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพปานกลาง)

ระดับที่ 4 สารพากระยตัวและแขวนลอยในน้ำได้สม่ำเสมอภายใน 31-60 นาที และไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพพอใช้)

ระดับที่ 5 สารพากระยตัวและแขวนลอยในน้ำ ไม่ละลายน้ำ เกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อนบนผิวน้ำ (ต่ำกว่ามาตรฐาน)

ตารางที่ 2 สูตรสารพากระยตัวและอัตราส่วนผสมสำหรับการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

สารพา ^{1/}	อัตราส่วน (กรัม)
1 Talcum	100
2 Calcium	100
3 Dolomite	100
4 Talcum+calcium 1:1	50:50
5 Talcum+calcium2:1	66:34
6 Talcum+calcium1:2	34:66
7 Talcum+ Dolomite1:1	50:50
8 Talcum+ Dolomite2:1	66:34
9 Talcum+ Dolomite1:2	34:66
10 Calcium+ Dolomite1:1	50:50
11 Calcium+ Dolomite2:1	66:34
12 Calcium+ Dolomite1:2	34:66

^{1/} = อัตราส่วนสารพาที่มีการผสมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 10 มิลลิกรัม (1×10^8 CFU/มิลลิกรัม) ต่อสารพา 90 กรัม

4.3.3 การคัดเลือกชนิดของสารเสริมประสิทธิภาพ (adjuvant) และแหล่งอาหาร (substrate) สำหรับการมีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จชนิดผง และการผสมสูตร

คัดเลือกชนิดสารอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เพื่อเสริมประสิทธิภาพการมีชีวิตรอดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 โดยคัดเลือกกลูโคสเป็น adjuvant ของสูตรอาหาร ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพการใช้กลูโคสในการผลิตสูตรสำเร็จชนิดผงที่มีประสิทธิภาพดี (El-Hassan and Gowen, 2006) และ caboxymethyl cellulose (CMC) เป็น adjuvant (Jayaraj *et al.*, 2005) และกากน้ำตาล ผสมกับสารพาที่ดีที่สุด (คัดเลือกจากข้อ 4.3.2) เพื่อใช้ในการผสมเป็นสูตรสำเร็จชนิดผง

การผสมสูตร โดยการเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อ 150 รอบต่อนาที่ ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ ปรับให้มีปริมาณเซลล์เชื้อ 0.7 O.D. 600 นาโนเมตร (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น นิ่งมาเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6×10^{15} CFU /มิลลิลิตร) ผสมในสูตร ที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อ 2 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 1 วัน อัตราส่วนเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 10 มิลลิลิตร ต่อสูตรสำเร็จ 90 กรัม นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50°C นาน 3-4 ชั่วโมง หรือให้ความชื้นสัมพัทธ์ 35-40% นำมาบรรจุถุง ถุงละ 1 กรัม/ถุง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินความอยู่รอดของเชื้อของแบคทีเรียปฏิชีวนะ และคุณภาพสูตรสำเร็จ โดยนับปริมาณเซลล์ด้วยวิธี plate count technique ทุกเดือน

ตารางที่ 3 สูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ส่วนประกอบ และอัตราส่วนที่เหมาะสม

สูตร	ส่วนประกอบ	อัตราส่วน
สูตร Formula1XA6	talcum, calcium, CMC, และน้ำตาลกลูโคส	60:30:8:2
สูตร Formula2 XA6	talcum, calcium และ CMC	60 : 38 : 2
สูตร Formula3 XA6	XA6 (talcum, calcium และน้ำตาลกลูโคส)	60 : 38 : 2
สูตร Formula4 XA6	talcum, calcium, CMC และกากน้ำตาล	60 : 38 : 2
สูตร Formula5 XA6	talcum, calcium และกากน้ำตาล	60 : 38 : 2

4.3.4 การทดสอบคุณสมบัติของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ทางด้านการละลายน้ำของสูตร ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบคุณสมบัติของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ทางด้านการละลายน้ำ โดยการนำแต่ละสูตรมาจับเวลาความสามารถในการละลายน้ำหลังผสมในน้ำทันที แบ่งการประเมินออกเป็น 5 ระดับ (วิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 4.3.2)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง

4.4.1 การเตรียมต้นข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน clorox 10 % นาน 5 นาที แล้วล้างตามด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อนาน 1 คืน และคลุมผ้าขาวบางให้ความร้อนเพื่อให้เมล็ดงอก หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวออกไปคลุกด้วยผงสูตรผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดในทุกตัวชีวิตจากการศึกษาข้างต้นตามกรรมวิธี (ตารางที่ 4) โดยปลูกข้าวในการถางขนาด 8x12 นิ้ว ที่บรรจุน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว กระจายละ 2 กิโลกรัม จำนวน 100 เมล็ดต่อกระถาง โดยการทดลองนี้ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ร่วมกับการพ่นใบข้าวที่อายุ 7 14 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก ตรวจสอบผลการทดลองอัตราการเจริญเติบโตที่อายุ 45 วัน ทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด เปรียบเทียบกับคลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วยสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ KPS46 – ISR-B, กรรมวิธีใช้สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

4.4.2. การเตรียมสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

นำสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง ที่อายุการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน ละลายน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อัตราส่วนผงผลิตภัณฑ์/คลุกเมล็ดข้าว อัตรา 1 กรัม ต่อเมล็ดข้าว 1 กิโลกรัม ร่วมกับการพ่นใบข้าวโดยใช้สารละลายสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อน้ำกรอง อัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 15-20 ลิตร และผสมสารจับใบอัตรา 10 มิลลิลิตรในการพ่นใบอัตรากระถางละ 20 มิลลิลิตร ทั้งนี้การพ่นเชื้อทางใบจะพ่นรวม 6 ครั้งตลอดการทดลอง คือ ที่อายุข้าว 7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อสด สารเคมี copper hydroxide และสูตรการค้า ISR-B (*B. amyloliquefaciens* KPS46)

4.4.3 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคและการปลูกเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งบนอาหาร NGA นาน 24 ชั่วโมงแล้วย้ายโคโลนีเดี่ยวลงเลี้ยงต่อในอาหาร NGB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่ความยาวคลื่น 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และนำไปปั่นต้นข้าวทดสอบโดยการปั่น suspension เชื้อลงบนต้นข้าวอายุ 31 วันหลังปลูก (หลังพ่นเชื้อแบบที่เรียกปฏิบัติครั้งที่ 3 (30 วัน) 24 ชั่วโมง) โดยพ่นใช้อัตรา 20 มิลลิลิตร/กระถาง

ประเมินอัตราการเจริญเติบโตของข้าวทางด้านความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด ที่อายุ 45 วันหลังปลูก และอัตราการเกิดโรค การลดการเกิดโรค ความรุนแรงในการเกิดโรค 7 วัน หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

ตารางที่ 4 กรรมวิธีการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบข้าวด้วยสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผง

กรรมวิธี	รายละเอียดกรรมวิธี ^{1/}
1	คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วย cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 อัตราเชื้อ 10 มิลลิลิตร/เมล็ดข้าว 1 กิโลกรัม ร่วมกับพ่นใบ 6 ครั้ง ที่อายุ 7 15 30 45 60 และ 75 วัน หลังปลูก ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง
2	คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วยสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 สูตร1 ประกอบด้วยทัลคัม ผงแป้งแคลเซียม CaCO ₃ CMC กลูโคส อัตรา 60:30:8:2 อัตราเชื้อ 1 กรัม/เมล็ดข้าว 1 กิโลกรัม ร่วมกับพ่นใบ 6 ครั้ง ที่อายุ 7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง
3	คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วยสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KPS46-ISR-B อัตราเชื้อ 1 กรัม/เมล็ดข้าว 1 กิโลกรัม ร่วมกับพ่นใบ 6 ครั้ง ที่อายุ 7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง
4	กรรมวิธีใช้สารเคมี (คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วย copper hydroxide) อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
5	กรรมวิธีควบคุม (คลุกเมล็ด และพ่นใบด้วยน้ำเปล่าหนึ่งมาเชื้อ)

5. การประยุกต์ใช้สูตรผลิตภัณฑ์แบคทีเรียชนิดผงในสภาพไร่

5.1 วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) บนเนื้อที่แปลงนา ขนาด 4 ไร่ ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ (ตารางที่ 5) ณ ตำบลบ้านพราน อำเภอแสวงหา จังหวัดอ่างทอง ระหว่างเดือน มีนาคม-มิถุนายน พ.ศ. 2553 โดยการทำนาแบบนาหว่านน้ำตาม แต่ละซ้ามี่พื้นที่ 400x500 ตารางเมตร เตรียมดินโดยการไถเปิดดิน 1 ครั้ง ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ และไถ ละเอียดอีก 2 ครั้ง เพื่อทำเทือก หลังจากนั้นใช้พลาสติกสีดำขนาดกว้าง 1 เมตร กั้นแปลงนาเป็นบล็อกย่อย นิดพ่นสารเคมีคุมวัชพืชร่อนอก 1 ครั้ง (10 ซีซี: น้ำ 1 ลิตร) การให้น้ำและให้ปุ๋ยใช้ตามวิธีการของ เกษตรกร ทำการทดสอบในสภาพไร่ โดยใช้กรรมวิธี โดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ ทดลอง ทำการทดลอง

5.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดผง ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพไร่

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แฉ่นานาน 1 คืน โดยแบ่งเมล็ดข้าวสำหรับ หว่านในแปลงทดลองรวม 180 กิโลกรัม โดยแบ่งไร่ละ 45 กิโลกรัม (3 ถัง) และตั้งทิ้งไว้ให้เมล็ด ข้าวงอกหลังจากนั้นคลุกเมล็ดข้าวตามกรรมวิธีต่าง ๆ (ตารางที่ 5) โดยใช้อัตราการคลุกเมล็ดของ ผลิตภัณฑ์ 15 กรัม ต่อข้าว 1 ถัง (15 กิโลกรัม) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำข้าวไปหว่านในแปลงนาที่ผ่าน การทำเทือกไว้เรียบร้อยแล้วโดยใช้เครื่องหว่านลม จากนั้นร่อนเมล็ดข้าวงอกจึงทำการพ่นเชื้อซ้ำ อีก 6 ครั้ง ที่อายุ 7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก ใช้ปริมาณผงผลิตภัณฑ์ 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และเติมสารจับใบปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการจับยึดติดใบข้าวมากขึ้นตามรายละเอียด ในตารางที่ 4 และปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่อายุข้าว 31 วันหลังปลูก (หลังพ่นสูตรผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียปฏิชีวนะครั้งที่ 3 ที่ 30 วันหลังปลูก) ประเมินอัตราการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และอัตราการการแตกกอ ที่อายุข้าว 45 วันหลังปลูก (ระยะที่มีการ เจริญเติบโตเต็มที่) และปริมาณผลผลิตข้าวหลังการเก็บเกี่ยว เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี copper hydroxide ผลิตภัณฑ์ ISR-B และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้ ทั้งนี้มีการประเมินการเกิด โรค การลดลงของการเกิดโรค ที่อายุ 7 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง โดยใช้เกณฑ์ตาม รายละเอียดในข้อ 3.4.2

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงในการควบคุมโรคและความสัมพันธ์ของการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในสภาพไร่

วางแผนการทดลอง วิธีการเตรียมแปลงนา และกรรมวิธีดังตารางที่ 4 เช่นเดียวกับในข้อ 5.1 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 เป็นชุดที่มีการปลูกเชื้อ และชุดที่ 2 เป็นชุดที่ไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าว โดยชุดที่ 1 เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อายุ 30, 31, 32, 33, 34, 35 และ 36 วันหลังปลูก และปลูกเชื้อในวันที่ 31 วันหลังปลูก เพื่อมาตรวจการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในต้นข้าว โดยใบข้าวที่เก็บจะต้องตัดมา 10 กรัม และเก็บในกล่องที่บรรจุน้ำแข็งหรือน้ำแข็งแห้งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา และประเมินการเกิดโรคและการลดลงของการเกิดโรค 7 วันปลูกเชื้อสาเหตุโรค วิธีการดังรายละเอียดในข้อที่ 3.4.2

5.2.1 การสกัดโปรตีนรวมของข้าว

นำตัวอย่างใบข้าวที่สุ่มเก็บแต่ละระยะปริมาตร 0.1 กรัม นำตัวอย่างมาบดใน homogenization buffer (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7, 0.1 M KCl, 1mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 % (v/v) Triton X-100 3 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone: PVPP) ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วย micropipette เพื่อใช้โดยวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm โดยใช้ BSA เป็น standard

5.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase

นำ homogenate ที่สกัดได้จากตัวอย่างใบข้าว ทำปฏิกิริยากับ 4% ของ Laminarin ในอัตราส่วนต่อปริมาตร (v/v) คือ 65 ไมโครลิตร/65 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมด ต้มในน้ำร้อนพร้อมกับเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม dinitrosalicylic acid 375 ไมโครลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมั่นเหวี่ยงแบ่งแยกตะกอน และนำส่วนใสที่ได้มา วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าโดยใช้สมการ standard curve โดยแสดงค่าเป็น μ g glucose released $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein ตามวิธีการของ (Pan *et al.*, 1991)

$$\frac{\text{ค่าปฏิกิริยาเอนไซม์ } \beta\text{-1,3-glucanase}}{\text{total protein}}$$

$$\text{ปฏิกิริยาเอนไซม์ } \beta\text{-1,3-glucanase} = (1.4622 \times \text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}) + 0.0152$$

$$\text{Total protein} = (0.1074 \times \text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}) + 0.1329$$

ตารางที่ 5 กรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพทางด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรสำเร็จชนิดผงในสภาพไร่

กรรมวิธี	รายละเอียดกรรมวิธี
1	คลุกเมล็ดด้วยสูตรผลิตภัณฑ์ Formula1XA6 (หัตถ์ คัม ผงแป้ง CaCO_3 CMC กลูโคส อัตรา 60:30:8:2) ร่วมกับพ่นใบ 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก)
2	คลุกเมล็ดด้วยสูตร ISR-B ร่วมกับพ่นใบ 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก)
3	กรรมวิธีคลุกเมล็ดด้วย copper hydroxide ร่วมกับการพ่นใบทุก 15 วันหลังปลูก
4	กรรมวิธีควบคุม (control negative); ที่ไม่มีการควบคุมโดยวิธีใด ๆ

ผลและวิจารณ์

ผล

1. สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

1.1 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบข้าวที่เป็นโรค

จากการเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งจากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยทั้งหมด 9 จังหวัด คือ สุพรรณบุรี อ่างทอง ชัยนาท ปทุมธานี สมุทรปราการ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สระบุรี และนครศรีธรรมราช สามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ทั้งหมด 230 ไอโซเลท จากโคลนเชื้อสาเหตุได้รวม 336 ไอโซเลท (รายละเอียดในข้อ 1.2) ทั้งนี้ได้บันทึกข้อมูลพันธุ์ข้าว ปีที่เก็บ สถานที่ และลักษณะอาการ ความรุนแรงของตัวอย่างข้าวเป็นโรคไว้ในตารางที่ 6 โดยจัดแบ่งตามระดับความรุนแรงโรครายได้เกณฑ์ของ IRRI (1980) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ระดับ A ถึง D โดยระดับ A = การปรากฏพื้นที่ใบข้าวเป็นโรคเฉลี่ยเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จึงจัดว่าเชื้อโรคในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ, B = การปรากฏพื้นที่ใบข้าวเป็นโรคเฉลี่ยเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด เชื้อโรคในกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ, C = การปรากฏพื้นที่ใบข้าวเป็นโรคเฉลี่ยเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จึงจัดเชื้อโรคในกลุ่มนี้เป็นเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง และ D = การปรากฏพื้นที่ใบข้าวเป็นโรคเฉลี่ยเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด ขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ TB0037 สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวเพื่อใช้เป็น type strain จากคุณณัฐิมา โหมยิตเจริญกุล กลุ่มงานבקเทรวิทยา กรมวิชาการเกษตร จำนวน 1 สายพันธุ์ รวมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 231 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7) โดยรายละเอียดข้อมูลการแยกเชื้อ ลักษณะความแตกต่างของโคลน ความรุนแรง และผลการศึกษาคุณสมบัติข้างต้น และการจำแนกชนิดจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 6 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องที่ได้จากการแยกและรวบรวมในการศึกษา

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
X001	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	A	1
X0012	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	D	2
X0012-1	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	A	3
X0013x	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	B	4
X0014	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	C	5
X0015x	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	C	6
X0016	ปทุมธานี1	2550	อ่างทอง	B	7
X0017	พิษณุโลก60	2550	อ่างทอง	C	8
X0019	พิษณุโลก60	2550	อ่างทอง	D	9
X00S	พิษณุโลก60	2550	อ่างทอง	B	10
X00S001	พิษณุโลก60	2550	อ่างทอง	B	11
X00S31	พิษณุโลก60	2550	อ่างทอง	C	12
S201	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	C	13
S202	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	C	14
S208	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	B	15
S217	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	A	16
S218	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	B	17
S232	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	C	18
S233	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	B	19
S235	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	C	20
S238	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	D	21
S241	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	D	22
S243	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	D	23
S268	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	C	24
S272	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	C	25
S274	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	B	26

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^u	หมายเลข จัดเก็บ
S345	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	D	27
S346	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	C	28
S351	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	B	29
S352	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	A	30
S416	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	A	31
S417	พิษณุโลก1	2550	สุพรรณบุรี	C	32
KT11	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	B	33
KT24	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	B	34
KT1/1	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	C	35
KT110	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	A	36
KT1	พิษณุโลก60	2550	สุพรรณบุรี	A	37
IS01	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	D	38
IS02	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	B	39
IS03	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	A	40
IS04	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	B	41
IS05	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	B	42
S06	ชัยนาท1	2551	ชัยนาท	D	43
J4-2	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	C	44
J4-3	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	C	45
J4-4	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	D	46
J26	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	A	47
J32	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	B	48
J37	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	B	49
J38	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	A	50
J39	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	A	51
J41	ปทุมธานี60	2551	ปทุมธานี	D	52
J42-1	ราชินี	2551	ปทุมธานี	C	53

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ¹	หมายเลข จัดเก็บ
J45	ราชินี	2551	ปทุมธานี	C	54
J46	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	55
J57	ราชินี	2551	ปทุมธานี	A	56
J58	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	57
J60	ราชินี	2551	ปทุมธานี	D	58
J60/1	ราชินี	2551	ปทุมธานี	D	59
J62	ราชินี	2551	ปทุมธานี	A	60
J63	ราชินี	2551	ปทุมธานี	A	61
J65	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	62
J66	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	63
J67	ราชินี	2551	ปทุมธานี	C	64
J68	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	65
J68/1	ราชินี	2551	ปทุมธานี	A	66
J69	ราชินี	2551	ปทุมธานี	C	67
J70	ราชินี	2551	ปทุมธานี	D	68
J70-1	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	69
J71	ราชินี	2551	ปทุมธานี	D	70
J72	ราชินี	2551	ปทุมธานี	B	71
J73	ราชินี	2551	ปทุมธานี	A	72
JJ74	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	C	73
J80	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	C	74
J81	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	D	75
J82	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	A	76
J82/1	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	B	77
J83	พิษณุโลก1	2551	นนทบุรี	A	78
NI0026	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	D	79
NI0027	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	A	80

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^๑	หมายเลข จัดเก็บ
NI0028	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	B	81
NI0029	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	C	82
NI0030	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	D	83
NI0031	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	C	84
NI0035	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	C	85
NI0037	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	D	86
NI0038	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	A	87
NI0039	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	B	88
NI0040	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	B	89
NI0041	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	A	90
NI0042	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	A	91
NI0043	ปทุมธานี1	2551	นนทบุรี	D	92
NI0044	ปทุมธานี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	C	93
NI0045	ปทุมธานี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	A	94
NI0046	ปทุมธานี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	95
NI0047	ปทุมธานี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	96
NI0048	ปทุมธานี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	D	97
NI0051	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	A	98
NI0052	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	99
NI0053	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	100
NI0058	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	C	101
NI0060	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	D	102
NI0062	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	103
NI0063	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	C	104
NI0070	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	C	105
NI0071	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	B	106
NI0072	สุพรรณบุรี1	2551	พระนครศรีอยุธยา	A	107

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
NI0073	สุพรรณบุรี 1	2551	พระนครศรีอยุธยา	A	108
NI0074	สุพรรณบุรี 1	2551	พระนครศรีอยุธยา	C	109
C2	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	A	110
C4-1	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	111
C4-11	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	D	112
C4-2	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	A	113
C5	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	114
C6	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	D	115
C7	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	B	116
C11	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	B	117
Su12	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	118
Su17	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	119
Su6	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	D	120
Su8	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	A	121
Su9	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	B	122
Su10-1	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	123
Su13-1	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	A	124
Su40	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	D	125
NK044	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	B	126
NK050	ชัยนาท 1	2551	สมุทรปราการ	C	127
NK052	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	A	128
NK055	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	C	129
NK060	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	C	130
NK071	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	D	131
NK102	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	B	132
NK106	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	A	133
NK107	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	C	134
NK108	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	D	135

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
NK111	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	D	136
NK114	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	B	137
NK129	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	B	138
NK130	กข25	2551	นครศรีธรรมราช	C	139
AR5	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	D	140
AR7	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	141
AR9	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	142
AR9-1	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	143
AR9-2	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	144
AR19	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	B	145
AR003	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	146
AR004	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	147
AR201	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	148
AR202	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	D	149
AR203	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	150
AR204	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	151
AR205	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	152
AR206	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	B	153
AR208	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	154
AR209	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	C	155
AR210	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	B	156
AR215	ปทุมธานี60	2551	อ่างทอง	A	157
AR218	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	A	158
AR219	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	B	159
AR220	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	A	160
AR221	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	C	161
AR223	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	A	162
AR224	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	C	163

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
AR226	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	C	164
AR227-1	พิษณุโลก90	2551	อ่างทอง	C	165
AR229	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	C	166
AR230	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	D	167
AR517	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	A	168
AR522	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	B	169
AR601	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	D	170
AR627	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	B	171
AR631	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	C	172
AR708	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	A	173
AR719	หอมปทุม60	2551	อ่างทอง	C	174
PT205	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	175
PT206	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	A	176
PT211	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	177
PT212	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	178
PT218	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	C	179
PT219	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	180
PT226	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	D	181
PT227	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	C	182
PT229	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	A	183
PT237	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	184
PT264	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	C	185
PT341	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	A	186
PT380	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	B	187
PT425	พิษณุโลก60	2551	ปทุมธานี	A	188
S221	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	D	189
S225	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	A	190

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
S250	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	A	191
S251	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	D	192
S258	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	A	193
S298	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	A	194
S299	พิษณุโลก60	2552	สุพรรณบุรี	D	195
CH605	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	A	196
CH006	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	A	197
CH007	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	C	198
CH008	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	B	199
CH010	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	A	200
CH011	ชัยนาท1	2552	ชัยนาท	A	201
CH012	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	D	202
CH017	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	C	203
CH018	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	C	204
CH019	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	A	205
CH020	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	D	206
CH022	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	B	207
CH023	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	B	208
CH024	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	A	209
CH125	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	C	210
CH239	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	A	211
CH303	ชัยนาท60	2552	ชัยนาท	C	212
CH304	หอมปทุม60	2552	ปทุมธานี	C	213
CH308	หอมปทุม60	2552	ปทุมธานี	D	214
CH313	หอมปทุม60	2552	ปทุมธานี	B	215
CH314	หอมปทุม60	2552	ปทุมธานี	A	216
CH319	คลองหลวง	2552	ปทุมธานี	B	217

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	พันธุ์ข้าว	ปีที่เก็บ	สถานที่	ลักษณะอาการ ที่เก็บ ^{1/}	หมายเลข จัดเก็บ
CH320	คลองหลวง	2552	ปทุมธานี	C	218
CH321	คลองหลวง	2552	ปทุมธานี	A	219
CH323	คลองหลวง	2552	ปทุมธานี	B	220
CH331	คลองหลวง	2552	ปทุมธานี	C	221
CH332	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	D	222
CH334	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	D	223
CH337	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	A	224
CH338	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	D	225
CH340	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	A	226
CH401	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	B	227
CH402	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	C	228
CH18	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	A	229
CH9/1	หอมปทุม60	2552	สระบุรี	B	230
TB0037	-	2552	กรมวิชาการเกษตร ^{2/}	D	231
TS8208	-	2553	กรมวิชาการเกษตร ^{2/}	-	232
Aaa9	-	2552	โรคพืช มก. ^{3/}	-	233

^{1/}เกณฑ์การจัดแบ่งระดับความรุนแรงโรคขอบใบแห้ง (IRRI, 1980)

A = ก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ = กลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ

B = ก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ = กลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ

C = ก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ = กลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง

D = ก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 26-50 % ของพื้นที่ใบขึ้นไป = กลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง

^{2/} เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ TB0037 และเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ TS8208

สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) และสายพันธุ์ใกล้เคียงในการศึกษา ^{3/} เชื้อ *Acidovorax*

avenae subsp. *avenae* สายพันธุ์ Aaa9 สาเหตุโรคใบขีดแบคทีเรียข้าวโพด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช มก. เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกลุ่ม

1.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง

การแยกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจากตัวอย่างใบที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกข้าวต่าง ๆ พบว่าสามารถแยกเชื้อที่แยกได้จากใบข้าวเป็นโรค และ bacterial ooze (ภาพที่ 2ก และ 2ข) จำนวนรวม 336 สายพันธุ์ โดยมีลักษณะโคโลนีสีเหลืองซีด กลม นูน เป็นมันวาว เยิ้ม บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) เป็นหลักซึ่งมีแนวโน้มเป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อทั้งหมดให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี cross streak บนอาหาร NGA และเลี้ยงเชื้อในหลอดอาหาร ชนิดเอียงและ reisolated เชื้อแบคทีเรียทุก 7 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป และเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียในอาหาร glycerol 50 เปอร์เซ็นต์ ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อโรคระยะยาวต่อไป

1.3 การศึกษาคุณสมบัติขั้นต้นบางประการเพื่อจำแนกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าว

1.3.1 การตรวจสอบลักษณะโคโลนีและการทดสอบแกรม โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจำนวน 336 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA คัดเลือกเฉพาะ โคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะสีเหลืองซีด กลม นูน ขอบเรียบ เป็นมันวาว (ภาพที่ 2ค) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 230 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 336 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ติดสีแดงของ safranin-o และยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทดสอบด้วย 3% KOH พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 230 สายพันธุ์ มีลักษณะเหนียว หนืด ยืดติดลูป (loop) ขึ้นมาเห็นได้ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 230 สายพันธุ์ นี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ตามวิธีการของ Schaad (1988)

1.3.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันบนใบยาสูบ (HR) ของเชื้อที่คาดว่าจะเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง จำนวน 230 สายพันธุ์ และเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง 1 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 231 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR บนใบยาสูบ โดยมีลักษณะอาการตายของเซลล์บนใบยาสูบซึ่งสามารถสังเกตเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลไหม้ชัดเจนรอบบริเวณที่ฉีด suspension เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2ง) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 231 สายพันธุ์ เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

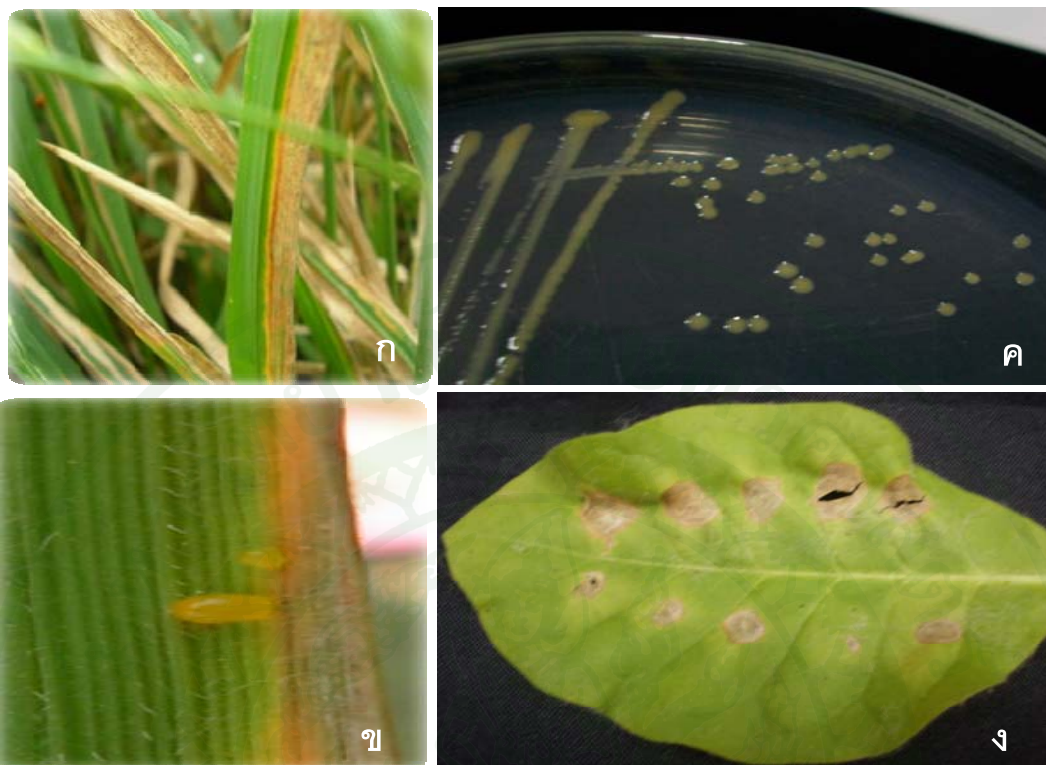
1.3.3 การทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรครากับต้นข้าวในสภาพเรือนทดลอง ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ เมื่อข้าวอายุ 45 วันหลังปลูก ด้วยวิธีการตัดปลายใบ (clipping method) ตามวิธีการของ Shanti *et al.* (2001) พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ (231 ไอโซเลท) ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งบนข้าวได้แตกต่างกันภายในระยะเวลา 3-14 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อวัดขนาดความยาวของบาดแผลที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ละสายพันธุ์ สามารถจัดแบ่งระดับความรุนแรงของโรคตามเกณฑ์ที่ดัดแปลงจาก SES ของ IRRI (1980) ได้ 4 ระดับคือ ระดับ A ถึง D โดยที่ระดับ A ประกอบด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 53 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ระดับ B หมายถึง กลุ่มของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ ซึ่งมีสมาชิกจำนวน 28 สายพันธุ์ ระดับ C ประกอบด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 120 สายพันธุ์ สามารถก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรงและจัดเป็นประชากรเชื้อโรคที่มีสมาชิกมากที่สุดสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ และระดับอาการ D หมายถึง กลุ่มของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมดขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง มีสมาชิกจำนวน 30 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 3) ทั้งนี้พบว่า ระดับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อต่างๆ มีการกระจายตัวแบบทั่วไปไม่จำเพาะเจาะจงหรือสัมพันธ์กับพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 7 ระดับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

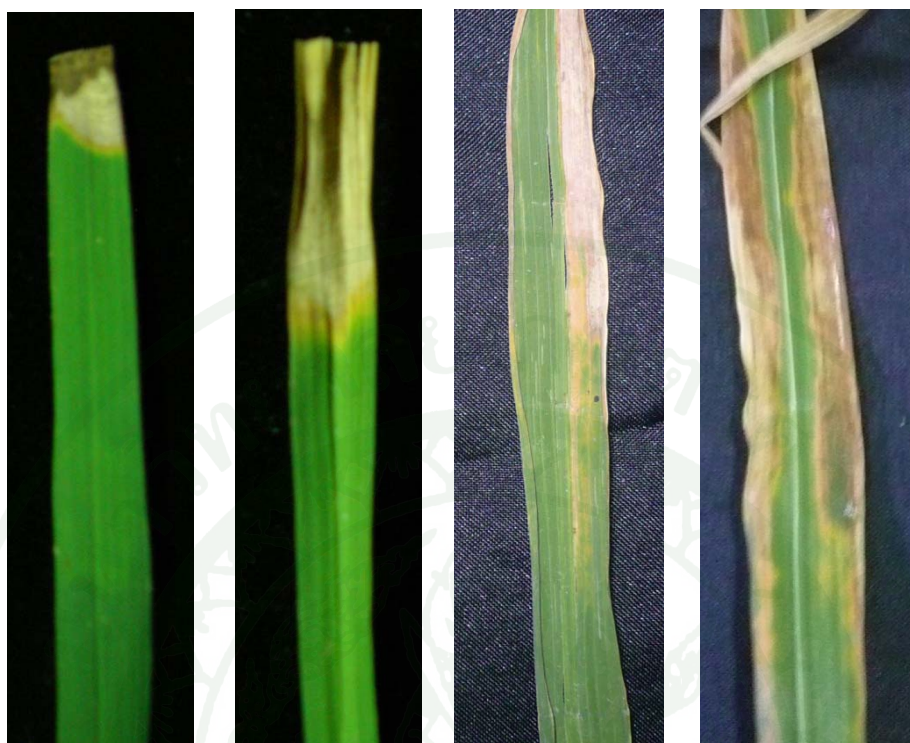
ระดับความรุนแรงโรค ^{1/}	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย ^{2/}
A	X0012/X0012.1/X0013x/X0014/X00S001/S201/S202/S217/S232/S238/S268/S274/S351/S416/S417/ISO1/J38/J39/J41/J42.1/J45/J57/J58/J60/J60.1/J68.1/J69/J70.1/J71/J74/J82/J82.1/J83/NI0030/NI0031/NI0035/NI0038/NI0040/NI0041/NI0043/NI0045/NI0046/NI0047/NI0073/C2/C4.1/C4.11/C6/Su12/Su17/Su9/Su10.1/Su13.1/
B	NK055/NK071/NK106/NK108/NK129/NK130/AR7/AR003/AR209/AR224/AR517/AR631/AR708/PT206/PT218/PT226/PT229/S251/CH006/CH011/CH017/CH022/CH331/CH18/X001/X0015x/X0016/X0017
C	X0019/X00S/X00S31/KT11/ISO2/S208/S218/S233/S235/S241/S243/S272/S345/S346/S352/KT24/KT1.1/KT110/KT1/ISO3/ISO5/J4.2/J4.3/J32/J46/J62/J63/J65/J66/J68/J70/J72/J73/J80/J81/NI0026/NI0027/NI0028/NI0029/NI0037/NI0039/NI0042/NI0044/NI0048/NI0051/NI0053/NI0058/NI0070/NI0071/NI0072/NI0074/C4.2/C7/C11/Su8/Su40/NK044/NK050/NK060/NK107/NK111/NK114/AR5/AR9/AR9.2/AR19/AR004/AR203/AR205/AR206/AR215/AR219/AR221/AR223/AR226/AR227.1/AR229/AR230/AR522/AR601/AR627/AR719/PT205/PT211/PT212/PT227/PT237/PT341/PT380/PT425/S221/S225/S258/S298/S299/CH605/CH007/CH010/CH018/CH019/CH020/CH023/CH024/CH239/CH303/CH308/CH313/CH314/CH319/CH321/CH323/CH332/CH334/CH335/CH338/CH401/CH402/CH9.1/TB0037
D	ISO4/ISO6/J4.4/J26/J37/J67/NI0052/NI0062/NI0063/C5/Su6/NK052/NK102/AR9.1/AR201/AR202/AR204/AR208/AR210/AR218/AR220/PT219/PT264/S250/CH008/CH012/CH125/CH304/CH320/CH340/

^{1/} เกณฑ์การจัดแบ่งระดับความรุนแรงโรคขอบใบแห้ง (IRRI, 1980) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 6

^{2/} รหัสสายพันธุ์เชื้อตามตารางที่ 6



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการ โรคขอบใบแห้งบนใบข้าว (ก) และ bacterial ooze ของเชื้อโรคขอบใบแห้ง (ข) ลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบเป็นมัน เยิ้ม ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA (ค) ปฏิกริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันต่อเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* บนใบยาสูบภายใน 24-48 ชั่วโมง (ง)



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* โดยแบ่งตามระดับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรบนข้าวพันธุ์ขาวหอมมะลิ 105 ตามเกณฑ์ของ IRRI (1980) โดย A = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ (ก) B = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ (ข) C = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง (ค) และ D = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมดขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (ง)

1.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 231 สายพันธุ์ สามารถเคลื่อนที่ได้ (motility) ต้องการใช้ออกซิเจน เกิดปฏิกิริยา citrate utilization โดยการเปลี่ยนอาหารทดสอบสีเขียวเป็นสีน้ำเงินชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยา catalase ไม่สามารถย่อยแป้งในอาหารได้ และไม่สามารถย่อยมันฝรั่งได้ สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose, fructose และ galactose ขณะเดียวกันไม่พบการผลิตกรดในน้ำตาล ribose, maltose, และ lactose ซึ่งมีคุณสมบัติตรงกับเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ้างอิงในหนังสือ Bergey manual of Determinative Bacteriology 9th edition (Holt *et al.*, 1994) จึงยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 231 สายพันธุ์ เป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

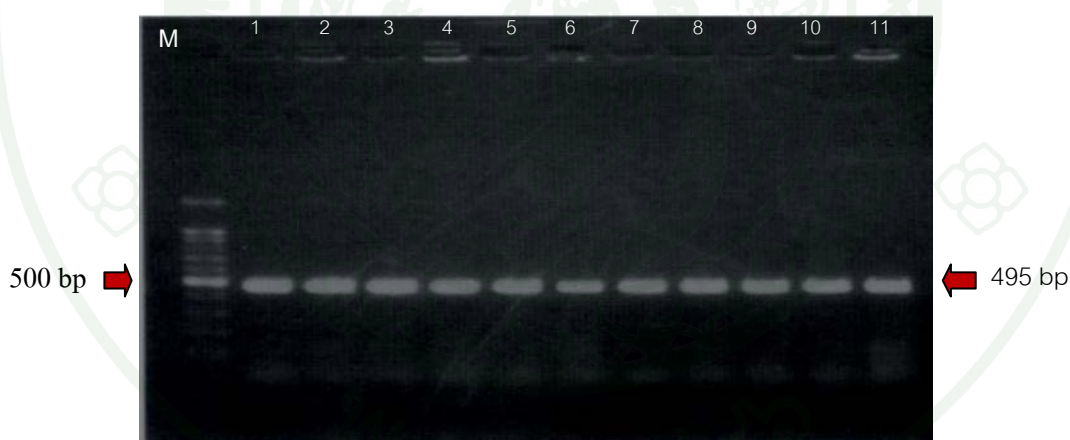
การทดสอบ	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> สายพันธุ์ ที่ศึกษา ^{1/}	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> TB0037 ^{2/}
Motility	+	+
Oxygen relationship	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Catalase production	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Oxidase test	-	-
Growth on potato	-	-
Acid form		
Glucose, Fructose, Galactose	+	+
Ribose, Maltose, Lactose	-	-
Citrate utilization	+	+

^{1/} = สายพันธุ์เชื้อทดสอบ 230 ไอโซเลท

^{2/} = สายพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กรมวิชาการเกษตร

1.5 การยืนยันจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 230 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้และผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการและความสามารถในการก่อให้โรคในสภาพเรือนทดลอง ด้วยวิธี miniprep preparation ตามวิธีการของ Chen and Kuo (1993) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA โดยวิธี PCR เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ (types strain) *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ TB0037 พบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 495 bp ในเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ (230 สายพันธุ์) โดยเป็นตัวแทนของแต่ละที่ทดสอบความรุนแรงของโรคกลุ่มที่ A-D ไอโซเลท Xoo13-x, ISO1, NI0030, Xoo1, Xoo17, CH017, Xoo19, KT24, AR9, และ AR208 ตามลำดับ รวมทั้งสายพันธุ์ TB0037 (ภาพที่ 4) จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 230 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากใบข้าวที่แสดงอาการโรค จัดเป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวอย่างชัดเจน



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp จากการตรวจสอบชนิดเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยไพรเมอร์ XOR-F และ XOR-R ซึ่งออกแบบมาจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA โดยจะพบในเชื้อเป้าหมายทุกสายพันธุ์ โดยตำแหน่งที่ 1-11 คือ เชื้อสายพันธุ์ TB0037, และตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม A-D ตามลำดับ Xoo13-x, ISO1, NI0030, Xoo1, Xoo17, CH017, Xoo19, KT24, AR9, และ AR208 ตามลำดับ โดยใช้ 100 bp DNA marker (ตำแหน่ง M)

2. การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้เทคนิค rep-PCR

การวิเคราะห์ dendrogram จากไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 230 สายพันธุ์ และเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ได้แก่ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ TB0037 สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และเชื้อสายพันธุ์ใกล้ชิดคือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ TS8208 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร และเชื้อต่างกลุ่มคือ *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ Aaa9 (นันทิยา, 2550) ด้วยวิธี minipreparation (Chen and Kuo, 1993) แล้วนำมาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep-PCR ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการตรวจดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 100 bp ถึง 3000 bp ทั้งหมด 20 22 และ 14 แถบ จากไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP ตามลำดับ ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและ/หรือชัดเจน จากการตรวจสอบว่ามีหรือไม่มีจากแต่ละไพรเมอร์ (BOX ERIC และ REP ตามลำดับ) ที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ dendrogram สร้างความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และแหล่งที่มา ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป TREECON version 2010 ได้แก่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 16 19 และ 8 แถบ ซึ่งคิดเป็น 81.8 86.36 และ 51.14 เปอร์เซ็นต์ ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดจากแต่ละไพรเมอร์ ตามลำดับ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะและปรากฏในการศึกษาจากกลุ่มประชากรในครั้งนี้ นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ต่างๆ ได้ดังนี้

2.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ของ Dendrogram จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ BOX

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BOX สามารถสร้าง dendrogram จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 231 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจนที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.54 (ภาพที่ 5) ได้แก่ กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 โดยประชากรเชื้อกลุ่ม 1 มีจำนวน 61 สายพันธุ์ คิดเป็น 26.41 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด (231 สายพันธุ์) ประกอบด้วยเชื้อที่มาจากจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช ปทุมธานี นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา ชัยนาท และกลุ่ม 2 ประกอบด้วยประชากรเชื้อ 170 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 73.59 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด (231 สายพันธุ์) นอกจากนี้ประชากรเชื้อในกลุ่ม 2 ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 5 กลุ่ม ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.58 ได้แก่ กลุ่ม 2A 2B 2C 2D และ 2E (ตารางที่ 9 : ภาพที่ 5) แต่ละกลุ่มย่อยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเพียง 52-64 เปอร์เซ็นต์

โดยที่เชื้อในกลุ่ม 2A และ 2B มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน 63 เปอร์เซ็นต์ และใกล้ชิดกับกลุ่ม 2C 54 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่ม 2D และ 2E มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน 53 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม 2C 52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลุ่ม 2C จัดเป็นกลุ่มที่มีประชากรเชื้อมากที่สุด 82 สายพันธุ์ คิดเป็น 48.27 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อทั้งหมดในกลุ่ม 2 (170 สายพันธุ์) ประกอบด้วยเชื้อที่มาจากทุกจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างได้แก่ จังหวัดอ่างทอง ปทุมธานี นนทบุรี สุพรรณบุรี ชัยนาท นครศรีธรรมราช สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา และสระบุรี แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในกลุ่ม 2 นี้ค่อนข้างมีความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ BOX

2.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ของ Dendrogram จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ ERIC

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ผลิตได้จากไพรเมอร์ ERIC มีรูปแบบมากกว่าไพรเมอร์ BOX เมื่อนำมาสร้างเป็น dendrogram พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ชัดเจน 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 6) ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.64 เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ BOX เมื่อเปรียบเทียบกับค่า similarity coefficient เดียวกัน โดยแบ่งกลุ่มย่อยได้มากกว่า แสดงในตารางที่ 7 จาก dendrogram ประชากรเชื้อในกลุ่ม 1 มีจำนวน 70 สายพันธุ์ คิดเป็น 30.30 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมด (231 สายพันธุ์) ประชากรเชื้อกลุ่มนี้มาจากจังหวัดอ่างทอง ปทุมธานี ชัยนาท สุพรรณบุรี นครศรีธรรมราช สมุทรปราการ นนทบุรี และพระนครศรีอยุธยา เชื้อกลุ่ม 2 มีจำนวน 161 สายพันธุ์ คิดเป็น 69.70 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อทั้งหมด (231 สายพันธุ์) นอกจากนี้ประชากรเชื้อในกลุ่ม 2 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.63 ได้ 6 กลุ่มย่อย (2A 2B 2C 2D 2E และ 2F) (ตารางที่ 10 : ภาพที่ 6) เชื้อในกลุ่ม 2 ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม 2A และ 2F โดย 2A มีจำนวน 28 สายพันธุ์ มาจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ชัยนาท ปทุมธานี นนทบุรี สมุทรปราการ อ่างทอง และสุพรรณบุรี กลุ่ม 2F มีจำนวน 46 สายพันธุ์ มาจากจังหวัดอ่างทอง ชัยนาท สุพรรณบุรี ปทุมธานี นครศรีธรรมราช สมุทรปราการ และนนทบุรี ประชากรเชื้อในกลุ่มย่อยทั้ง 6 กลุ่มย่อย มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน 63-68 เปอร์เซ็นต์

2.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ของ Dendrogram จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ REP

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากไพรเมอร์ REP เมื่อนำมาสร้าง dendrogram พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.63 สามารถแบ่งเชื้อได้ 2 กลุ่ม (ตารางที่ 11 : ภาพที่ 7) เชื้อกลุ่ม 1 มี 30 สายพันธุ์ คิดเป็น 12.98 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมด (231 สายพันธุ์) มาจากจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี ชัยนาท อ่างทอง สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา และจากกรมวิชาการ 1 สายพันธุ์ กลุ่ม 2 เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่มีจำนวน 201 สายพันธุ์ คิดเป็น 87.02 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมด (231 สายพันธุ์) แบ่งได้เป็นกลุ่มย่อย 7 กลุ่ม คือ 2A 2B 2C 2D 2E 2F และ 2G โดยเชื้อในกลุ่ม 2 ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม กลุ่ม 2D และ 2G กลุ่ม 2D มีจำนวน 61 สายพันธุ์ คิดเป็น 30.35 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมดในกลุ่มนี้ (201 สายพันธุ์) มาจากจังหวัดปทุมธานี อ่างทอง สุพรรณบุรี ชัยนาท สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา นนทบุรี และจังหวัดนครราชสีมา กลุ่ม 2G มีจำนวน 43 สายพันธุ์ คิดเป็น 22.39 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งหมดในกลุ่มนี้ (201 สายพันธุ์) มาจากจังหวัดปทุมธานี นครราชสีมา อ่างทอง ชัยนาท สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา นนทบุรี และสมุทรปราการ จาก dendrogram ที่วิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยไพรเมอร์ REP ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย และมีความใกล้ชิดของเชื้อในกลุ่มค่อนข้างสูง เช่น เชื้อกลุ่ม 2A มีความใกล้ชิดกับกลุ่ม 2B ที่ค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.66

ทั้งนี้พบว่าการใช้ไพรเมอร์ REP จากการทดลองในครั้งนี้แยกกลุ่มเชื้อเป้าหมายได้ไม่ชัดเจน และมีลักษณะ phenotype ที่ปะปนกันมากกว่าอีก 2 ชนิด และพบเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ TS8208 อยู่ในกลุ่ม 2A ด้วย ในขณะที่ไพรเมอร์ BOX และ ERIC สามารถแยกเชื้อชนิดอื่นๆ คือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* และ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ Aaa 9 ออกจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 231 สายพันธุ์ได้ชัดเจน

3. ความสัมพันธ์ระหว่าง rep-PCR กับการก่อให้เกิดโรค

ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ BOX และ ERIC สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ่อนแอออกจากสายพันธุ์รุนแรงได้อย่างชัดเจน โดยไพรเมอร์เหล่านี้ สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 780 bp จากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ่อนแอเท่านั้น ในขณะที่อีก 1 แถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp จะพบเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์รุนแรงเท่านั้น โดยไม่พบในกลุ่มสายพันธุ์อ่อนแอ (ภาพที่ 8 และ 9)

ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 231 สายพันธุ์ เมื่อทำการทดสอบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความรุนแรงเชื้อได้ออกเป็น 4 กลุ่ม (IRRI, 1980) คือ กลุ่ม A = สายพันธุ์เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ จำนวน 53 สายพันธุ์ กลุ่ม B = สายพันธุ์เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ จำนวน 28 สายพันธุ์ กลุ่ม C = สายพันธุ์เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์ค่อนข้างรุนแรง จำนวน 120 สายพันธุ์ และกลุ่ม D = สายพันธุ์เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบทั้งหมด ขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มเชื้อสายพันธุ์รุนแรง จำนวน 30 สายพันธุ์ (ภาพที่ 3 : ตารางที่ 7 และ 8) ผลความรุนแรงของโรคที่ได้จาก phenotype เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ให้ผลดังนี้

3.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX กับการก่อให้เกิดโรค

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX กับการก่อให้เกิดโรค พบว่า ไพรเมอร์ BOX มีลักษณะเด่นที่จำเพาะต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ที่ก่อโรคที่ทำการศึกษาทดลอง คือ สามารถพบแถบดีเอ็นเอพื้นฐานขนาด 495 bp ในเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งหมด 231 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอขนาด 200 750 800 และ 1,100 bp เฉพาะในทุกสายพันธุ์เชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในกลุ่มเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 400 600 780 และ 1000 bp เฉพาะในเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอเท่านั้น ซึ่งไม่พบในเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (ภาพที่ 8)

เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณ พบว่าสามารถผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รวม 20 แถบ เมื่อจัดกลุ่มสร้าง dendrogram ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน จำนวน 16 แถบ สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 มี 61 สายพันธุ์ พบว่า 30 สายพันธุ์ มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคอยู่ใน phenotype กลุ่ม A (เกิดโรค 1-5% ของพื้นที่ใบ จัดเป็นกลุ่มอ่อนแอ) คิดเป็น 49.18 เปอร์เซ็นต์ (จากเชื้อ 61 สายพันธุ์) เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* 11 สายพันธุ์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม B (เกิดโรค 6-12 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ จัดเป็นกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ) คิดเป็น 18.03 เปอร์เซ็นต์ (จากเชื้อ 61 สายพันธุ์) เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* 13 สายพันธุ์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม C (เกิดโรค 13-25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ จัดเป็นกลุ่มค่อนข้างรุนแรง) คิดเป็น

21.31 เปอร์เซ็นต์ (จากเชื้อ 61 สายพันธุ์) และอีก 7 สายพันธุ์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม D (เกิดโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบขึ้นไป จัดเป็นกลุ่มรุนแรง) คิดเป็น 11.47 เปอร์เซ็นต์ (จากเชื้อ 61 สายพันธุ์) แสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์อ่อนแอและค่อนข้างอ่อนแอ (67.21 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม 2 มี 170 สายพันธุ์ คิดเป็น 73.59 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด 231 สายพันธุ์ พบว่า 107 สายพันธุ์ (เกิดโรค 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มค่อนข้างรุนแรง) คิดเป็น 62.94 เปอร์เซ็นต์ และมี 23 สายพันธุ์ คิดเป็น 76.67 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรในกลุ่ม D มีลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในกลุ่ม 2C 11 สายพันธุ์ กลุ่ม 2A 8 สายพันธุ์ กลุ่ม 2B 2 สายพันธุ์ และกระจายอยู่ในกลุ่ม 2D และ 2E อย่างละ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ ที่เหลืออีก 40 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอและอ่อนแอ (ตารางที่ 9 : ภาพที่ 5) ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้งสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 และกลุ่ม 2C มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (DNA polymorphism band) 9 แถบ (ภาพที่ 8)

3.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC กับการก่อให้เกิดโรค

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ ERIC มีจำนวนรวมทั้งหมด 22 แถบ เมื่อจัดกลุ่มสร้าง dendrogram ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้ง 231 สายพันธุ์ ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน 19 แถบ สามารถแบ่งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แตกต่างอย่างชัดเจน 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับไพรเมอร์ BOX โดยกลุ่ม 1 เป็นสายพันธุ์เชื้ออ่อนแอ และกลุ่ม 2 เป็นสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งกลุ่ม 1 พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 43 สายพันธุ์ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ ขนาด 580 680 780 900 1200 และ 1300 bp เฉพาะในกลุ่มสายพันธุ์อ่อนแอ และพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ ขนาด 300 650 800 และ 950 bp อยู่ในกลุ่มรุนแรงเท่านั้น

กลุ่ม 1 มีจำนวน 70 สายพันธุ์ พบว่า 43 สายพันธุ์ คิดเป็น 61.43 เปอร์เซ็นต์ มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคอยู่ใน phenotype กลุ่ม A (เกิดโรค 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มอ่อนแอ) 24 สายพันธุ์ คิดเป็น 34.29 เปอร์เซ็นต์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม B (เกิดโรค 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ) 2 สายพันธุ์ คิดเป็น 2.68 เปอร์เซ็นต์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม C (เกิดโรค 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มค่อนข้างรุนแรง) และ 1 สายพันธุ์ คิดเป็น 1.42 เปอร์เซ็นต์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม D (เกิดโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบขึ้นไปจัดเป็นกลุ่มรุนแรง) ซึ่งเมื่อพิจารณาเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ (กลุ่ม A) ซึ่งมีประชากรเชื้อโรคทั้งหมด 53 สายพันธุ์ พบว่า 43 สายพันธุ์ คิดเป็น 81.13

เปอร์เซ็นต์ มีลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในกลุ่ม 1 สำหรับเชื้อในกลุ่มที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรค อยู่ในกลุ่ม D (เกิดโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ ขึ้นไปจัดเป็นกลุ่มรุนแรง) จำนวน 30 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่มที่ 2 โดยพบว่า 29 สายพันธุ์ คิดเป็น 96.67 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 1 สายพันธุ์ ปะปนอยู่ในกลุ่ม 1 โดย 21 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่ม 2F 4 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่ม 2A 2 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่ม 2D และอยู่ในกลุ่ม 2B และ 2E กลุ่มละ 1 สายพันธุ์ ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม แสดงในภาพที่ 8 โดย lane ที่ 1-8 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่ม 2 (ที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรง) lane ที่ 9-16 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่ม 1 (ที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคน้อย) มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (DNA polymorphism band) 10 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้ถึงความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เหมือนกับที่พบในไพรเมอร์ BOX (ภาพที่ 9)

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP กับการก่อให้เกิดโรค

ไพรเมอร์ REP ผลิตลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้รวม 14 แถบ เมื่อจัดกลุ่มสร้าง dendrogram ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน 8 แถบ สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีจำนวนประชากรเชื้อเพียง 30 สายพันธุ์ คิดเป็น 12.98 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อทั้งหมด เมื่อนำเชื้อกลุ่ม 1 มาเปรียบเทียบกับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคพบว่า 7 สายพันธุ์ คิดเป็น 23.33 เปอร์เซ็นต์ มีระดับความรุนแรงโรคอยู่ใน phenotype กลุ่ม A (เกิดโรค 1-5 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มอ่อนแอ) 3 สายพันธุ์ คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม B (เกิดโรค 6-12 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ) 17 สายพันธุ์ คิดเป็น 56.67 เปอร์เซ็นต์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม C (เกิดโรค 12-25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบจัดเป็นกลุ่มค่อนข้างรุนแรง) และอีก 3 สายพันธุ์ อยู่ใน phenotype กลุ่ม D (เกิดโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบขึ้นไปจัดเป็นกลุ่มรุนแรง) คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อกลุ่ม 2 พบว่ามีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกระจายอยู่ในทุกกลุ่ม โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ REP มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงในการเกิดโรคต่ำ

4. ความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับ แหล่งที่มาของเชื้อ (พื้นที่และพันธุ์ข้าว)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 231 สายพันธุ์ พบว่า ความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด (ไพรเมอร์ ERIC, BOX และ REP) สามารถแบ่งประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งหมด ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และเมื่อนำมา

เปรียบเทียบกับแหล่งที่มาของเชื้อ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของสายพันธุ์เชื้อและความสามารถในการก่อให้เกิดโรคหรือลักษณะพันธุกรรมของเชื้อ โดยเชื้อในแต่ละกลุ่มย่อยที่ได้จากการจัดแบ่งด้วยแต่ละไพรเมอร์ยังคงมีการกระจายตัวอยู่ในแต่ละกลุ่มย่อยของทุกไพรเมอร์ที่ทำการศึกษา

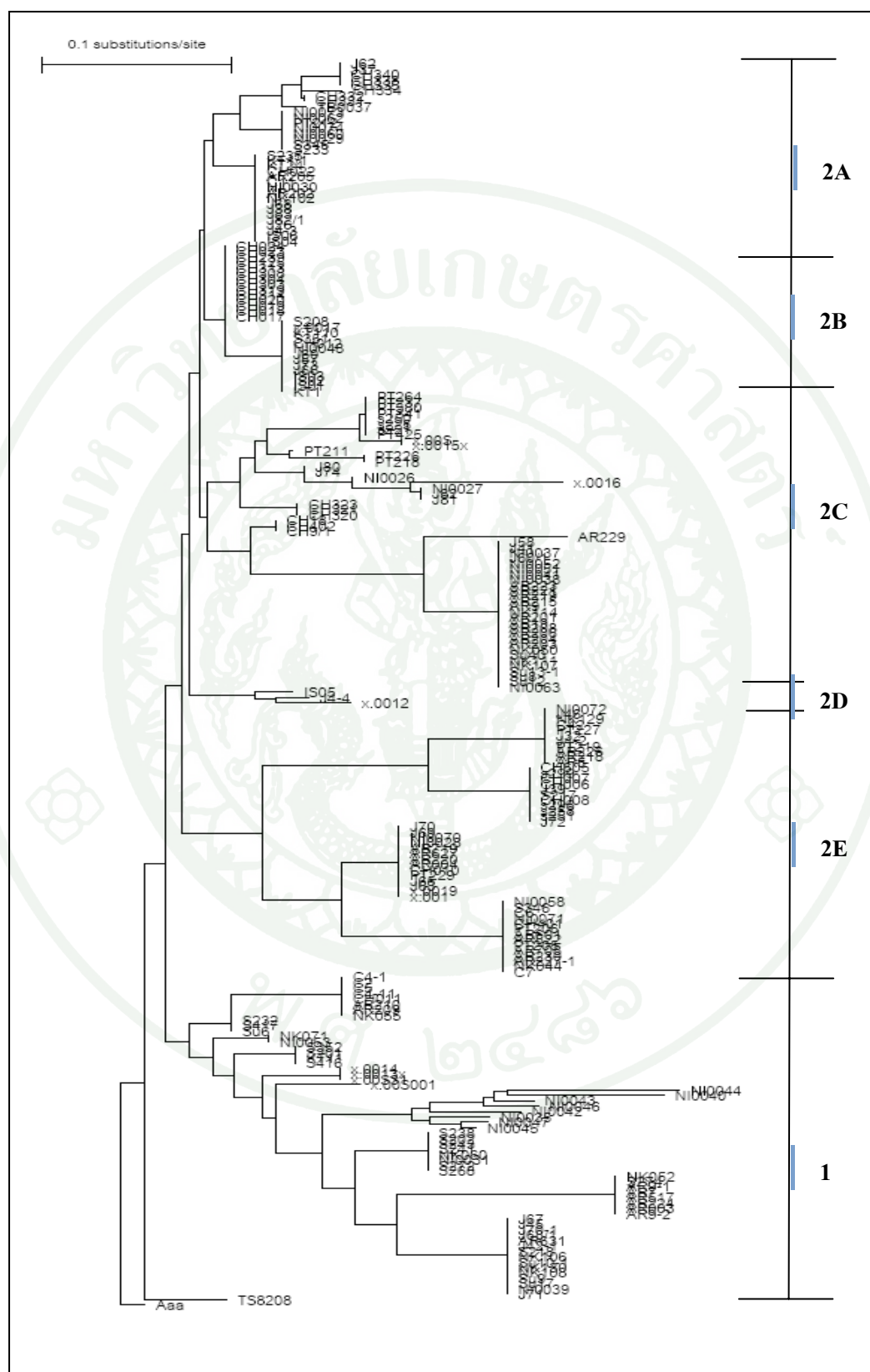
ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BOX โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010

กลุ่ม ^{1/}	สายพันธุ์แบคทีเรีย ^{2/}
1	J67/J45/J70.1/J68.1/AR631/J42.1/S218/NK106/Su10.1/NK130/NK108/Su9/Su17/NI0039/J71/Xoo14/Xoo13x/NK052/S274/AR9.1/AR7/AR517/AR224/AR003/AR9.2/S238/S202/S243/S241/NK060/NI0031/S272/S268/NI0045/NI0047/NI0035/NI0042/NI0046/NI0043/NI0040/NI0044/XooS001/XooS31/S352/S201/KT11/S416/NK071/NI0053/Su6/S417/S232/C4.1/C2/C5/C4.11/CH011/AR210/AR209/NK055/
2A	S233/S345/NI0029/NI0060/NI0074/PT212/NI0062/NI0073/TB0037/CH331/CH332/CH334/CH335/CH338/CH340/J37/J62/CH022/S235/KT24/KT1.1/ISO4/C11/NK102/AR202/AR205/J68/J82.1/J83/NI0030/J26/J38/ISO6/J4.3/
2B	S208/Xoo17/KT110/S351/CH012/NI0048/J60/J57/J73/J66/ISO3/ISO2/ISO1/KT1/CH017/CH018/CH019/CH020/CH314/CH319/CH303/CH304/CH308/CH313/CH215/CH239/CH023/CH024/
2C	S221/PT425/S250/S225/PT380/PT341/PT264/PT237/XooS/Xoo15x/PT211/PT226/PT218/J74/J80/NI0026/J82/J81/NI0027/Xoo16/CH321/CH320/CH323/S251/J72/S298/S258/CH008/J39/S217/CH007/CH006/CH605/S299/AR218/AR5/PT219/AR226/J32/J4.2/PT227/NK129/C42/NI0072/J46/CH18/CH402/CH9.1/AR229/J58/J41/NI0037/J60.1/NI0052/NI0051/NI0041/NI00382/AR223/AR221/AR219/AR215/AR9/NK114/AR201/AR19/AR208/AR206/AR204/AR203/NK050/NI0063/Su12/Su40/NK111/NK107/Su13.1/Su8
2D	ISO5/J4.4/Xoo12
2E	NK044/C7/AR230/AR227.1/PT205/AR708/AR601/AR522/CH401/PT206/C6/NI0071/NI0058/S346/Xoo19/Xoo1/J65/J63/CH010/PT229/AR220/AR004/AR719/AR627/NI0070/NI0028/J70/J69

^{1/} 1 = เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ (61 สายพันธุ์) 2 = เชื้อสายพันธุ์รุนแรง (170 สายพันธุ์ ใน 2A, 2B, 2C, 2D และ 2E) ^{2/} รหัสสายพันธุ์เชื้อตามตารางที่ 5



ภาพที่ 5 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่สังเคราะห์ได้จากการขยายในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ BOX แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ 231 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010



ตารางที่ 10 การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม ERIC โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010

กลุ่ม ^{1/}	สายพันธุ์แบคทีเรีย ^{2/}
1	Xoo13x/Xoo12/S201/XooS001/J60.1/J58/J57/J42.1/NI0047/NI0045/C2/NI0073/NI0043/NI0038/NI0035/NI0030/PT218/J83/CH322/CH024/AR221/NK129/J82.1/NK111/Xoo19/Xoo12.1/S351/S268/C4.1/AR204/ISO6/KT11/NI0046/J38/J39/S238/S417/S416/CH18/NI0040/J68.1/J45/J74/J69/J41/Su12/J82/Su9/Su17/NK071/NK055/Su13.1/Su10.1/AR224/AR209/AR708/AR632/AR003/AR7/NK108/NK106/PT229/ISO1/CH006/S251/CH331/CH022/CH017/CH011/S274/
2A	NI0027/NI0028/J32/J70/AR206/NI0062/J4.2/J4.3/J4.4/J26/CH023/KT24/ISO3/NI0031/NI0070/C4.2/C11/CH010/CH019/CH007/CH308/NI0052/NI0053/NI0060/NI0048/NI0051/NI0029/NI0037/
2B	Xoo16/Xoo15x/CH334/PT264/PT341/AR601/AR627/Xoo17/XooS/
2C	AR9.2/AR9.1/CH402/AR205/J46/J66/AR9/J68/J65/J63/J62/KT110/S299/S298/KT1.1/S345/AR004/AR19/CH9.1/S243/S241/CH401/AR204/AR203/AR202/
2D	PT205/KT1/TB0037/CH338/CH335/CH332/CH303/PT237/PT227/ISO2/NI0044/NI0071/NI0058/C6/CH239/NI0074/NI0072/NK114/J81/NI0040/NI0039/J80/J73/J72/ISO4/CH340/
2E	CH605/PT425/CH0202/CH018/ISO5/S352/Su8/NI0041/S346/S272/S235/XooS31/J60/Xoo14/Xoo1/PT219/PT212/PT211/PT205/AR517/AR5/NK130/C7/NI0042/Su40/AR719/
2F	NK060/NK052/S258/NK050/NK044/S221/PT380/S250/S225/NK107/NK102/PT218/AR522/J67/CH319/J37/AR210/AR229/AR227.1/AR226/AR218/AR215/AR208/AR20/AR219/AR223/AR201/S208/S202/S218/S217/Su6/C5/C4.4/S232/J70.1/J71/NI0063/CH125/CH012/CH304/CH323CH314/CH320/CH008/CH313/

^{1/} 1 = เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ (70 สายพันธุ์) 2 = เชื้อสายพันธุ์รุนแรง (161 สายพันธุ์ ใน 2A, 2B, 2C, 2D, 2E และ 2F)

^{2/} รหัสสายพันธุ์เชื้อตามตารางที่ 5

ภาพที่ 6 Dendrogram จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่สังเคราะห์ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ ERIC แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ 231 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010

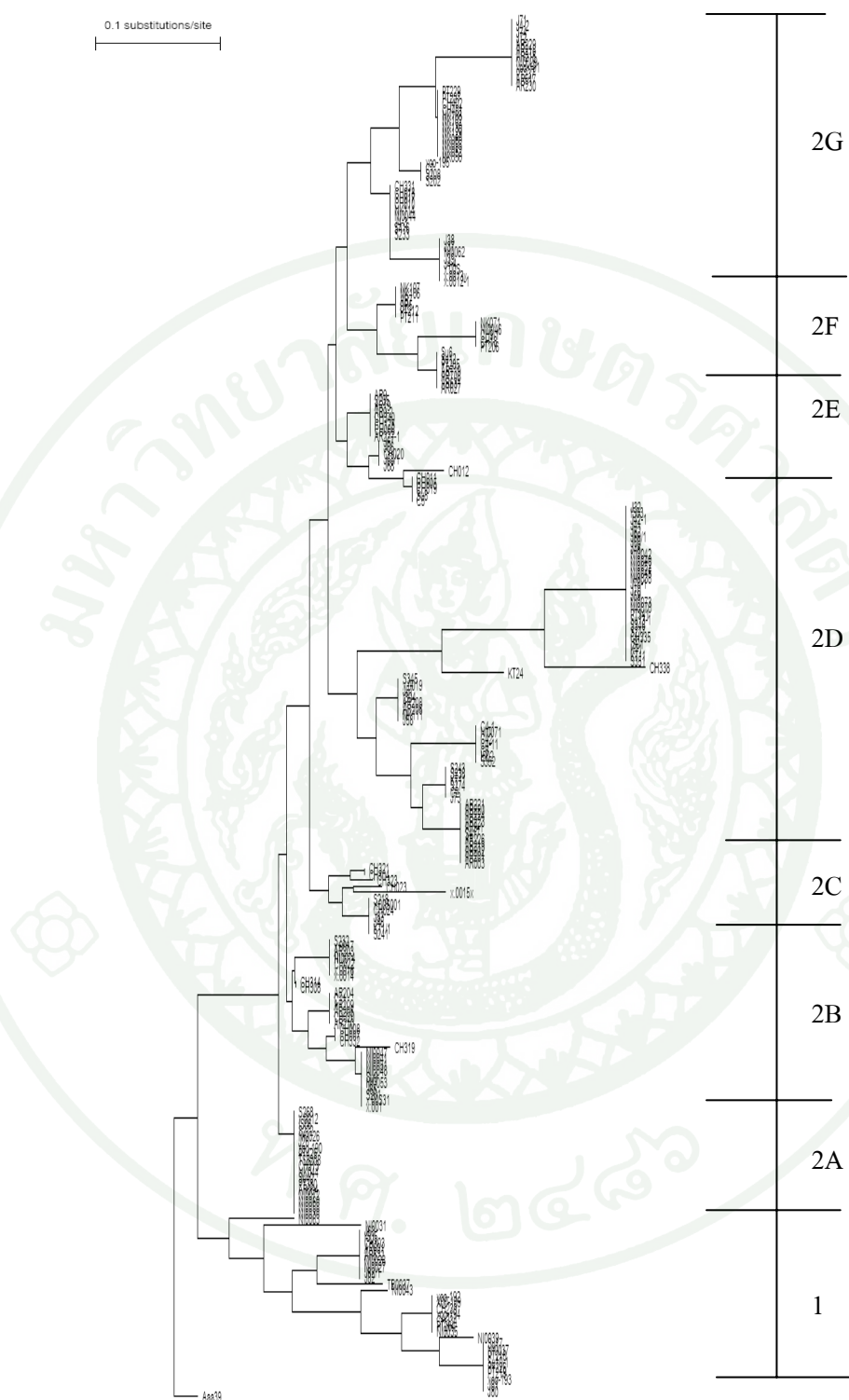
ตารางที่ 11 การจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม REP โดยใช้โปรแกรม TREECON version 2010

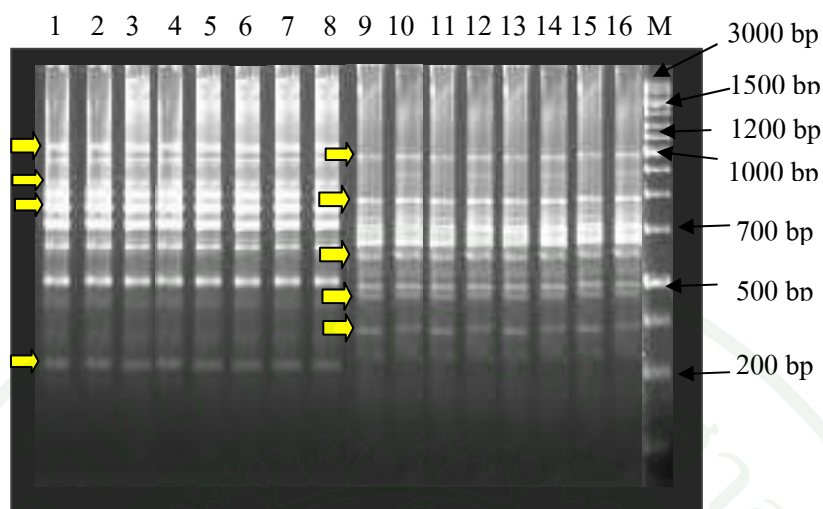
กลุ่ม ^{1/}	สายพันธุ์แบคทีเรีย ^{2/}
1	NI0063/NS0031/J63/I805/AR601/AR522/NI0025/NI0027/J82/1/J82/TB0037/NI0043/XOO192/X00189/CH239/XOO194/CH334/PT264/NI0035/NI0039/Su17/NI0037/PT218/Su10-1/PT226/PT219/XOO193/J81/J80
2A	S268/XOO12/IS06/S272/NI0026/J26/XOO190/PT425/TS8208/CH313/NI049/Su40/PT380/AR004/NI0072/NI0060/NI0058/NI0030
2B	S232/XOO0017/AR203/NI0074/CH022/XOO16/XOO14/CH314/AR204/C11/AR209/AR205/CH320/AR210/CH008/CH007/CH332/CG319/NI0047/NI0041/NI0051/NI0048/Su9/NI0053/J65/S201/XOO531/XOO1
2C	CH321/CH304/CH323/CH023/X0015/S218/XOOS001/CH024/J83/J45/S241
2D	J32/IS03/J42.1/J41/J62/J60.1/J60/J46/NI0042/NI0073/NI0070/PT341/Su13.1/S346/S217/CH335/IS01/KT1/KT11/S351/NI0071/C42/C4.11/C6/IS02/S352/S243/S238/KT1/1/S274/C2/J73/AR221/AR220/AR224/AR223/AR9.1/S417/AR226/AR202/AR201/AR003
2E	AR9/S235/AR19/AR9.2/CH340/CH125/CH006/AR227.1/J67/J66/CH020/J68/1/J68/CH012/CH011/CH605/CH019/Su8/C5
2F	NK107/NK106/AR7/AR5/PT212/PT211/NK071/NI0046/CH9/1/CH18/PT206/Su12/PT205/AR719/AR708/AR63
2G	AJ71/J4.2/J74/J72/AR229/AR218/AR215/NI0029/XOO191/PT237/AR517/AR230/PT229/PT22/CH402/CH401/NK108/NK102/NK130/NK129/NK060/NK055/NK052/NK050/XOO195/C7/S208/S202/CH331/CH018/CH017/CH010/NK114/NI0044/J4-3/S416/S233/J38/J37/NI0062/J39/J4-4/ J71

^{1/} 1 = เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ (30 สายพันธุ์) 2 = เชื้อสายพันธุ์รุนแรง (201 สายพันธุ์ ใน 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F และ 2G)

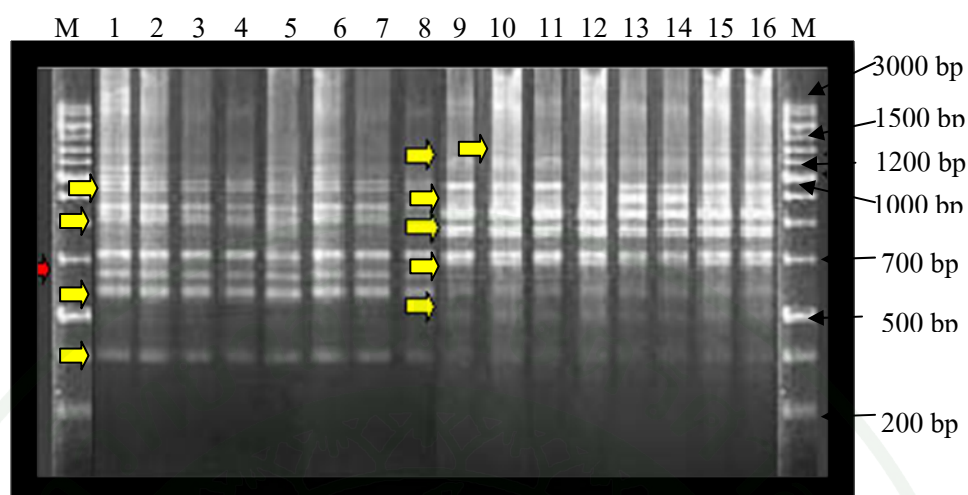
^{2/} รหัสสายพันธุ์เชื้อตามตารางที่ 5

ภาพที่ 7 Dendrogram จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่
สังเคราะห์ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองด้วยไพรเมอร์ REP แสดงความสัมพันธ์
ของเชื้อ 231 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเชื้อต่างกลุ่ม 2 สายพันธุ์ (นอกกลุ่ม 1 และ 2)
วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TREECON version 2010





ภาพที่ 8 ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์รุนแรงและอ่อนแอ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ BOX โดย lane ที่ 1-8 (เชื้อสายพันธุ์รุนแรงในกลุ่มย่อย 2C) ได้แก่ สายพันธุ์ S250, AR218, PT264, CH008, NI0052, NI0063, AR201, AR208 ตามลำดับ และ lane ที่ 9-16 (เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ในกลุ่มที่ 1) ได้แก่ สายพันธุ์ X00S001, NIOO46, NI0040, J71, Su9, S268, C2, Su10.1 ตามลำดับ ลูกศรสีเหลืองแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) ระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* กลุ่มสายพันธุ์รุนแรงและอ่อนแอ จากการตรวจสอบด้วย ไพรเมอร์ ERIC โดย lane ที่ 1-8 (เชื้อสายพันธุ์รุนแรงกลุ่มย่อย 2F) ได้แก่ สายพันธุ์ NK052, Su6, C5, S250, NK102, AR218, CH125, CH304 และ lane ที่ 9-16 (เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ในกลุ่ม 1 หรือกลุ่มอ่อนแอ) ได้แก่ สายพันธุ์ X0012, X00S001, J41, J83, Su12, S238, NI0040, NI0046 ตามลำดับ ลูกศรสีเหลืองแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) ระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2

3. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโต

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างในส่วนของ ดิน น้ำ ลำต้น ใบ และรากของข้าวที่สมบูรณ์ และปลอดโรคจากพื้นที่ปลูก 5 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง นครศรีธรรมราช ปทุมธานี และ นนทบุรี เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งหมด 414 ไอโซเลท โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากบริเวณดิน มีจำนวน 124 ไอโซเลท ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนเชื้อมากที่สุดซึ่งดินที่เก็บตัวอย่างนั้นเป็นดินในแปลงที่มีข้าวอายุประมาณ 2 เดือน เนื้อดินมีสีน้ำตาลถึงดำ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนั้นมีจำนวนประชากรที่มีลักษณะของเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 10 กลุ่ม และแต่ละกลุ่มนั้นมีจำนวนมากและมากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนอื่นๆ พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีเชื้อที่มีคุณสมบัติดีเด่นในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดรวมอยู่ด้วย สูตรรองลงมาคือ ส่วนของราก จำนวน 102 ไอโซเลท ซึ่งรากต้นข้าวที่นำมาแยกนั้นได้คัดเลือกจากต้นที่อุดมสมบูรณ์ และมีอายุประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งระยะนี้ต้นข้าวจะมีการเจริญเติบโตที่ดี รากจะแผ่ขยายยาวและมีจำนวนมาก จากน้ำในแปลงนา จำนวน 88 ไอโซเลท โดยน้ำที่ได้จะพบว่าเมื่อนำมาแยกเชื้อก่อนข้างสูงและหลากหลายซึ่งพบว่าในกลุ่มนี้เป็นเชื้อในกลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม ขอบหยัก ผิวหน้าลื่นๆ รูปร่างไม่แน่นอน เท่านั้น จำนวนมากที่สุด จากส่วนของลำต้น จำนวน 58 ไอโซเลท ลำต้นที่นำมาแยกเชื้อนั้นมีอายุประมาณ 1-3 เดือนโดยพบว่าก่อนข้างได้เชื้อจำนวนค่อนข้างน้อย ความหลากหลายเชื้อทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างน้อยบางกลุ่มพบแค่ 2 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากส่วนของลำต้นไม่พบเชื้อที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเลย และที่แยกได้จากในส่วนของใบ มีจำนวน 42 ไอโซเลท ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนเชื้อน้อยที่สุด ก่อนข้างมีความหลากหลายต่ำ แต่ก็พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติดีเด่นหลาย ไอโซเลททั้งการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 12) โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ

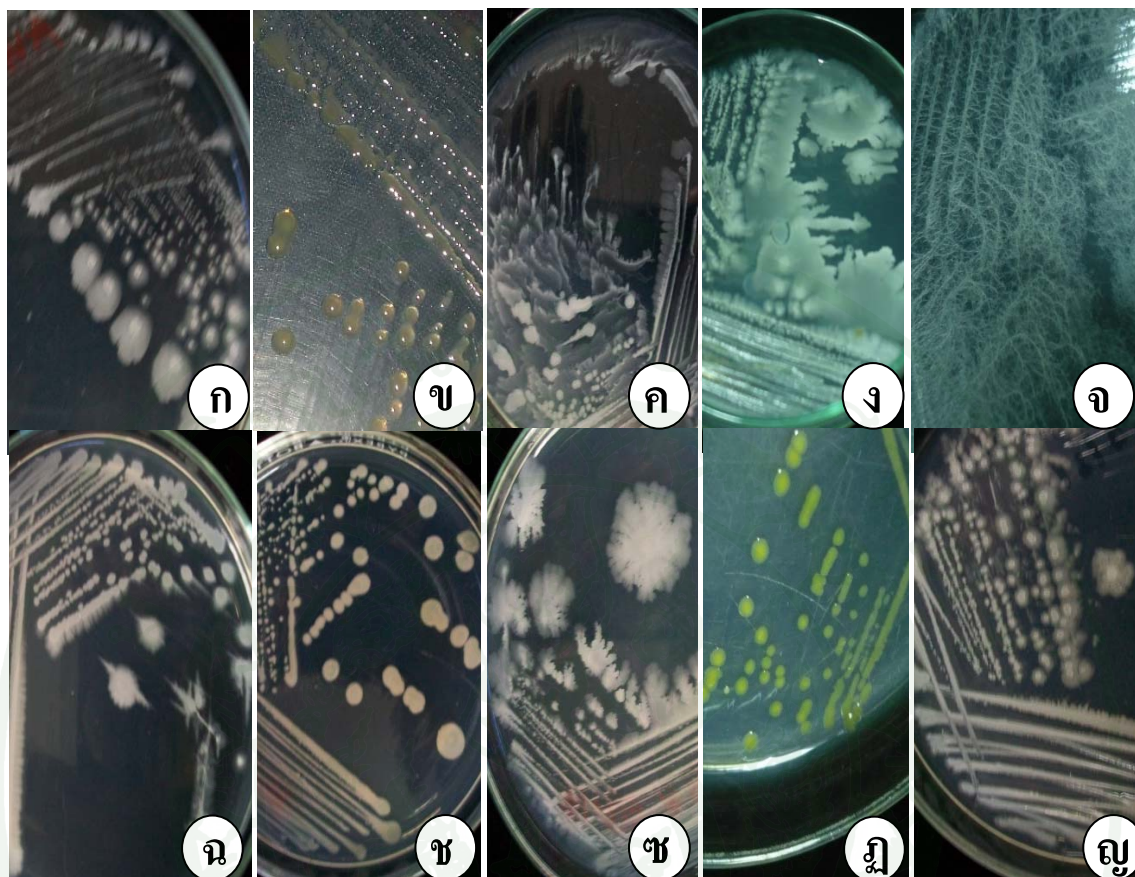
จากการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียปฏิปักษ์อย่างหยาบตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NGA ได้ 10 กลุ่ม มีลักษณะดังนี้ กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีขาว ขุ่น ตรงกลางสีเข้ม รอบนอกสีขาวใส ขอบหยักเล็กน้อย กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีส้มอ่อน กลมแบน ขนาดปานกลาง ขอบเรียบ เป็นมันวาว มีขนาดเล็ก กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นเส้น ๆ คล้ายรูปพุ่มไม้ ขอบหยัก กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ๆ ขอบหยัก มีลักษณะเหนียวหนืด เข้ม กลุ่ม

ที่ 5 โคโลนีสีขาว รูปร่างเป็นเส้น ๆ ไม่แน่นอน ลักษณะคล้ายดอกไม้ ขอบหยัก ตรงกลางนูน
เล็กน้อย กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน ขรุขระ กลุ่มที่ 7 โคโลนี
กลม รี ลักษณะแบน สีขาวนวล ขอบเรียบ เป็นมันวาว กลุ่มที่ 8 โคโลนีสีชมพู ลักษณะกลม รี แบน ๆ
ขนาดเล็ก ขอบเรียบ กลุ่มที่ 9 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ เป็นมันวาว และกลุ่มที่ 10 โคโลนีสี
ขาวครีม ขอบหยัก ผิวหน้าลื่น ๆ รูปร่างไม่แน่นอน แผ่ขยายเต็มจานอาหาร เรียบ เป็นมันวาว รูปร่าง
กลม (ตารางที่ 12 และภาพที่ 10)



ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียที่แยกจากส่วนของดิน น้ำ ลำต้น ใบ และรากต้นข้าวบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	แกรม	จำนวนสายพันธุ์				
			ดิน	น้ำ	ต้น	ใบ	ราก
1	โคโลนีสีขาวขุ่น ตรงกลางสีเข้ม รอบนอกสีขาวใส ขอบหยักเล็กน้อย	+	21	12	7	5	6
2	โคโลนีสีส้มอ่อน กลม แบน ขนาดปานกลาง ขอบเรียบ เป็นมันวาว มีขนาดเล็ก	-	20	15	9	3	3
3	โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นเส้น ๆ คล้ายรูปพุ่มไม้ ขอบหยัก	+	13	6	5	3	9
4	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ๆ ขอบหยัก มีลักษณะเหนียวหนืด เยิ้ม	+	17	8	3	13	16
5	โคโลนีสีขาว รูปร่างเป็นเส้น ๆ ไม่แน่นอน ลักษณะคล้ายดอกไม้ ขอบหยัก ตรงกลางนูนเล็กน้อย	+	9	4	8	3	23
6	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน ขรุขระ	+	7	7	4	3	16
7	โคโลนีกลม รี ลักษณะแบน สีขาวนวล ขอบเรียบ เป็นมันวาว	-	4	6	4	2	7
8	โคโลนีสีชมพู ลักษณะกลม รี แบน ๆ ขนาดเล็ก ขอบเรียบ	-	9	4	3	4	4
9	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ เป็นมันวาว	+	5	6	2	3	7
10	โคโลนีสีขาวครีม ขอบหยัก ผิวหน้าลื่น ๆ รูปร่างไม่แน่นอน แผ่ขยายเต็มจานอาหาร เรียบ เป็นมันวาว รูปร่างกลม	+	19	20	13	3	11
รวม	ทั้งหมด 414 สายพันธุ์		124	88	58	42	102



ภาพที่ 10 ลักษณะพื้นฐานวิทยาโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว 10 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (ภาพ ก ข ค ง จ ฉ ช ฎ และ ญ ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีขาวขุ่น ตรงกลางสีเข้ม รอบนอกสีขาวใส ขอบหยักเล็กน้อย

กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีส้มอ่อน กลม แบน ขนาดปานกลาง ขอบเรียบ เป็นมันวาว มีขนาดเล็ก

กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นเส้น ๆ คล้ายรูปพุ่มไม้ ขอบหยัก

กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ๆ ขอบหยัก มีลักษณะเหนียวหนืด เยิ้ม

กลุ่มที่ 5 โคโลนีสีขาว เป็นเส้น ๆ คล้ายดอกไม้ ขอบหยัก ตรงกลางนูนเล็กน้อย

กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน ขรุขระ

กลุ่มที่ 7 โคโลนีกลม รี ลักษณะแบน สีขาวนวล ขอบเรียบ เป็นมันวาว

กลุ่มที่ 8 โคโลนีสีชมพู ลักษณะกลม รี แบน ๆ ขนาดเล็ก ขอบเรียบ

กลุ่มที่ 9 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ เป็นมันวาว

กลุ่มที่ 10 โคโลนีสีขาวครีม ขอบหยัก ผิวหน้าลื่น ๆ รูปร่างไม่แน่นอน แผ่ขยายเต็มจานอาหาร เรียบ เป็นมันวาว รูปร่างกลม

3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากใบ ลำต้น ราก ดิน และน้ำในแปลงนาต่อการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 414 ไอโซเลท ที่แยกได้จากส่วนของใบ ลำต้น ราก น้ำ และดินจากแปลงปลูกข้าวในแหล่งปลูกต่างๆ ขึ้นดิน ด้วยวิธี dual culture เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพของภาควิชาโรคพืช *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคพืชหลายชนิด ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 28 ไอโซเลท ที่แยกได้จากส่วนของดิน 12 ไอโซเลท (D32, D67, D121, XA61, XA78, XA92, XA111, XA132, XA221, XA323, XA339, XA408) จากราก 8 ไอโซเลท (RH005, RH008, RH014, RH036, RH143, RH176, BCA072, BCA196) น้ำ 5 ไอโซเลท (WCA008, WCA166, WCA169, WCA297, WCA335) และจากใบ 3 ไอโซเลท (BCA003, BCA005, BCA007) มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในลักษณะการเจริญแข่งขันกลุ่มทับ และอีกจำนวน 15 ไอโซเลท ที่แยกจากดินจำนวน 7 ไอโซเลท (XA1, XA6, XA22, XA31, XA49, XA57, D10) แยกจากรากข้าว 4 ไอโซเลท (RH002, RH019, RH034, RH088) แยกจากใบ 3 ไอโซเลท (BCA154, BCA297, BCA307) และแยกจากน้ำ 1 ไอโซเลท คือ WCA402 ที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในลักษณะการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคเป้าหมาย (ตารางที่ 12) และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 43 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี agar diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะและมีบริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุดมี 7 ไอโซเลท ได้แก่ XA1, XA6, XA22, XA31, XA49, XA57 และ D10 (แยกจากดินในแปลงนาข้าว) ซึ่งให้บริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้มากที่สุดและไม่แตกต่างกับเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบ KPS46 (ตารางที่ 13) ส่วนเชื้อปฏิปักษ์อีก 36 ไอโซเลท ให้บริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้น้อยกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ KPS46

ตารางที่ 13 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากใบข้าว ราก และดิน ที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวด้วยวิธี dual culture

แหล่งที่มาของแบคทีเรีย	กลไกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคขอบใบแห้งข้าว	
	สร้างสารยับยั้งการเจริญ ^{1/}	เจริญแข่งขันกลุ่มทับ ^{2/}
ใบ	BCA154, BCA297, BCA307	BCA003, BCA005, BCA007
ดินแปลงนา	XA1, XA6, XA22, XA31, XA49, XA57, D10	D32, D67, D121, XA61, XA78, XA92, XA111, XA132, XA221, XA323, XA339, XA408
รากข้าว	RH002, RH019, RH034, RH088	RH005, RH008, RH014, RH036, RH143, RH176, BCA072, BCA196
น้ำแปลงนา	WCA402	WCA008, WCA166, WCA169, WCA297, WCA335
รวม	15	28

^{1/} เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวที่ทดสอบด้วยวิธี dual culture ที่ 48 ชั่วโมง

^{2/} เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการเจริญแข่งขันกลุ่มทับเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวที่อายุ 24-72 ชั่วโมง

3.2.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

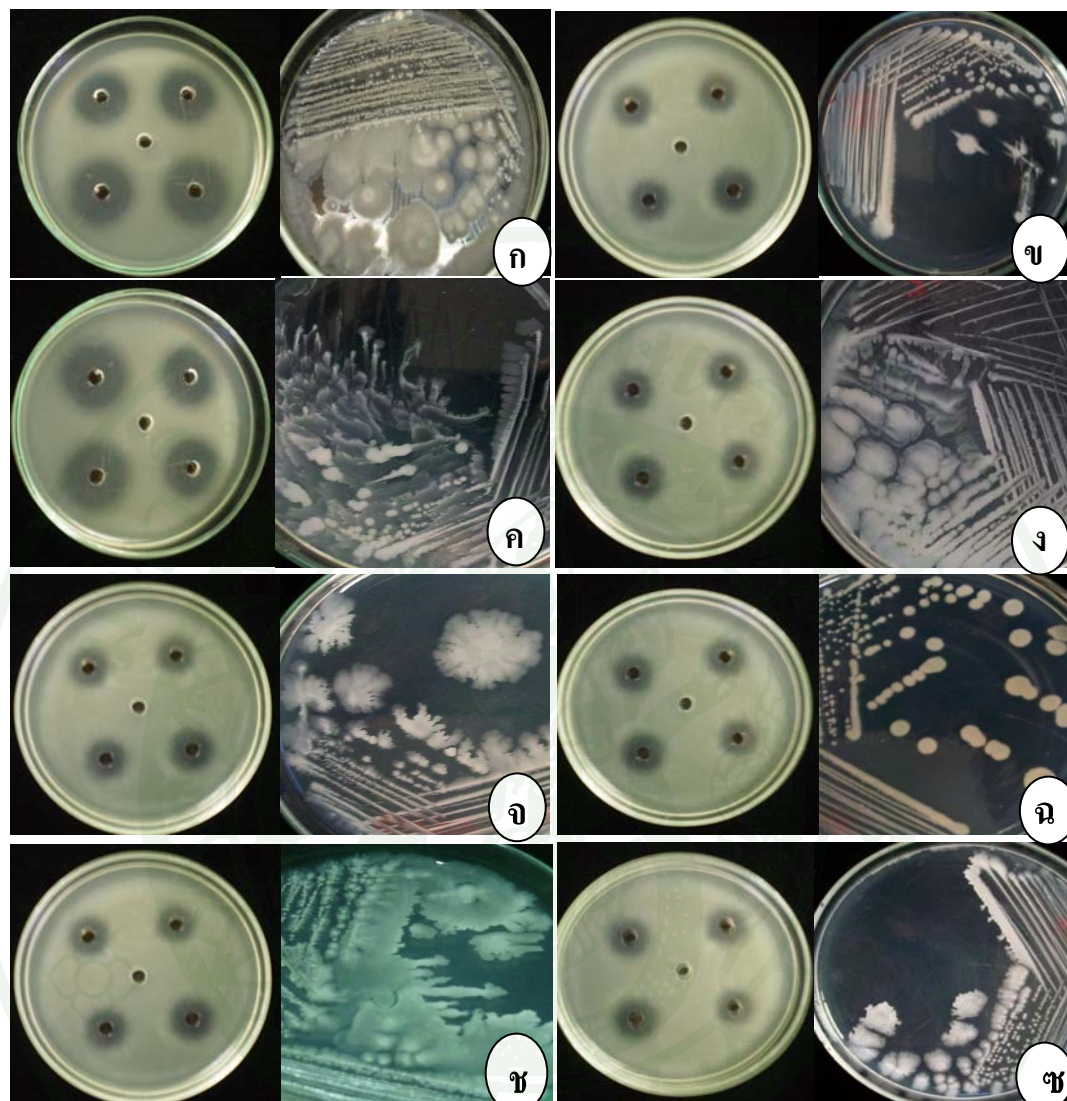
จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของข้าวทั้ง 43 ไอโซเลท มาคัดเลือกสายพันธุ์คุณภาพที่มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคพืชด้วยวิธี agar diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 7 ไอโซเลท ได้แก่ XA1, XA6, XA22, XA31, XA49 และ XA57 ที่แยกได้จากดินในแปลงนาข้าวและมีแนวโน้มในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดี และพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท XA6 มีบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 8.7 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท D10 และไอโซเลท XA1 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.6 และ 7.1 มิลลิเมตร ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าอย่างแตกต่างในทางสถิติกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ KPS46 ส่วนเชื้อปฏิชีวนะอีก 4 ไอโซเลท คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท XA31, XA22, XA49 และ XA57 มีบริเวณยับยั้งไม่แตกต่างในทางสถิติกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.6, 6.5, 6.5 และ 6.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ 12) และ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง ข้าวด้วยวิธี agar diffusion

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ^{1/}		
		ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)	ความกว้างหลุม cork borer (มม.)	บริเวณยับยั้ง (มม.)
XA1	ดิน	19.2bc	5	7.1bc
XA6	ดิน	22.4a	5	8.7a
XA22	ดิน	18c	5	6.5c
XA31	ดิน	18.2c	5	6.6c
XA49	ดิน	18c	5	6.5c
XA57	ดิน	17.8c	5	6.4c
D10	ดิน	20.2b	5	7.6b
KPS46 ^{2/}	ดินรอบรากถั่วเหลือง	18c	5	6.5c
%CV		22.91		20.70

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ได้จาก 5 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)

^{2/} *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ที่มีรายงานการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด



ภาพที่ 11 ภาพแสดงประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี agar diffusion และลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยไอโซเลต XA6 (ก) ไอโซเลต D10 (ข) ไอโซเลต XA1(ค) ไอโซเลต XA22 (ง) เลต XA31 (จ) ไอโซเลต XA49 (ฉ) ไอโซเลต XA57 (ช) และสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ KPS46 (ซ) ตามลำดับ

3.2.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ในการกระตุ้นความงอกและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ของข้าวทั้ง 414 ไอโซเลท ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยการประเมินผลต่ออัตราการงอกของเมล็ดข้าวและความแข็งแรงของกล้าข้าว โดยการคลุกเมล็ดข้าวก่อนปลูกด้วย suspension ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท (1×10^8 CFU/มิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คุณภาพ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ประเมินอัตราการงอกเมล็ด และน้ำหนักสดกล้าข้าวที่อายุ 14 วันหลังปลูก พบว่าเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 15 ไอโซเลท แยกได้จากดินในแปลงนา 8 ไอโซเลท (XA1, XA6, XA22, XA31, XA49, XA57, D10, D55,) แยกจากใบข้าว 7 ไอโซเลท (BCA002, BCA039, BCA082, BCA137, BCA114, BCA205, BCA206,) มีแนวโน้มเป็น Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) โดดเด่นทั้งในลักษณะการกระตุ้นการงอกเมล็ด และส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวในทุกตัวชี้วัด (ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด) โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการส่งเสริมการงอกเมล็ด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ XA22, XA49, XA57, BCA205 และ BCA039 โดยตรวจสอบข้าวที่งอกอายุ 14 วัน มีน้ำหนักสดเฉลี่ย เท่ากับ 8.25, 8.17, 7.94, 7.76 และ 9.11 กรัม ตามลำดับ และไอโซเลทที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตกล้าข้าวทางด้านน้ำหนักสดสูงสุด จำนวน 5 ไอโซเลท คือ XA6, D10, BCA039, BCA082 และ XA31 มีน้ำหนักสด เท่ากับ 9.67, 9.13, 9.11, 9.06 และ 8.9 กรัม มีอัตราการงอกเท่ากับ 95, 99, 100, 99 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดทั้ง 15 ไอโซเลทจากทั้งหมด 414 ไอโซเลทเบื้องต้น นำมาทดสอบยืนยันถึงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าว (เปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด ความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด) ในสภาพเรือนทดลอง (ตารางที่ 15) เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่ดีที่สุด ผลการทดลอง พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท คือ D10, XA6, XA22, BCA039 และ BCA082 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในด้านส่งเสริมความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด โดยมีผลเฉลี่ย เท่ากับ 9.63, 5.63 เซนติเมตร และ 9.67 กรัม ตามลำดับ รองลงมา คือ ไอโซเลท D10 ที่มีค่าเฉลี่ยความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดเท่ากับ 8.22, 5.82 เซนติเมตร และ 7.83 กรัม ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาทั้งด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ XA6 และ D10 มีประสิทธิภาพดีสูงสุดอย่างแตกต่าง

ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($P=0.05$) กับสายพันธุ์คุณภาพ KPS46 และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ จึงคัดเลือกเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตดังกล่าวนำไปใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ต่อไป (ตารางที่ 16 และภาพที่ 13)

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับเรือนทดลอง

จากการทำการทดลองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ในสภาพห้องปฏิบัติการในการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยใช้จำนวนครั้งในการพ่นใบ 2 อัตรา (การคลุกเมล็ดรวมกับพ่นใบ 6 และ 10 ครั้ง) ในข้าว 2 พันธุ์ ที่แตกต่างกัน คือ ขาวดอกมะลิ105 และสุพรรณบุรี1ที่มีรายงานว่าพันธุ์ที่มีความอ่อนแอและต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตได้แก่ สายพันธุ์ XA6 และ D10 ที่มีประสิทธิภาพดีทัดเทียมกับสายพันธุ์KPS46 โดยกรรมวิธีคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบ 6 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก) และ 10 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 21 28 35 42 49 56 63 และ 70 วัน หลังปลูก) ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($P=0.05$) ทางด้านการเพิ่มขึ้นของความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด (ตารางที่ 17) โดยทางด้านความสูงต้นพบว่าที่อัตราการใช้ 6 ครั้งและ 10 ครั้ง ให้ความสูงต้นเท่ากับ 29.63, 29.07 และ 28.18, 28.71 เซนติเมตร ในพันธุ์สุพรรณบุรี1 และ ขาวดอกมะลิ105 ตามลำดับ ทางด้านความยาวราก พบว่าที่อัตราการใช้ 6 ครั้งและ 10 ครั้ง ให้ความยาวรากเท่ากับ 22.11, 22.55 และ 16.55, 16.40 เซนติเมตร ในพันธุ์สุพรรณบุรี1 และ ขาวดอกมะลิ105 ตามลำดับ และทางด้านน้ำหนักสด พบว่าที่อัตราการใช้ 6 ครั้งและ 10 ครั้ง ให้น้ำหนักสดเท่ากับ 25.08, 24.5 และ 22.01, 22.88 กรัม ในพันธุ์สุพรรณบุรี1 และ ขาวดอกมะลิ105 ตามลำดับ โดยแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีใช้สารเคมี copper hydroxide ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P=0.05$) ซึ่งได้นำจำนวนครั้งที่ 6 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก) ไปใช้ในการทดลองในสภาพไร่ต่อไป เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต และลดแรงงานการพ่น

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่ย่อยจากส่วนต่างของข้าว และดิน น้ำในแปลงนา ต่อการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค blotter test

ไอโซเลตแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าว	
	ความงอกเมล็ด (%) ^{1/}	น้ำหนักสดต้นกล้าข้าว (กรัม) ^{1/}
1 D55	98c	7.72c
2 D10	99b	9.13ab
3 XA1	99b	8.22b
4 XA6	95e	9.67a
5 XA22	100a	8.25b
6 XA31	98c	8.9b
7 XA49	100a	8.17b
8 XA57	100a	7.94c
9 BCA002	99b	8.66b
10 BCA 039	100a	9.11ab
11 BCA082	99b	9.06ab
12 BCA114	98c	8.67b
13 BCA137	98c	8.00b
14 BCA205	100a	7.76c
15 BCA206	98c	7.72c
16 KPS46 ^{2/}	97d	7.71c
17 Control ^{3/}	95e	7.47c
%CV	1.56	7.45

^{1/} ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 13 ประเมินผลที่ 14 วันหลังปลูก

^{2/} แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46

^{3/} กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อคลุกเมล็ดข้าวแทน suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากส่วนต่างๆของข้าว และดิน น้ำในแปลงนา ต่อการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค blotter test

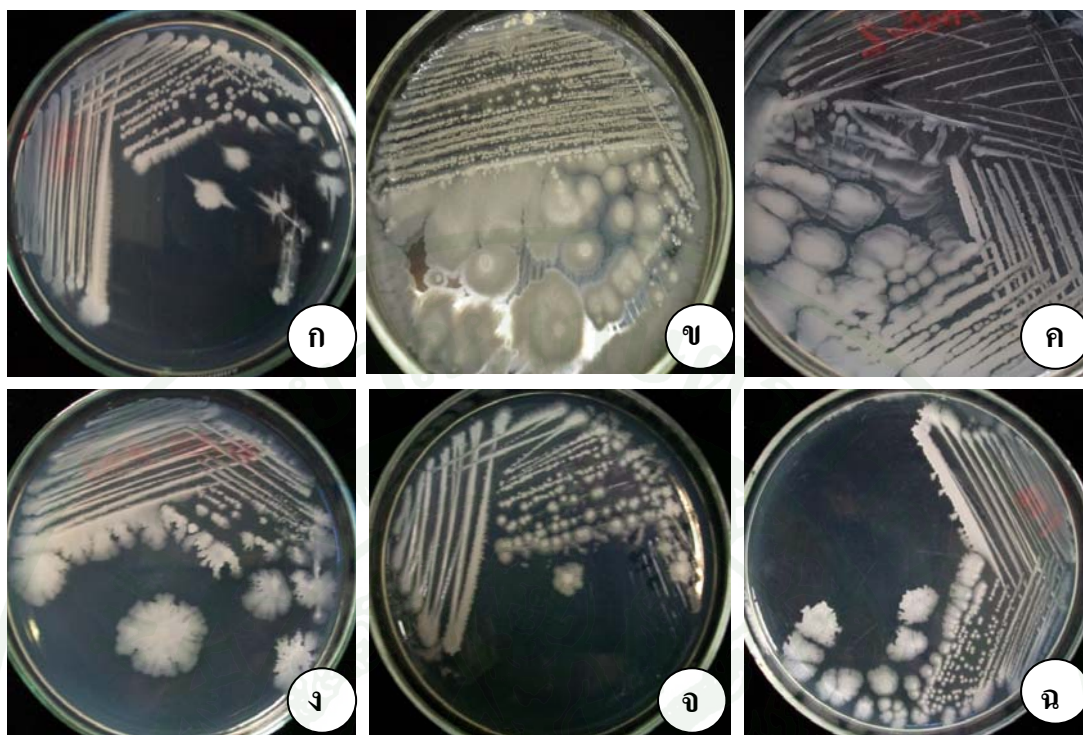
ไอโซเลตแบคทีเรีย	อัตราการเจริญเติบโตในแต่ละตัวชี้วัด ^{1/}			
	ความงอกเมล็ด (%)	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักสดต้นกล้าข้าว (กรัม)
1 D10	100a	8.22b	5.82a	7.83b
2 XA6	99ab	9.63a	5.63a	9.67a
3 XA22	100a	7.29cd	4.67bc	6.96
4 BCA039	99ab	7.87c	4.45bc	7.18c
5 BCA082	100a	8.12bc	5.21b	7.55bc
6 KPS46 ^{2/}	99ab	9.06ab	5.58ab	7.77bc
7 Control ^{3/}	95b	6.99d	4.04c	7.01c
%CV	1.66	10.53	12.14	11.19

^{1/} ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

SPSS version 13

^{2/} แบคทีเรียปฏิกรณ์ที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46

^{3/} กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อคลุกเมล็ดข้าวแทน suspension ของแบคทีเรียปฏิกรณ์



ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีแนวโน้มในการส่งเสริมการเจริญเติบโตกล้าข้าว (PGPR) ได้แก่ ไอโซเลต D10 จากดินแปลงนา (ก) ไอโซเลต XA6 จากดินแปลงนา (ข) ไอโซเลต XA22 จากดินแปลงนา (ค) ไอโซเลต BCA039 จากรากข้าว (ง) และไอโซเลต BCA082 จากรากข้าว (จ) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ KPS46 (ฉ) ตามลำดับ

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่จากการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบที่จำนวนครั้งในการพ่นรวม 6 ครั้ง และ 10 ครั้ง ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะโดยการประเมินอัตราการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	สุพรรณบุรี ^{2/}			ข้าวดอกมะลิ105 ^{2/}		
	สูงต้น (ซม.)	ยวราก (ซม.)	น้ำหนักสด (กรัม)	สูงต้น (ซม.)	ยวราก (ซม.)	น้ำหนักสด (กรัม)
1	29.07a	22.55ac	24.5ab	28.71ab	16.40ab	22.88a
2	27.98b	19bc	23.41b	27.07ab	16b	21.38ab
3	23.88cd	18.04c	21.49c	23.65c	15c	20b
4	29.63a	22.11a	25.08a	28.18a	16.55ab	22.01a
5	27.75b	20b	23.91b	27ab	17.04a	19c
6	25.87c	21.5ab	23.32b	25.67b	16b	20.93b
7	23.04d	20.1b	18d	21.77d	14.93d	18.74d
8	20.58e	14.96d	16.8e	20.22e	11e	15.08e
%CV	11.56	12.02	13.45	11.45	11.61	11.44

^{1/} กรรมวิธีดังตารางที่ 1

^{2/} ตัวอักษรของข้อมูลได้จากค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูลและค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้อัตราการใช้เชื้อร่วมกับสารฟอสฟอรัสด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ที่อัตราการใช้เท่ากับ 10 และ 6 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($P=0.05$) สามารถลดอัตราการเกิดโรคได้ดีที่สุดเท่ากับ 80 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์สุพรรณบุรี1 และข้าวดอกมะลิ105 ตามลำดับ (ที่อายุ 7 14 21 28 35 42 49 56 63 และ 70 วันหลังปลูก) และ 79 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์สุพรรณบุรี1 และข้าวดอกมะลิ105 ตามลำดับ (ที่อายุ 7 15 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก) โดยแตกต่างในทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ลดการเกิดโรคลงได้เท่ากับ 75 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (พันธุ์สุพรรณบุรี1) และ 64 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (พันธุ์ข้าวดอกมะลิ105) ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

3.4 การวิเคราะห์เอนไซม์ β -1,3-glucanase ในข้าวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์เอนไซม์ β -1,3-glucanase ในพืชที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

จากการตรวจวัดปริมาณ/การสะสม เอนไซม์ β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 และพันธุ์สุพรรณบุรี1 พบว่าในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 ที่คลุกเมล็ดด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 28 วันหลังปลูก) ร่วมกับการปลูกเชื้อ วันที่ 4 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ $2.68 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ลดความรุนแรงโรคได้ 72 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้ KPS46 ร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 28 วันหลังปลูก) ร่วมกับการปลูกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เท่ากับ $2.25 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ลดความรุนแรงโรคได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 (ภาพที่

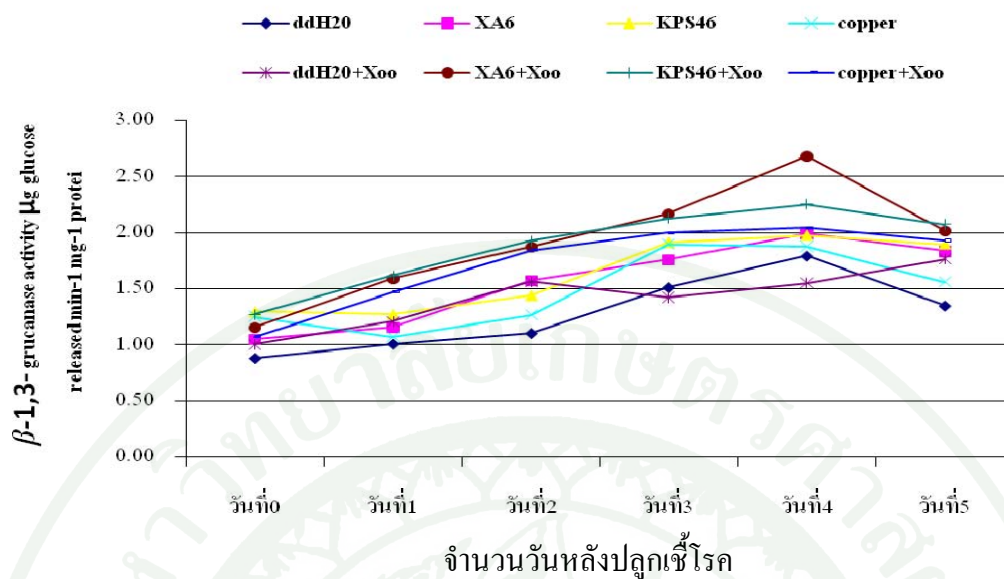
14 และ 15) พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 28 วันหลังปลูก) ร่วมกับการปลูกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ให้ค่าการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์สูงสุดวันที่ 4 เท่ากับ $2.23 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ลดความรุนแรงโรคเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KPS46 ร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 28 วันหลังปลูก) ร่วมกับการปลูกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ให้ค่าการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ $2.10 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์และน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อคือ เท่ากับ 2.01 และ $1.62 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ตามลำดับ ซึ่งกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดร่วมกับการปลูกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถลดอัตราการเกิดโรคได้ 59 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 16 และ 17)

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

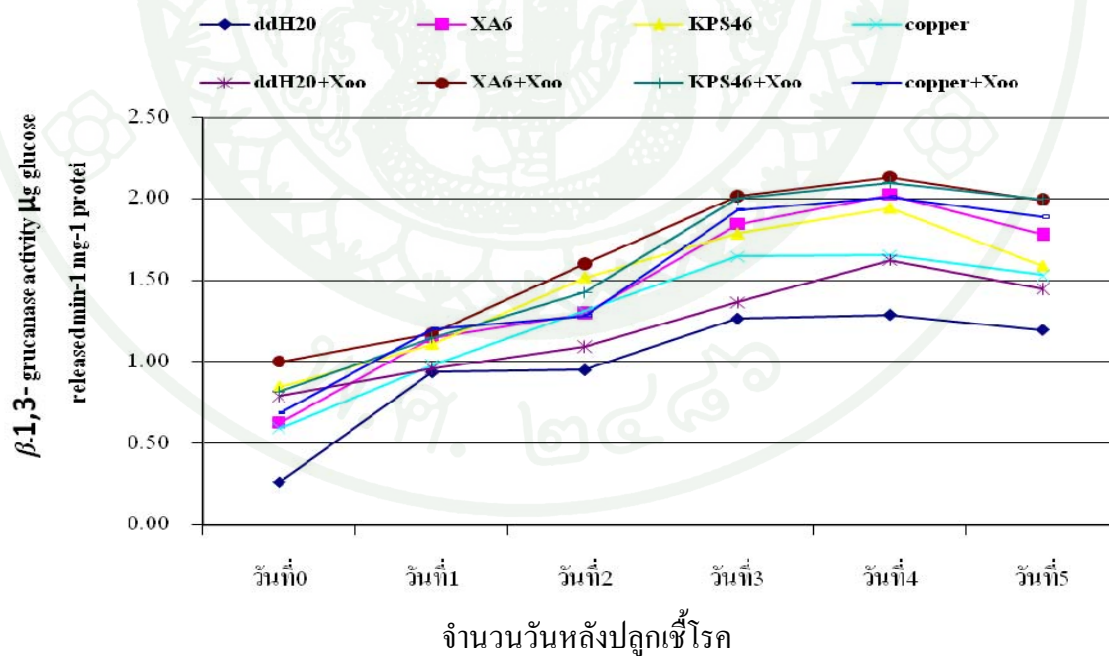
กรรมวิธี ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การลดโรค ^{2/}	
	สุพรรณบุรี 1	ขาวดอกมะลิ 105
1	80a	69a
2	73e	60f
3	77b	67b
4	79ab	68ab
5	68f	59g
6	74d	65c
7	75c	64e
8	30g	0h
%CV	22.06	38.25

^{1/} = รายละเอียดกรรมวิธีแสดงในตารางที่ 1

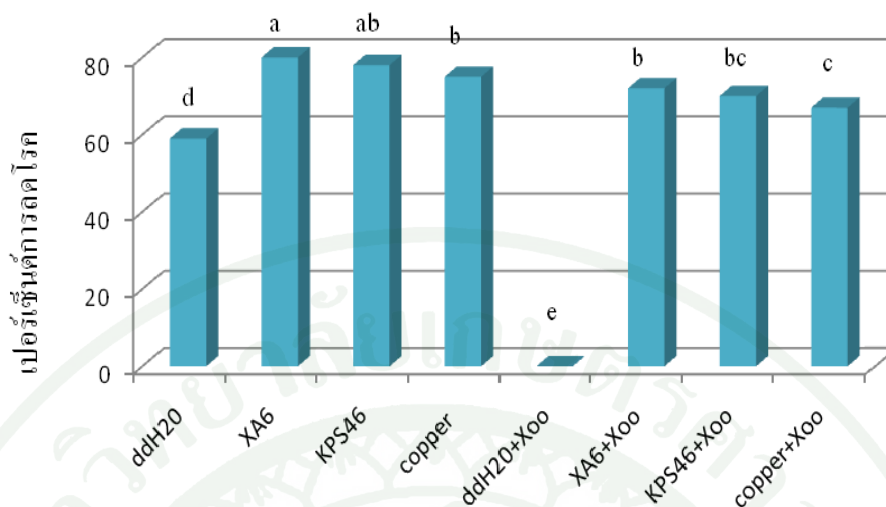
^{2/} = เปอร์เซ็นต์การลดโรค คิดจากค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)



ภาพที่ 14 ปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ก่อนและหลัง กระตุ้นด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในสภาพเรือนทดลอง

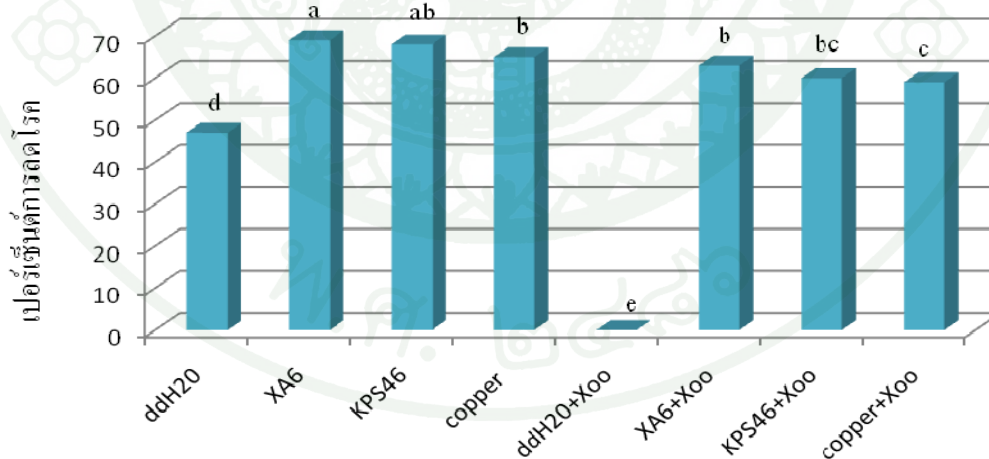


ภาพที่ 15 ปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ก่อนและหลัง กระตุ้นด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในสภาพเรือนทดลอง



กรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิปักษ์และสารเคมีควบคุมโรค

ภาพที่ 16 การลดการเกิดโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* ในการตรวจสอบปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในสภาพเรือนทดลอง



กรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิปักษ์และสารเคมีควบคุมโรค

ภาพที่ 17 การลดการเกิดโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* ในการตรวจสอบปริมาณ/กิจกรรมการสะสม β -1,3-glucanase ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในสภาพเรือนทดลอง

3.5 คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการจำแนกชนิด

เนื่องจากผลการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากดิน น้ำ ใบ ลำต้น และรากข้าวทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 ที่แยกได้จากดินในแปลงนาข้าว มีคุณสมบัติโดดเด่นที่สุดทั้งในด้านการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ควมคุมโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว จึงคัดเลือกไอโซเลทดังกล่าวมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดและใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.5.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการย้อมแกรม (Gram's stain)

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 บนอาหาร NGA นาน 24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะโคโลนีสีมีขาวครีมปนน้ำตาลอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวด้าน ผลการศึกษาการย้อมแกรมด้วยสาร crystal violet และ safranin-o ตามวิธีการของ (Schaad, 1988) พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียติดสีม่วงของ crystal violet และยีนย่นผลโดยทดสอบ Gram reaction โดยการใช้ (3% KOH) (Suslow and Schroth, 1982) ตารางที่ 19 และภาพที่ 18

3.5.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การศึกษาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 และ D10 สามารถเคลื่อนที่ได้ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ motility เกิดปฏิกิริยาเป็นบวกในการทดสอบ gelatin hydrolysis เกิดปฏิกิริยาเป็นลบในการทดสอบ oxidase test เนื่องจากอาหารทดสอบไม่มีการเปลี่ยนสี การทดสอบ catalase production ผลเป็นบวก มีฟองเกิดขึ้น เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase มาย่อย H_2O_2 ที่จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ให้ผลลบในการทดสอบ starch hydrolysis สามารถย่อยมันฝรั่งได้ ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบปฏิกิริยาการใช้สารซิเตรต (citrate utilization) และให้ผลเป็นบวกในการย่อยไขมัน lipolytic activity และเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถสร้างสปอร์ได้ ข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงการจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition เพื่อ

จำแนกเบื้องต้น (ตารางที่ 19) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ XA6 มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. (Anonymous, 2002) (ภาพที่ 18)

3.5.3 คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการจำแนกชนิดโดยการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันบนต้นยาสูบ

จากผลการทดสอบทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันบนต้นยาสูบ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ดีที่สุดนั้นไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ เช่นเดียวกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ KPS46 และการใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (ภาพที่ 18 (จ)) ซึ่งเป็นการยืนยันเบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ดังกล่าวไม่เป็นเชื้อก่อโรคในพืช

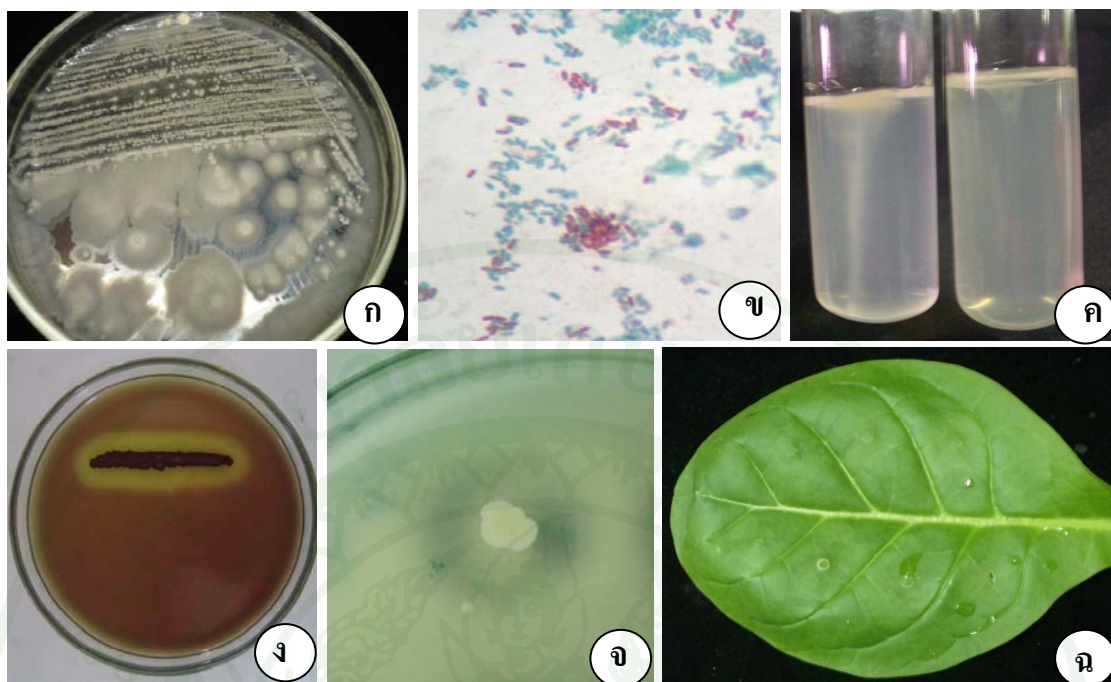
ตารางที่ 19 คุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp.

การทดสอบ	ปฏิกิริยาเชื้อทดสอบ ^{1/}	
	XA6	<i>Bacillus</i> spp. ^{2/}
Gram staining	+	+
Tobacco hypersensitivity	-	-
-Oxidase test	-	-
-Motility	+	+
-Gelatin hydrolysis	+	+
-Catalase production	+	+
-Starch hydrolysis	+	+
-Growth on potato	+	+
-Citrate utilization	+	+
-Lipolytic activity	+	+

^{1/} = เครื่องหมาย (+) หมายถึงเกิดปฏิกิริยา เครื่องหมาย (-) หมายถึงไม่เกิดปฏิกิริยา

^{2/} = ข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp จาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition เพื่อจำแนกชนิด

^{3/} = การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างรวดเร็วบนใบยาสูบ ภายใน 24-48 ชั่วโมง



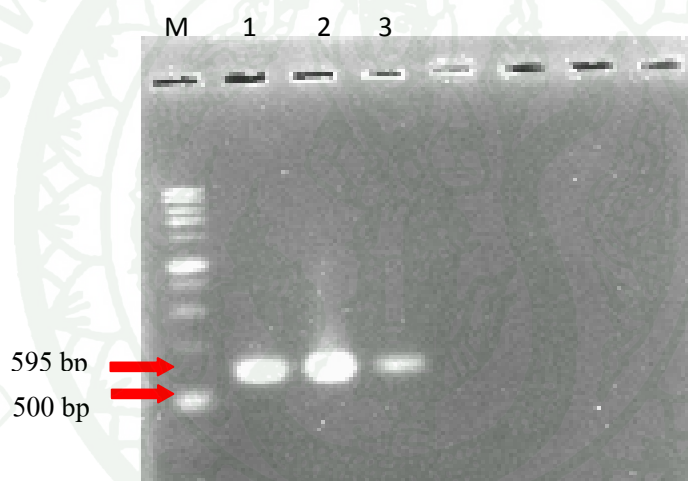
ภาพที่ 18 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 (ก) ลักษณะเซลล์และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท XA6 (ข) การทดสอบ Motility test (ค) การทดสอบ Starch hydrolysis (ง) การทดสอบ Gelatin hydrolysis (จ) และการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันบนใบยาสูบที่อายุ 45 วัน (ฉ)

3.5.4 ผลการจำแนกชนิดเชื้อปฏิปักษ์โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

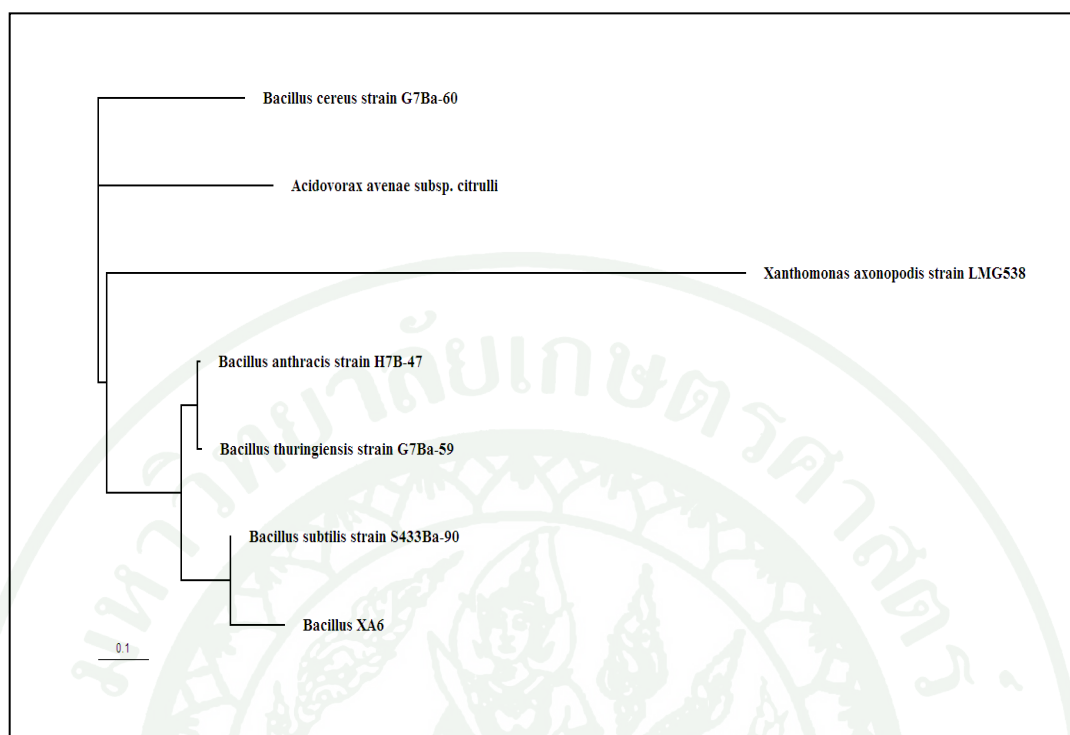
ด้วย primer ที่จำเพาะของกลุ่ม *Bacillus* spp.

จากการนำชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพโดดเด่นในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์และ PGPR ได้แก่ XA6 มาทำการทดสอบยืนยันการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์บริเวณ 16S rRNA ของ *Bacillus* spp ที่จำเพาะในกลุ่ม *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Bacillus atrophaeus* ซึ่งผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท คือ XA6 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 595 bp (ภาพที่ 19) บน agarose gel ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าไอโซเลทดังกล่าวจัดอยู่ในجنس *Bacillus* sp. ในกลุ่ม 5 species ดังกล่าว และได้วิเคราะห์ลำดับเบสโดยโปรแกรม blast ใน Genbank ซึ่งลำดับเบสมีความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* 99 % (ภาพที่ 20) (ข้อมูลภาคผนวก)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 สามารถจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวว่า มีลักษณะตรงกับ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* strain S433139-90 เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามการจำแนกเชื้อในระดับ genus หรือ species โดยปฏิบัติตามเกณฑ์ ดังนี้ (1) เปรียบเทียบลำดับกับลำดับเบสที่มีรายงานอยู่แล้วพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ≥ 99 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อได้ในระดับ species; (2) ถ้ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 99 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อได้ในระดับ genus (3) และถ้ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน < 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อได้ในระดับ family



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการเป็นเชื้อ *Bacillus* sp. ด้วยการใส่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA ขนาด 595 bp โดยตำแหน่งที่ 1-3 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 (สายพันธุ์เปรียบเทียบ) 2 = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP009s (*Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ SP009s จากห้องปฏิบัติการแบคทีเรียภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มก.) และ 3= เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ Phylogeny ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ XA6 เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank แบคทีเรียสายพันธุ์ XA6 มีความเหมือนกันกับ *Bacillus subtilis* strain S433139-90 เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

4. การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่เพื่อการใช้ในการผลิตข้าว

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว พบว่าได้เชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ที่มีแนวโน้มที่ดีในการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต XA6 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงมากที่สุดทั้งทางด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโต แตกต่างในทางสถิติเมื่อเทียบกับไอโซเลต XA6 และเมื่อทำการจำแนกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าเชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ XA6 เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในระบบการผลิตข้าวในสภาพไร่อต่อไป

4.1 อาหารเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ XA6 โดยการพิจารณาจากสารอาหารและแหล่งที่ใช้ในเมตาบอไลต์ของแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นสารผสมในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 ผลการคัดเลือกโดยการเลี้ยงเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในน้ำคัมธัญพืช/พืช/ผลผลิตจากพืช ที่คัดเลือกมา พบว่า มันฝรั่งต้มแล้วกรอง เป็นแหล่งพลังงานที่ให้คาร์บอนสูงมากที่สุด โดยสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 3×10^{19} CFU/มิลลิลิตร และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เพิ่มจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 3×10^{17} CFU/มิลลิลิตร และในน้ำคัมธัญพืช/พืช/ผลผลิตจากแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด เท่ากับ 2.9×10^{19} CFU/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เจริญเติบโตได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำคัมธัญพืช/พืชชนิดอื่นทั่วไป และพบว่าไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับสูตรอาหารดัดแปลง MS-medium (ชัยสิทธิ์, 2549) ที่อายุ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 20) จึงได้นำส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดมาหาอัตราส่วนในการผสมเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยอัตราส่วนระหว่างน้ำคัมธัญพืช/พืช/ผลผลิตจาก : กากน้ำตาล ได้อ้างอิงจาก (ชัยสิทธิ์, 2548) ที่สามารถเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 ซึ่งเป็นกลุ่ม *Bacillus* sp. เช่นเดียวกัน ในอัตราส่วนกากถั่วเหลืองต้มแล้วกรอง: กากน้ำตาล เท่ากับ 10 : 10 (กรัม/กรัมต่อ น้ำ 1 ลิตร) จึงได้ปรับอัตราส่วนในส่วนของมันฝรั่งต้มแล้วกรอง ที่นำมาเลี้ยงรวมกันกับกากถั่วเหลืองและกากน้ำตาลโดยการทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวผสมที่ปรับอัตราส่วนผสมของมันฝรั่งต้มแล้วกรอง: กากน้ำตาล: กากถั่วเหลืองต้มแล้วกรองเท่ากับ 100:10:10, 150:10:10, 200:10:10, 250:10:10 และ 300:10:10 (กรัม/กรัม/กรัม) ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ XA6 ตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยวิธี dilution plate ที่เวลาเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหารที่ได้จากการเลี้ยงในอัตราส่วน มันฝรั่งต้มแล้วกรอง: กากน้ำตาล: กากถั่วเหลืองต้มแล้วกรอง 250:10:10 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ XA6 ได้มากที่สุด เท่ากับ 3×10^{22} CFU/มิลลิลิตร โดยไม่แตกต่างในทางสถิติกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลง MS-medium (ชัยสิทธิ์, 2549) จึงตั้งชื่อสูตรอาหารดังกล่าวว่า MSP-medium (Molass Soybean Potato-medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ XA6 (ตารางที่ 21)

4.2 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

การทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมของสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเซลล์ดังกล่าวมาศึกษาปัจจัยตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหาร MSP-medium ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในการทดสอบความเป็นกรด่างที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSP-medium โดยการทดสอบที่ pH เท่ากับ 5 6 7 8 9 และ 10 พบว่าที่ความเป็นกรด่างที่ 6-7 ที่เป็นกรด่างตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหารดังกล่าวดีที่สุดแตกต่างในทางสถิติ โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 2.4×10^{20} CFU /มิลลิลิตร และการทดสอบความเร็วรอบต่อนาที ในการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 จากการทดสอบความเร็วรอบต่อนาทีที่เหมาะสม พบว่าความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงสูงขึ้น เชื้อแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและสูงที่สุดที่ 150 รอบ/นาที ที่เวลา 24 ชั่วโมงเชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดเท่ากับ 3×10^{24} CFU /มิลลิลิตร (ตารางที่ 22) จากการทดสอบความเร็วรอบต่อนาทีที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสภาพอุณหภูมิห้องในสูตรอาหาร MSP-medium เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงที่สุดในช่วง 2.5×10^{20} - 3×10^{24} CFU/มิลลิลิตร จึงนำผลที่ได้จากการศึกษาปัจจัยตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในอาหาร MSP-medium ที่ประกอบด้วย มันฝรั่งต้มแล้วกรอง:กากน้ำตาล: กากถั่วเหลืองต้มแล้วกรอง 250:10:10 ในน้ำ 1 ลิตร โดยปรับความเป็นกรด่างตั้งต้นที่ 7 เลี้ยงเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง และตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ MS-medium (ชัยสิทธิ์, 2548) ผลการทดลองพบว่า อาหาร MSP-medium เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 มีอัตราการเจริญเติบโตดีเทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป NGB ที่ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 3×10^{22} CFU /มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (ภาพที่ 21)

ตารางที่ 20 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์สูตรต่างๆ

วัตถุดิบ	จำนวนเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}
1 มันฝรั่ง	3×10^{19} a
2 มันเทศ	3×10^9 f
3 ปลาช่อน	2.5×10^{16} c
4 ไข่ขาว	2.1×10^{11} e
5 ฟางข้าว	3×10^8 g
6 แกลบ	3×10^9 f
7 กากน้ำตาล	3×10^{17} b
8 กากถั่วเหลือง	2.9×10^{19} a
9 ถั่วขาวบด	3×10^{14} d
10 ถั่วเขียวบด	3×10^{16} c
11 MS-Medium	3×10^{20} a
%CV	27.86

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ (P= 0.05)

Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 13

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ที่เจริญในน้ำต้มสุกพืช/พืช/ผลิตภัณฑ์จากพืช ตรวจนับจำนวนเซลล์เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 21 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหารดัดแปลง MSP-medium (Molass Soybean Potato-medium)

อัตราส่วน มันฝรั่ง:กากน้ำตาล:กากถั่ว เหลือง ^{2/}	ปริมาณเชื้อ log (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}					
	เวลา (ชม.)					
	0	6	12	18	24	30
100:10:10	1x10 ⁸	3x10 ⁹ c	3x10 ¹⁰ d	2.3x10 ¹³ d	1.8x10 ¹⁹ a	1.7x10 ¹⁸ c
150:10:10	1x10 ⁸	3x10 ⁹ c	2.8x10 ¹⁰ d	3x10 ¹⁵ c	2x10 ²⁰ b	3x10 ¹⁹ bc
200:10:10	1x10 ⁸	3x10 ¹⁰ b	2.4x10 ¹¹ c	2.8x10 ¹⁸ b	3x10 ²¹ c	3x10 ²⁰ b
250:10:10	1x10 ⁸	3x10 ¹¹ a	3x10 ¹³ a	3x10 ¹⁹ a	3x10 ²² c	3x10 ²² a
300:10:10	1x10 ⁸	3x10 ¹¹ a	3x10 ¹³ a	3x10 ¹⁹ ab	3x10 ²² d	1.6x10 ²² a
Nutrient Both	1x10 ⁸ⁿ	3x10 ¹¹ a	3x10 ¹³ a	1.9x10 ²⁰ a	3x10 ²² a	3x10 ²² a
MS-medium	1x10 ⁸	3x10 ¹⁰ b	2.7x10 ¹² b	2.3x10 ¹⁷ b	3x10 ²⁰ c	2.4x10 ¹⁹ b
%CV	0	31.12	32.34	29.77	31.41	34.25

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ(P= 0.05) Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 13

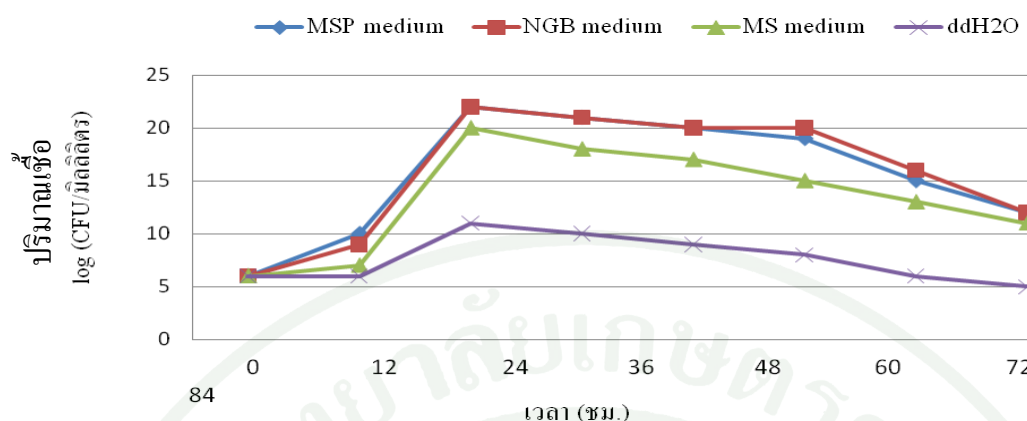
^{2/} = อัตราส่วนของอาหาร MSP-medium ที่ประกอบด้วยมันฝรั่งต้มแล้วกรอง:กากน้ำตาล: กากถั่วเหลืองต้มแล้วกรอง ในน้ำ 1 ลิตร เพื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์XA6

ตารางที่ 22 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในสูตรอาหาร MSP-medium ทางด้านความเป็นกรดต่าง และความเร็วรอบ/นาที่ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ปัจจัยควบคุม ^{2/}		ประชากรเชื้อ log (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}
		เวลา (24 ชม.)
กรด-ต่าง	5	3×10^{16} c
	6	3×10^{17} b
	7	2.4×10^{20} a
	8	3×10^{19} b
	9	3×10^{18} c
	10	3×10^{16} e
%CV		27.85
ความเร็วรอบ/นาที่	100	3×10^{17} f
	110	3×10^{19} e
	120	3×10^{22} d
	130	3×10^{23} c
	140	3×10^{23} b
	150	3×10^{24} a
%CV		30.25

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)

^{2/} = อาหาร MSP-medium ที่มีการปัจจัยทางด้านค่าความเป็นกรด-ต่างเริ่มต้น และความเร็วรอบ/นาที่ในการเขย่าเขื่อนาน 24 ชั่วโมง และตรวจสอบนับปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 21 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MSP medium , NGA และ MS medium ที่อายุ 0-72 ชั่วโมง

4.3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6

4.3.1 การคัดเลือกชนิดสารพา สารเสริมประสิทธิภาพ และอัตราส่วนที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกชนิดสารพา สารเสริมประสิทธิภาพ และการใช้อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมต่อความมีชีวิตรอด และประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ XA6 พบว่าสารพาที่ดีที่สุดในการคงความมีชีวิตรอดของเชื้อ คือ ประกอบด้วย talcum+calcium อัตราส่วน 2:1 โดยพบว่าสารพาที่หดยด้วย cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1×10^{15} CFU/มิลลิลิตร) ต่อสารพา 90 กรัม ตรวจสอบความสามารถในการคงความมีชีวิตรอดในสารพาที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง (ถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อและซีลถุงให้สนิท) ความสามารถในการละลายน้ำ ผลการทดลองพบว่าสารพาที่มีส่วนผสมของ talcum+calcium อัตรา 2:1 เป็นส่วนผสมสารพาที่ดีที่สุด โดยให้ผลการทดสอบในการเก็บรักษานาน 6 เดือน เท่ากับ 3×10^{13} CFU/มิลลิลิตร ให้ค่าการละลายน้ำก่อนปั่นใบข้าวเท่ากับ ระดับที่ 1 ดีที่สุด สารพาละลายน้ำทันที ภายในเวลา 1-5 นาที (ตารางที่ 23)

ส่วนการทดสอบสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 โดยการใช้สารพาจากส่วนผสมที่ดีที่สุดคือ talcum+calcium อัตราส่วน 2:1 ผสมกับอัตราส่วน

ของสารเสริมประสิทธิภาพ และประเมินผลทางด้านการเจริญเติบโตกล้าข้าวเมื่อข้าวอายุ 45 วันหลังปลูก ทางด้านความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด การควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว (การลดโรค และระดับความรุนแรงของโรค) ความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์XA6 ผลการทดลองพบว่า สารพา : สารเสริมประสิทธิภาพ คือ talcum+calcium:CMC:glucose อัตรา 55:25:8:2 ที่มีการใส่เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์XA6 10 มิลลิลิตร เป็นส่วนผสมที่ดีที่สุดสามารถส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตทางด้านการสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดเท่ากับ 35 23 39 เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ ลดอัตราการเกิดโรคได้ดีที่สุด เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงโรคระดับ 1 (เกิดโรคน้อยที่สุด) และคงความมีชีวิตรอดของเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงที่สุดเท่ากับ 3×10^{13} CFU/มิลลิลิตร ที่อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นาน 12 เดือน (ตารางที่ 24 และภาพที่ 22)

ตารางที่ 23 ประสิทธิภาพสารพาแต่ละชนิดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6

	สารพา	ความมีชีวิตรอด (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}	การละลายน้ำ ^{2/}
1	Talcum	3×10^{12} b	1
2	Calcium	3×10^{11} c	2
3	Dolomite	3×10^{11} c	4
4	Talcum+calcium 1:1	3×10^{13} a	2
5	Talcum+calcium 2:1	3×10^{13} a	1
6	Talcum+calcium 1:2	3×10^{12} b	2
7	Talcum+ Dolomite 1:1	3×10^{12} b	3
8	Talcum+ Dolomite 2:1	3×10^{12} b	3
9	Talcum+ Dolomite 1:2	3×10^{11} c	4
10	Calcium+ Dolomite 1:1	3×10^{11} c	4
11	Calcium+ Dolomite 2:1	3×10^{10} d	5
12	Calcium+ Dolomite 1:2	3×10^{10} d	4
%CV		28.55	0

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version

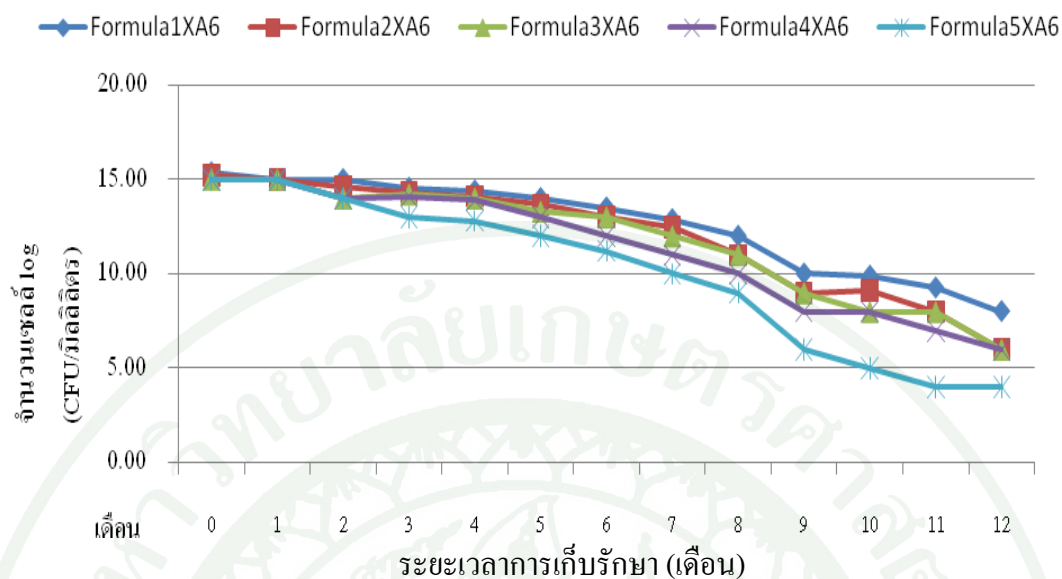
13(P=0.05) , ^{2/} การประเมินการละลายน้ำโดยใช้เกณฑ์ในรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 4.3.2

ตารางที่ 24 ประสิทธิภาพสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพแต่ละชนิดในการผสมสูตรต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว และการควบคุมโรคในสภาพเรือนทดลอง

สารพา+สารเสริมประสิทธิภาพ	อัตราการเจริญเติบโตของข้าว ^{1/}			การควบคุมโรค ^{1/}		ชีวิตรอดเซลล์เชื้อ (CFU/มิลลิลิตร) ^{1/}
	ความสูง ต้น ^{2/}	ความยาว ราก ^{2/}	น้ำหนักสด ^{2/}	% การลด โรค ^{2/}	ความรุนแรง โรค ^{2/}	
1 talcum, calcium, CMC, และน้ำตาลกลูโคส (60:30:8:2)	35a	23a	39a	72a	1	3X10 ¹³ a
2 talcum, calcium และ CMC (60 : 38 : 2)	31b	20b	35b	65b	2	3X10 ¹² b
3 talcum, calcium และน้ำตาลกลูโคส (60 : 38 : 2)	32b	20b	34b	64b	2	3X10 ¹³ a
4 talcum, calcium, CMC และกากน้ำตาล (60 : 38 : 2)	27c	19b	31c	61c	2	3X10 ¹¹ c
5 talcum, calcium และกากน้ำตาล (60 : 38 : 2)	24d	17c	30c	57d	3	3X10 ¹⁰ d
%CV	18.54	23.25	25.40	31.12	0	29.25

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)

^{2/} = ประเมินอัตราการเจริญเติบโตข้าวที่อายุ 45 วันหลังปลูก ความรุนแรงโรค การลดลงของโรคดังตามอุปกรณ์และวิธีการข้อ 4.4



ภาพที่ 22 อัตราการคงความมีชีวิตรอดของเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังในสูตรสำเร็จชนิดต่าง ๆ ที่อายุ 0-12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังXA6 ชนิดผงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวในสภาพเรือนทดลอง

จากการนำสูตรที่ดีที่สุด คือ Formula1 talcum, calcium, CMC, และน้ำตาลกลูโคส (60:30:8:2) มาทดสอบในสภาพเรือนทดลองโดยการคลุกเมล็ดข้าวก่อนปลูกและพ่นใบ 6 ครั้ง ที่อายุ 7 14 30 45 60 และ 75 วันหลังปลูก (ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105) เปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จของภาควิชาโรคพืช ISR-B และสารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประเมินผลทางด้านการเจริญเติบโต และการลดการเกิดโรค และความรุนแรงของโรค ผลการทดลองพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านการสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสดเท่าได้ดีที่สุดเท่ากับ 35.08 23.54 39.81 (เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม) แตกต่างในทางสถิติกับการใช้สูตร ISR-B เท่ากับ 33.32 22.50 32 (เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม) และสูงกว่าการใช้สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถลดการเกิดโรคได้ 72 69 65 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 ประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์XA6 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี	การเจริญเติบโต ^{1/}			การควบคุมโรคขอบใบแห้ง ^{1/}	
	ความสูงต้น ^{2/}	ความยาวราก ^{2/}	น้ำหนักสด ^{2/}	% การลดโรค ^{2/}	ระดับความรุนแรงโรค ^{2/}
1 cell suspension XA6	33.85b	22.43a	33.25b	70	2
1 Formula1 XA6	35.08a	23.54a	39.81a	72	2
2 ISR-B	33.32b	22.5a	32b	69	2
3 copper hydroxide	31c	17.5b	26.5c	65	3
4 sterile water	27.5d	16b	22.5d	0	4
%CV	24.35	29.51	31.24	0	0

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ข้อมูล และค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13 (P=0.05)

^{2/} = อัตราการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ยาวราก น้ำหนักสด ที่อายุข้าว 45 วันหลังปลูก ความรุนแรงโรค การลดลงของโรครายละเอียดตามวิธีการข้อ4.4

5. ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในสภาพไร่นา

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 สูตรที่ 1 Formula1 XA6 (talcum+calcium+CMC+glucose อัตราส่วน 60:30:8:2) ที่เก็บรักษานาน 6 เดือน ด้วยการคลุกเมล็ดข้าวอัตรา 1 กรัมต่อเมล็ดข้าว 1 กิโลกรัม และพ่นใบ 6 (7 15 30 45 60 และ 70 วัน หลังปลูก) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สูตรสำเร็จ ISR-B (สูตรพัฒนาของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี copper hydroxide และ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ประเมินผลด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าว (ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด อัตราการแตกกอ) ผลผลิตต่อไร่ อัตราการลดโรค และการกระตุ้นการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่มีการใช้ Formula1 XA6 มีประสิทธิภาพดีที่สุด ($P=0.05$) แตกต่างทางสถิติโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และอัตราการแตกกอ เท่ากับ 57.71 28.43 40.5 (เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม) และ 4.3 ต้นต่อกอ รองลงมาคือการใช้สูตร ISR-B เท่ากับ 57.86 28.2 38.9 (เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม) และ 3.3 ต้นต่อกอ และสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เท่ากับ 44.5 22.63 34.2 (เซนติเมตร/เซนติเมตร/กรัม) และ 2 ต้นต่อกอ ตามลำดับ โดยสูตรผลิตภัณฑ์ Formula1 XA6 ดังกล่าวสามารถเพิ่มผลผลิตข้าวต่อไร่สูงที่สุด เท่ากับ 67.74 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สูตร ISR-B เท่ากับ 53.79 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 26) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถลดอัตราการเกิดโรคลงได้ดีที่สุดแตกต่างในทางสถิติ ($P=0.05$) เท่ากับ 61 56 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 26 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ XA6 ชนิดผง ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และอัตราการแตกกอข้าว ที่อายุ 45 วัน และผลผลิตในระดับไร่นา

กรรมวิธี	อัตราการเจริญเติบโต ^{1/}				ผลผลิต ^{2/} (กก./ไร่)	การเพิ่มผลผลิต (%)
	ความสูงต้น ^{2/} (ซม.)	ความยาวราก ^{2/} (ซม.)	น้ำหนักสด ^{2/} (กรัม)	อัตราแตกกอ ^{2/} (ต้น/กอ)		
1. Formula1 XA6	59.71a	28.43a	40.5a	4.3a	693.33a	67.74a
2. ISR-B	57.86b	28.2a	38.9b	3.3b	635.67b	53.79b
3. Copper hydroxide	52.22c	25.87b	36.65c	3b	585d	41.53c
4. sterile water	44.5d	22.63c	34.2d	2c	413.33e	0d
%CV	23.22	21.57	27.50	22.25	32.35	32.75

^{1/} ตัวอักษรในแนวดิ่งที่เหมือนกันคือ ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 13 ที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05)

^{2/} ประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าว โดยการคลุกเมล็ดและพ่นใบ 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 70 วันหลังปลูก) และปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งเมื่อ 31 วันหลังปลูก ประเมินผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด อัตราการแตกกอ ที่อายุ 45 วันหลังปลูก และผลผลิตข้าว

ตารางที่ 27 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในระดับไร่นา

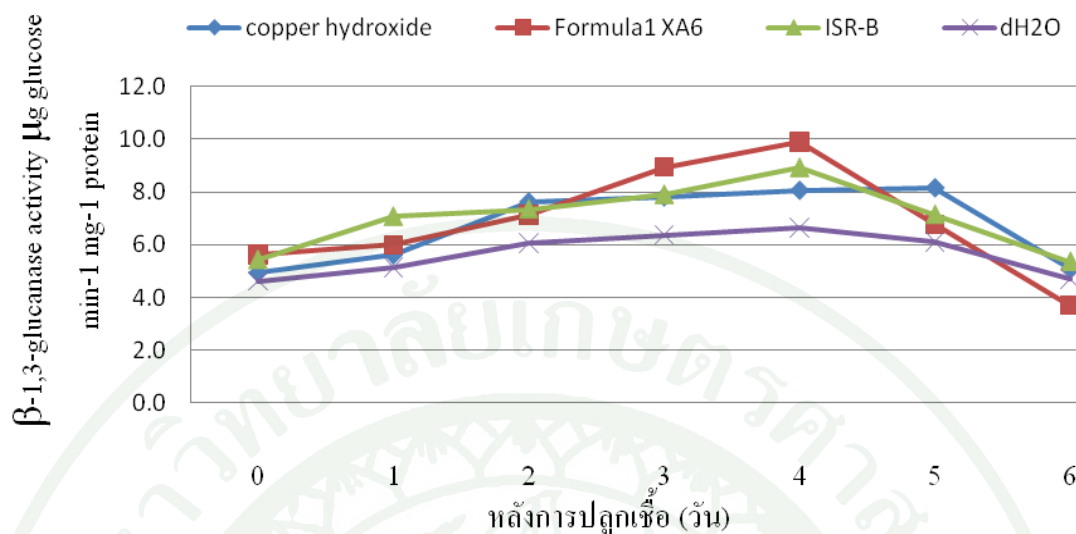
กรรมวิธี	การควบคุมโรคขอบใบแห้ง ^{1/}		ระดับความรุนแรงโรค ^{2/}
	อัตราการเกิดโรค ^{2/}	อัตราการลดลงของโรค ^{2/}	
1. Formula1 XA6	39a	61a	1
2. ISR-B	44b	56b	1
3. Copper hydroxide	48d	52c	2
4. sterile water	100e	0d	3
%CV	17.97	48.22	0

^{1/} ตัวอักษรในแนวดิ่งที่เหมือนกันคือไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 13 ที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05)

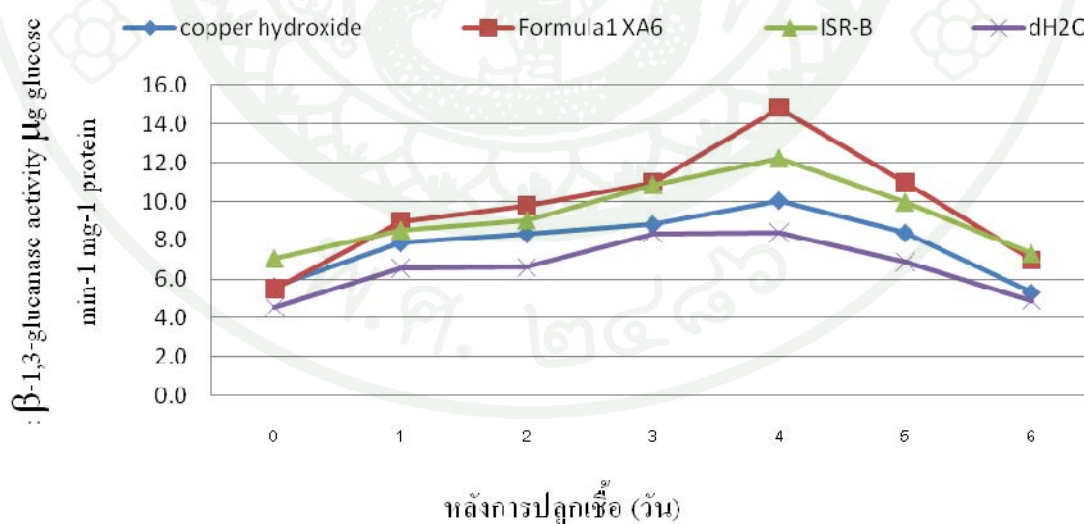
^{2/} ประเมินประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยการคลุกเมล็ดและพ่นใบ 6 ครั้ง (7 15 30 45 60 และ 70 วันหลังปลูก) และปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งเมื่อ 31 วันหลังปลูก และประเมินอัตราการเกิดโรค อัตราการลดโรค และระดับความรุนแรงโรค ที่อายุ 7 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค

5.2 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ XA6 ชนิดผง ทางด้านการกระตุ้นให้พืชสร้างและสะสมปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในสภาพไร่

การตรวจสอบปริมาณการสร้างและสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในข้าวที่ได้รับ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยการคลุกเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อัตรา 1 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม และพ่นใบอัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ด้วยสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดผงสูตร Formula1 XA6 และพ่นใบ 3 ครั้ง (ที่อายุ 7 14 และ 30 วันหลังปลูก) ซึ่งประกอบด้วย 2 ชุดการ ทดลองคือ ชุดที่ 1 ปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่อายุ 31 วันหลังปลูก เปรียบเทียบกับการ ใช้สูตรแบคทีเรีย ISR-B สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และชุดที่ 2 ไม่มีการปลูก เชื้อสาเหตุโรค ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีการใช้สูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 สูตร Formula1XA6 คลุกเมล็ดข้าวและพ่นใบให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุด และมีการสะสม สูงที่สุดในวันที่ 4 หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค เท่ากับ $14.82 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้สูตร ISR-B มีกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 4 เท่ากับ $12.22 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี copper hydroxide ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 4 เท่ากับ $10.03 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ โดยให้ค่าสูงกว่าการใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ให้ค่า ปฏิกิริยาเอนไซม์เท่ากับ $8.40 \mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 23 และภาพที่ 24) โดยสามารถลดอัตราการเกิดโรคลงได้ เท่ากับ 61 56 52 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการ สร้างและสะสมปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่เพิ่มขึ้นและสูงที่สุดในวันที่ 4 สอดคล้องกับ การเกิดโรค และการลดการเกิดโรค ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถลดการเกิดโรคได้สูงที่สุดอย่างชัดเจน ทั้งกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าว (ตารางที่ 28)



ภาพที่ 23 ปริมาณสะสมและปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการใช้สูตร Formula1 XA6 คลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง ประเมินผลที่ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วันหลังปลูกเชื้อ (ไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค)



ภาพที่ 24 ปริมาณสะสมและปฏิกิริยาเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 วันหลังปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการใช้สูตร Formula1 XA6 คลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง และปลูกเชื้อโรคที่อายุ 31 วัน ประเมินผลที่ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ตารางที่ 28 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวในการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในระดับไรนา

กรรมวิธี	ปลูกเชื้อสาเหตุโรค ^{1/}			การสร้างและสะสม เอนไซม์ β -1,3-glucanase ^{3/}	ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค ^{1/}			การสร้างและสะสม เอนไซม์ β -1,3-glucanase ^{3/}
	อัตราเกิดโรค (%) ^{2/}	อัตราการลดโรค (%) ^{2/}	ระดับความ รุนแรง ^{2/}		อัตราเกิดโรค (%) ^{2/}	อัตราการ โรค (%) ^{2/}	ระดับความ รุนแรง ^{2/}	
1. Formula 1 XA6	39a	61a	1	14.82a	38a	62a	1	9.91a
2. ISR-B	46b	56b	1	12.22b	41a	59a	1	8.93b
3. Copper hydroxide	48b	52b	2	10.03c	45b	55b	2	8.12c
4. sterile water	100c	0c	2	8.40d	80c	20c	2	6.74d
%CV	39.45	40.25	0	31.22	37.51	38.67	0	29.68

^{1/} = ตัวอักษรในแนวดิ่งที่เหมือนกันคือไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 13 ที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05)

^{2/} = ประเมินการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยการคลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง (7 15 และ 30 วันหลังปลูก) และปลูกเชื้อสาเหตุโรคอายุ 31 วันหลังปลูก - ทางด้านอัตราการเกิดโรค อัตราการลดโรค และระดับความรุนแรงโรค ที่อายุ 7 วันหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค

^{3/} = ปริมาณการสร้างและสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase (μ g glucose min⁻¹ mg⁻¹ protein) ในการคลุกเมล็ดและพ่นใบ 3 ครั้ง (7 15 และ 30 วันหลังปลูก) ที่เพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

วิจารณ์

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากของประเทศไทย ซึ่งการผลิตข้าวนั้นยังประสบปัญหาด้านโรคขอบใบแห้งของข้าว ที่เกิดจาก *X. oryzae* pv. *oryzae* ปัจจุบันพบว่ากำลังระบาดมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในแหล่งที่มีการผลิตข้าวอย่างต่อเนื่องและปลูกข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ โดยโรคนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะแต่ที่สำคัญคือระยะที่ข้าวแตกกอและกำลังออกรวง และจะระบาดรุนแรงมากช่วงที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมของโรคคือในช่วงฤดูฝน มีความชื้นสูง เมื่อฝนตกลมพัดแรง ใบข้าวมีการเสียดสีกัน ทำให้เชื้อเข้าทำลายได้ง่ายในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวเช่น ข้าวดอกมะลิ105 กข6 (Ezuka and Kaku, 2000)

ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งจากปลูกข้าวที่สำคัญในประเทศไทยรวม 9 จังหวัด นำมาแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม ลักษณะทางชีวเคมีต่างๆ และการทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรค โดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา HR และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวบนข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ข้าวดอกมะลิ105) และยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็น *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวนทั้งสิ้น 230 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้ทั้งหมด และสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกรมวิชาการ 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TB0037 และเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์ TS8208 และเชื้อ *A. avenae* subsp. *avenae* สายพันธุ์ Aaa9 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของไพรเมอร์ในการจำแนกเชื้อต่างกลุ่ม

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าเป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองซีด ขอบเรียบ เป็นมันวาว บนอาหาร (NGA) ลักษณะของเชื้อจะเป็นท่อนสั้น (Wakimoto, 1955) ขนาดจีโนมของเชื้อเท่ากับ 4941439 bp ลักษณะเป็นวงกลม (Lee *et al.*, 2005) โดยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถเจริญในช่วงพีเอส ประมาณ 4.0-8.8 แต่เจริญได้ดีในช่วง 6.0-7.0 อุณหภูมิ ตั้งแต่ 5-40 องศาเซลเซียส และเจริญดีที่สุดที่ 26-30 องศาเซลเซียส (Tagami and Mizukami, 1962) เชื้อสามารถสร้างและปลดปล่อยสารพิษซึ่งสามารถทำลายต้นข้าวระยะกล้าได้หลายชนิด เช่น trans-3-methylthioacrylic acid, tiglic acid, phenyl acetic acid, isovaleric acid, succinic acid และ fumaric acid (Noda *et al.*, 2001)

การศึกษาเชื้อ *X. oryza* pv. *oryzae* ทางชีวเคมี พบว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ไม่เกิดปฏิกิริยา catalase ไม่สามารถย่อยแป้งได้ ในการทดสอบ starch hydrolysis เกิดปฏิกิริยา citrate utilization โดยเปลี่ยนอาหารทดสอบสีเขียวเป็นสีน้ำเงินชัดเจน การทดสอบความสามารถในการย่อยมันฝรั่งพบว่าสามารถย่อยมันฝรั่งได้ปานกลาง ในทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ไม่เกิดปฏิกิริยา และการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล พบว่า สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose, fructose และ gelatose ได้แต่ไม่สามารถผลิตได้ในน้ำตาล ribose, maltose และ lactose โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในหนังสือ Bergey manual of Determinative Bacteriology 9th edition (Holt *et al.*, 2007)

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและการจัดกลุ่มเชื้อ พบว่าเชื้อทั้งสิ้น 231 สายพันธุ์ นั้นนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ 105) ที่อายุ 45 วัน ที่ความเข้มข้นเท่ากันที่ 0.2 O.D. 600 นาโนเมตร (Shanti *et al.*, 2001) ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการปลูกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดี ซึ่งจะต้องใช้ใบข้าวที่มีอายุเท่ากัน ขนาดใกล้เคียงกัน ในทุกใบที่ทดสอบ และต้องทำพร้อมกันทั้ง 231 สายพันธุ์ เพื่อให้มีสภาพแวดล้อม และปัจจัยที่เกิดโรคเหมือนกัน โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซ็นต์ และวัดขนาดความยาวแผลที่อายุ 14 วันหลังปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด ก่อให้เกิดโรคโดยแสดงอาการเร็วที่สุดที่ 3 วันหลังการปลูกเชื้อ การจัดกลุ่มเชื้อตามลักษณะทางฟีโนไทป์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 4 กลุ่ม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ (IRRI, 1980) คือ ระดับ A กลุ่มอ่อนแอ ความยาวแผลตั้งแต่ 0-1 เซนติเมตร ไม่พบบาดแผลหรือบาดแผลขยายเพียงเล็กน้อย พื้นที่ใบถูกทำลาย 1-5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ จำนวน 53 สายพันธุ์ ระดับ B กลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ ความยาวแผลตั้งแต่ 1.1-3 เซนติเมตร พื้นที่ใบถูกทำลาย 6-12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ จำนวน 28 สายพันธุ์ ระดับ C กลุ่มค่อนข้างรุนแรง ความยาวแผลตั้งแต่ 4-6 เซนติเมตร พื้นที่ใบถูกทำลาย 13-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ จำนวน 120 สายพันธุ์ และระดับ D กลุ่มรุนแรง ความยาวแผลตั้งแต่ 7-9 เซนติเมตรขึ้นไป พื้นที่ใบถูกทำลาย 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบขึ้นไป จำนวน 30 สายพันธุ์ จากการจัดกลุ่มเชื้อตามลักษณะความสามารถในการเกิดโรค และความรุนแรงในการเกิดโรคจะพบว่า โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ค่อนข้างรุนแรงสูงซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่รุนแรงในการเกิดโรค เป็นการพยากรณ์ได้ว่าในสภาพไร้วีรจะมี ความรุนแรงของโรคระบาดมาก และประกอบกับในช่วงที่เก็บตัวอย่างโรคนั้นพบว่ามีโรคระบาดอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการควบคุมโรคอย่างจริงจัง

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อกับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้เทคนิค rep-PCR พบว่า สามารถผลิตแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อได้ 20, 22 และ 14 ในไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP ตามลำดับ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่สำคัญและ/หรือชัดเจนจากการตรวจสอบว่ามีหรือไม่มีที่นำมาใช้วิเคราะห์ dendrogram คือ 16 19 และ 8 แถบ จากไพรเมอร์ทั้ง 3 ตามลำดับ คิดเป็น 81.8, 86.36 และ 51.14 เปอร์เซ็นต์โดยแต่ละไพรเมอร์ มีขนาดตั้งแต่ 100 bp ถึง 3000 bp ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อกับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้เทคนิค rep-PCR พบว่า 2 ใน 3 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ ERIC และ BOX สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryza* pv. *oryzae* ทั้ง 230 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เปรียบเทียบกับออกจากสายพันธุ์ใกล้เคียง คือ *X. oryzae* pv. *oryzicola* และสายพันธุ์ต่างกลุ่มออกอย่างชัดเจน และแบ่งกลุ่มเชื้อทั้ง 231 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ที่มีประชากรเชื้อในกลุ่มรุนแรง (กลุ่มรุนแรง (กลุ่ม D : virulence) และค่อนข้างรุนแรง (กลุ่ม C : weakly virulence) คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ ERIC และ 86.67 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ BOX และพบว่าเชื้อในกลุ่ม 1 เป็นลักษณะที่มีอยู่ในเชื้อสายพันธุ์ที่มีลักษณะ Phenotype ในการก่อให้เกิดโรคน้อย (กลุ่ม A : non aggressive และกลุ่ม B : weakly aggressive) มีความเหมือนกัน 95.72 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ ERIC และ 68.85 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ BOX ซึ่งไพรเมอร์ BOX จะมีการกระจายตัวของประชากรเชื้อสายพันธุ์อ่อนแ่ปะปนกับสายพันธุ์รุนแรงสูงกว่าในไพรเมอร์ ERIC โดยสายพันธุ์ต่างกลุ่มที่ปะปนอยู่ข้างนั้นเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าเป็นส่วนน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ปรากฏ ตลอดจนทำให้เชื้อมีการพัฒนาที่เปลี่ยนไปหรือเกิดการกลายพันธุ์ โดยสอดคล้องกับ (Ochiai *et al.*, 2000) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุ์เชื้อหรือโครงสร้างทาง pathotype ในประชากรเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzicola* นั้นเป็นผลมาจากปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ การปรับตัวให้ตอบสนองต่อระบบการเกษตรที่เปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อย่างรวดเร็วและแปรปรวนมากขึ้น รวมถึงการเคลื่อนย้ายแหล่งที่อยู่ของเชื้อไปยังพื้นที่อื่น ๆ ด้วย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้งสาม ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่า 2 ใน 3 ไพรเมอร์สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้ และสามารถแยกเชื้อต่างกลุ่มออกได้อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีของเทคนิคนี้ได้ และสามารถนำมาเป็นทางเลือกในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อได้ดี และยังพบว่าไพรเมอร์ BOX สามารถปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอบริเวณ 495

bp ได้ในทุกสายพันธุ์เชื้อทั้ง 230 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นบริเวณจำเพาะต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคได้

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อกับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้เทคนิค rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ REP พบว่า ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryza* pv. *oryzicola* ออกจากเชื้อ *X. oryza* pv. *oryzae* ทั้ง 231 สายพันธุ์ โดยสามารถแยกได้เฉพาะสายพันธุ์เชื้อ Aaa9 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต่างกลุ่ม ซึ่งสามารถบอกได้ว่าไพรเมอร์ REP นั้นมีประสิทธิภาพน้อยในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *X. oryza* pv. *oryzae* ในครั้งนี้ อาจเนื่องจากไพรเมอร์ REP นั้นเป็นส่วนที่ถูกออกแบบมาเป็นส่วนของ palindromic unit ที่มีขนาดเล็ก และอาจเป็นเพราะความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่มีต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อกับความแหล่งที่มาของเชื้อ โดยใช้เทคนิค rep-PCR พบว่า เชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อในทุกไพรเมอร์ที่ทดสอบทั้งไพรเมอร์ BOX ERIC และ REP เนื่องจากพบว่าเชื้อกระจายในทุกกลุ่มที่จำแนกปะปนกันแสดงว่าพื้นที่ต่างๆ สภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อระดับความรุนแรงในการเกิดโรค

จากการศึกษาประชากรเชื้อในกลุ่มรุนแรงและกลุ่มอ่อนแอ พบว่า ไพรเมอร์ ERIC ปรากฏแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่ชัดเจน 6 แถบบริเวณตำแหน่งที่ 580 680 780 900 1200 และ 1300 bp ในกลุ่มที่ 1 โดยไม่ปรากฏในกลุ่มที่ 2 และปรากฏแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่ชัดเจน 5 แถบบริเวณตำแหน่งที่ 300 650 800 950 และ 1000 bp โดยไม่พบในกลุ่มที่ 1 ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่ายีนบริเวณนี้อาจเป็นยีนที่ควบคุมก่อให้เกิดอ่อนแอ หรือความรุนแรงในการเกิดโรคหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของความรุนแรงได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ BOX ที่ทั้งสองกลุ่มมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 แถบชัดเจนบริเวณตำแหน่งที่ 200, 750, 800 และ 1100 bp ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่ 2 (กลุ่มรุนแรง) และ 5 แถบ บริเวณตำแหน่งที่ 300 400 600 780 และ 1000 bp ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่ 1 (สายพันธุ์อ่อนแอ) เท่านั้น ซึ่งการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะนี้สามารถที่จะนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่ใช้เป็นตัวตรวจติดตามสายพันธุ์เชื้อที่รุนแรงและอ่อนแอได้

ไพรเมอร์ BOX นั้นกลุ่มรุนแรงจะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 4 แถบ และในกลุ่มอ่อนแอจะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 5 แถบ และในไพรเมอร์ ERIC จะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะในสายพันธุ์รุนแรง 4 แถบ และในสายพันธุ์อ่อนแอจะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 6 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบทั้งสองไพรเมอร์ คือ BOX และ ERIC พบว่าเชื้อในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคสายพันธุ์รุนแรงในทั้งสองไพรเมอร์ปรากฏแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 1 แถบตรงบริเวณ 800 bp โดยไม่พบสายพันธุ์อ่อนแอ และปรากฏแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 1 แถบตรงบริเวณ 780 bp เฉพาะในสายพันธุ์อ่อนแอเท่านั้น ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการที่ปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบที่เป็นแถบเฉพาะนี้อาจเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์บริเวณหนึ่งของลำดับเบสในจีโนม ซึ่งเชื่อจะสามารถปรับเปลี่ยนพันธุกรรมจากสายพันธุ์รุนแรงเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ และจากสายพันธุ์อ่อนแอกลายเป็นสายพันธุ์รุนแรงขึ้นได้ ซึ่งถ้าเป็นเช่นนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีการในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ และเป็นสิ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์พืช และนักโรคพืชจะต้องให้ความสนใจ และระมัดระวังอย่างสูง เพื่อไม่ให้เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้น้อยกลับกลายมาก่อให้เกิดโรครุนแรงขึ้นได้ (Gonzales et al., 2002)

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวพบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ โดยส่วนใหญ่นั้นจะมาจากดินบริเวณรอบรากพืช โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากนั้นมีความหลากหลายของชนิดและปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบและภายในลำต้น และพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้แตกต่างกันทั้งทางด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการยับยั้งเชื้อโรคขอบใบแห้งดีที่สุด 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ XA6 และ D10 ที่แยกมาจากดินบริเวณรอบรากข้าว โดยทั่วไปจะมีความสามารถในการปกป้องเชื้อโรคทางดิน และยังช่วยให้รากพืชดูดซึมธาตุอาหารได้ดีมากขึ้น ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งชนิดและปริมาณพบว่าสามารถยืนยันถึงนิเวศวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันได้อย่างดี จากการคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ และการจำแนกกลุ่มตามลักษณะโคโลนี สี ขนาด ของเชื้อที่พบในเบื้องต้น

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวสายพันธุ์ XA6 จากดินในแปลงนาเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรี นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว และส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ เรือนทดลองและในสภาพไร่ โดยทางด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโต ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่สายพันธุ์ XA6 พบว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดในด้านการยับยั้งเชื้อ

สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวพบว่ามามีบริเวณยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว เท่ากับ 0.87 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ KPS46 (สายพันธุ์เปรียบเทียบ) โดยให้ค่าเท่ากับ 0.65 แตกต่างในทางสถิติกับการใช้สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อซึ่งให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 0.60 และ 0 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกจากดินในแปลงนา ทำให้เชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถปรับตัวได้ดี เจริญเติบโต และแสดงศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ดีในการทดสอบในสภาพไร่ ซึ่งโดยปกติเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากพืชต่างชนิดกันจะสามารถแสดงศักยภาพดีเด่นต่อการควบคุมโรคของพืชชนิดนั้น ๆ เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เชื้อจะปรับตัวได้ดีและการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียเจ้าถิ่น

การคัดเบื้องต้นพบว่าเชื้อสายพันธุ์ XA6 มีประสิทธิภาพที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค และการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อาศัยตามบริเวณรากและดินรอบรากของพืชที่มีความสามารถในการอยู่อาศัยร่วมกับพืชและไม่เป็นโทษกับพืช (symbiosis) มาเพิ่มปริมาณและใส่ลงไปในดินปลูกเพื่อส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารของพืช ตลอดจนสามารถกระตุ้นให้พืชผลิตสารต่าง ๆ ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ รวมทั้งมีสารบางชนิดที่เชื้อแบคทีเรียผลิตกระตุ้นให้พืชเติบโตแข็งแรงจัดเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ซึ่งเรียกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Vancura, 1987) ซึ่งการใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปในดินและต้นข้าวจะเป็นการช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์และแปรสภาพธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่พืชจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น การช่วยสลายสารประกอบฟอสเฟตโดยทำปฏิกิริยากับไฮดรอกไซด์ของเหล็ก อะลูมิเนียม และแมกนีเซียมได้เป็นเกลือของธาตุเหล่านั้นป้องกันการตกตะกอนกับฟอสฟอรัสทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *B. subtilis* คลุกเมล็ดก่อนปลูกจะมีประโยชน์ในการช่วยทำความสะอาดเมล็ดด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งเชื้อจะสามารถปกป้องเมล็ด ช่วยในการงอก และยังสามารถขยายพันธุ์ในดิน ดังนั้นเมื่อเชื้องอกและเจริญเติบโตจะช่วยปกป้องระบบรากในการต่อสู้กับเชื้อโรคที่มาจากดิน (Dakora and Phillips, 2002) จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. มีความสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ สามารถแก้ไขปัญหาดินต่าง และช่วยในการเพิ่มปุ๋ยฟอสฟอรัสในดิน และสามารถใช้ได้ในระยะยาวโดยไม่ต้องคำนึงถึงการตกค้างของโลหะหนักอีกด้วย (Chen et al., 2006) ซึ่งการขาดธาตุฟอสฟอรัสในดินน่าจะมีผลกระทบโดยตรงต่อข้าวโดยจะไปมีผลกระทบต่อการออกดอก จำนวนดอก เมล็ดลดน้อยลง (Barry and miller, 1989) การใช้เชื้อ *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas* ใน

การละลายฟอสเฟตพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของข้าวทั้งในสภาพเรือนทดลอง และในสภาพไร่ (Trivedi *et al.*, 2003) นอกจากนี้ Yasmin และคณะ (2004) ได้ทดสอบแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Azospirillum* sp. กับดินข้าวพบว่าสามารถเพิ่มชีวมวล (biomass) ของรากและรวมไปถึงปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดในข้าวได้

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากข้าว พบว่ามีประสิทธิภาพดีทั้งในด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยจากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นทางด้านชีวเคมีและการทดสอบด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *B. subtilis* ซึ่งโดยปกติเชื้อ *B. subtilis* จะถูกพิจารณาว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรคในคน นอกจากนี้เชื้อ *B. subtilis* ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการทั้งทางด้านการอาหาร ด้านอุตสาหกรรม และในด้านการเกษตร ซึ่งพบว่าถูกนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเชื้อในกลุ่ม *B. subtilis* นั้นสามารถผลิตสาร antibiotic substances ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นพวก dipeptides หรือ cyclic peptides (Hamon and Benth, 2001) และมีประสิทธิภาพในด้านการผลิตสาร volatile extra-cellular metabolites ซึ่งจะมีปฏิกิริยาโดยตรงต่อเชื้อราสาเหตุโรค ตลอดจนสามารถผลิตสารในกลุ่ม hydrolytic enzyme ได้แก่ cellulose chitinase และ β -1,3-glucanase (Marten *et al.*, 2002) การยับยั้งด้านทานโรคพืช และสอดคล้องกับ Mayer. (2000) รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายวิธี เช่น ช่วยตรึงไนโตรเจนให้กับพืช ผลิตสาร siderophores ออกมายึดจับเหล็กทำให้เชื้อสาเหตุโรคบางชนิดขาดธาตุเหล็กไม่สามารถเจริญได้ แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถสร้างสาร vitamins และ amino acids ส่งเสริมความแข็งแรงของพืชได้อีกด้วย (Vancura, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญเติบโตของพืชส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับไนโตรเจน และมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้กับพืชคือ systemic acquired resistance: SAR ให้กับพืชในการต้านทานเชื้อสาเหตุโรค ทั้งนี้เชื้อในกลุ่ม PGPR ยังอาจมีความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานแบบ ISR (Induce Systemic Resistance) (Van Loon *et al.*, 1998) และพบว่าสามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ซึ่งในการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพไร่นั้นเชื้อมีความสามารถและแสดงศักยภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวพันธุ์อ่อนแอได้ดีที่สุด และดีกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ KPS46 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกจากดินบริเวณรอบรากถั่วเหลืองและมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยมี

ผลการวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพทั้งในด้านการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยสามารถสร้างสาร antibiotic ต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด Sandra *et al.* (2000) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ATCC21332 สามารถผลิตสารในกลุ่ม Surfactant, lipopeptide biosurfactant ที่ทราบว่าสามารถช่วยลด Surface tension ของน้ำ ช่วยในการเกาะยึดติดผิวพืชได้ดี และเชื้อ *B. subtilis* ยังสามารถเจริญแข่งขันแย่งอาหาร และครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า มีความสามารถในการต่อสู้ โจมตี ต่อเชื้อเหตุโรค โดยมีการนำมากลุมเมล็ดพืชก่อนปลูก เพื่อให้ครอบครองพื้นที่ผิวรากและช่วยปกป้อง ป้องกันระบบรากให้กับพืช ให้รอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อทางดิน ทำให้พืช มีการเจริญเติบโตที่ดี นอกจากนี้ Kagale. (2004) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม PR-protein ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ฆ่าเชื้อโรค เช่นในกลุ่ม Chitinase, β -1,3-glucanase และ Peroxidase เป็นต้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพทางด้านการสร้างและเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ปกติสามารถสร้างและเพิ่มปริมาณได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และพบว่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อถูกรบกวนด้วยเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายซ้ำ เนื่องจากพืชจะมีกลไกการปกป้องตนเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคจึงพบว่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 หรือที่ 96 ชั่วโมง หลังจากที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายและจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากกลไกการทำงานของพืชนั้นจำเป็นที่จะต้องปรับสมดุลให้กลับคืนสภาพปกติให้เร็วที่สุดเพื่อไม่ให้เซลล์ถูกทำลายซึ่งพบว่าปฏิปักษ์เอนไซม์นั้นเริ่มลดลงในวันที่ 5 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 สามารถกระตุ้นให้ข้าวพันธุ์ด้านทาน(สุพรรณบุรี1) สร้างกลไกในการปกป้องตนเองได้โดยการกระตุ้นการเกิดปฏิปักษ์เอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์กลุ่มนี้ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าวในระหว่างการรุกรานของโรคที่เกิดจากเชื้อรา โดยการวัดระดับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ Chitinase พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในต้นข้าวพันธุ์ที่ด้านทานโรคมีระดับสูงกว่าในต้นข้าวพันธุ์ที่อ่อนแออย่างชัดเจนด้วยซึ่งเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชคือการกระตุ้นให้พืชผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคทั้งในลักษณะของ bacteriocin phytoalexin หรือสารประกอบ phenol และเอนไซม์ปกป้องตนเองชนิดต่างๆ ได้สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในข้าวพันธุ์ด้านทานที่สามารถชักนำความต้านทานได้สูงมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ และไปมีผลทำให้สามารถลดอัตราการเกิดโรคลงได้สูงมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอเช่นเดียวกัน (ฉวีธัญญา และ สุกฤดี, 2549; Ramamoorthy *et al.*, 2002) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์นี้ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตด้วย จากการที่เมื่อข้าวได้รับการกระตุ้น

จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและร่วมกับการพ่นทำให้ข้าวมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา สันฐานวิทยา ชีวเคมี อย่างต่อเนื่องและเป็นลำดับซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อ อวัยวะ และ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชนำไปสู่การเกิดพัฒนาการทางด้านลำต้น (vegetative stage/phase) อย่างเป็นระบบ ในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตจะมีการสร้างและสะสมสารพวกโปรตีน ไชมัน คีเอ็น เอ เอนไซม์ และสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ข้าวมีพัฒนาการทางความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสดเพิ่มสูงมากที่สุด (ลินลี, 2546) ซึ่งผลการทดลองในระดับไร่นา พบว่ามีทางความสัมพันธ์ทางการลดโรค และการสะสมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ได้ทำการทดลองในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (อ่อนแอ) พบว่าปฏิปักษ์เอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ได้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองในสภาพเรือนทดลอง โดยการสร้างและสะสมมากที่สุดในวันที่ 4 หรือที่ 96 ชั่วโมง และเริ่มลดน้อยลงในวันที่ 5 อย่างชัดเจน

จากการทดสอบแสดงว่าประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรเพิ่มปริมาณที่ประกอบด้วย มันฝรั่งต้มแล้วกรอง ให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ดีที่สุด โดยสอดคล้องกับที่มีรายงานถึงการใช้สารสกัดมันฝรั่งในการส่งเสริมให้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ATCC 21332 ผลิตสาร surfactant ได้ดีซึ่งสารนี้เป็นประโยชน์ในด้านการเป็นสารลดแรงตึงผิวที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืชช่วยให้เชื้อสามารถเกาะยึดติดผิวพืชได้ดียิ่งขึ้นเมื่อฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงไปที่ผิวพืชจะทำให้เชื้อสามารถเกาะผิวใบพืชได้ดีช่วยให้สามารถแสดงประสิทธิภาพในการปกป้องผิวใบพืชรวมทั้งทำให้เชื้อมีปริมาณมากไม่กระจายไปตกบริเวณอื่น ๆ ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างเต็มขีดความสามารถซึ่ง (Sandra *et al.*, 2000) และ (Arima *et al.*, 1968; Fox and Bala, 2000)

จากการทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จชนิดผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรที่ 1 สายพันธุ์ XA6 ที่ประกอบด้วย talcum 60%, calcium 30%, CMC 8% และน้ำตาลกลูโคส 2% พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สูงที่สุดทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดเฉลี่ย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ปัจจัยใด ๆ สูงถึง 72.98%, 25.61% และ 58.73% ตามลำดับ และสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคขอบใบแห้งได้ดีที่สุด 72% แตกต่างทางสถิติกับการใช้เชื้อสด และสารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ยังคงมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อคุณภาพหลังจากการเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน ดีที่สุดที่ 1.69×10^8 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งให้เห็นว่าจากการผลิตสูตรสำเร็จนั้น

มีการใช้สารพา คือ ทัลคัม ซึ่งมีโครงสร้างเป็น mica-like structure เป็น ชั้น T-O-T มีแรงยึดกันระหว่างชั้นไม่แข็งแรง เนื้อเรื้อนไม่แข็งแรง เหมาะแก่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งที่อยู่และช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอด และช่วยเพิ่มความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อนได้ดี เนื่องจากทัลคัม ซึ่งมีสูตรทางเคมี $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ (Magnesium Silicate Hydroxide) มีคุณสมบัติห่อหุ้มตัวอยาก ทนไฟและกรด ด้านทนต่อการนำไฟฟ้า ช่วยในการผสมผสานและมีคุณสมบัติที่ดีในด้านการดูดซับ ป้องกันความชื้นได้ดี ทำให้พื้นผิวที่เคลือบอยู่แห้ง เนียนลื่น ไม่ดูดติดกัน นอกจากนี้ทัลคัมยังมีราคาถูกมาก และมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิต ราคาสูตรสำเร็จถ้ามีการผลิตเป็นการค้าก็จะไม่สูงมาก ซึ่งทำให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนในการผลิตลงได้อีกแนวทาง โดยจะเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรมีทางเลือกในการลดการใช้สารเคมี และมีการผสมผงแคลเซียม $CaCO_3$ ในอัตราครึ่งหนึ่งของทัลคัม พบว่าผงแคลเซียมมีแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบหลายชนิดซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารแก่เชื้อแบคทีเรียได้และเป็นปริมาณที่ไม่มากเกินไปกับเชื้อปฏิปักษ์ นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อในกลุ่ม *B. subtilis* สามารถใช้อาหารจากกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตได้ดี (Sandra *et al.*, 2000) ซึ่งการใส่ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อให้สามารถดำรงอยู่ได้เท่านั้นซึ่งการใส่ในปริมาณที่มากจะทำให้เชื้อมีกิจกรรมสูง ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลล์ นำไปสู่การเพิ่มของสารพิษที่เชื้อปล่อยออกมาทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในสูตรนั้น ๆ ได้น้อยลงเรื่อย ๆ ประกอบกับมีสาร CMC ที่เป็นสารเสริมประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความแข็งแรงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีโดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นั้นเป็นเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ทำให้สามารถปกป้องเซลล์ให้มีความแข็งแรงมีชีวิตอยู่ได้นานที่สุดอีกด้วย ซึ่งแตกต่างจากการใช้เชื้อเซลล์สดที่เมื่อนำมาปรับใช้ในสภาพไรที่มีสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างจากห้องปฏิบัติการทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะต้องมีการปรับตัวซึ่งจะทำให้เชื้ออ่อนแอ ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียนั้นด้อยประสิทธิภาพไป โดยมีการนำเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ AH18 ในการผลิตเป็นสูตรสำเร็จโดยการทำให้เกิดการสร้างเอ็นโดสปอร์ เพื่อให้มีความสามารถในการเก็บรักษาและคงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จและเพื่อความสะดวกในทางอุตสาหกรรมการค้า แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเชื้อในสูตรสำเร็จที่ดีนั้นจะต้องใช้ในแปลงหรือสภาพไรที่มีสภาพแวดล้อมปกติจะทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งการทดลองในสภาพไรนั้นพบว่า ในระยะของการตั้งท้องข้าวนั้นประสบปัญหาการขาดน้ำมากทำให้ต้นข้าวให้ผลผลิตที่ไม่ดี และพบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวมีโรคและแมลงศัตรูพืชระบาดมาก คือ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบขีดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมาก ทำให้ผลผลิตดีไม่มากเท่าที่ควร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ปัจจัยใด ๆ ในการทดลองพบที่มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างเห็นได้ชัดเจน

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาในครั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวจากพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยรวม 9 จังหวัด และจากกรมวิชาการ 1 สายพันธุ์ ทั้งสิ้น 231 สายพันธุ์
2. การวิเคราะห์ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเพื่อจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของการก่อให้เกิดโรคบนใบข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ105) แบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือกลุ่ม A คืออ่อนแอ ก่อให้เกิดโรค 1-5 % ของพื้นที่ใบ จำนวน 53 สายพันธุ์ กลุ่ม B คือ ค่อนข้างอ่อนแอ ก่อให้เกิดโรค 6-12 % ของพื้นที่ใบ จำนวน 28 สายพันธุ์ กลุ่ม C คือ ค่อนข้างรุนแรง ก่อให้เกิดโรค 13-25 % ของพื้นที่ใบ จำนวน 120 สายพันธุ์ และกลุ่ม D คือ ก่อให้เกิดโรค 26-50 % ของพื้นที่ใบ ขึ้นไป จำนวน 30 สายพันธุ์
3. การศึกษาระดับโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยการใช้ primer ทั้งสามชนิดคือไพรเมอร์ REP, ERIC และ BOX ภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า 2 ใน 3 ไพรเมอร์ คือไพรเมอร์ BOX และ ERIC สามารถแยกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งหมดออกจากสายพันธุ์เปรียบเทียบได้ การจัดกลุ่มทางลักษณะ Phenotype ตามความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรค แบ่งความแตกต่างเชื้อทั้ง 231 สายพันธุ์ ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มอ่อนแอ กลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ กลุ่มค่อนข้างรุนแรง และกลุ่มรุนแรง แต่เมื่อศึกษาระดับโมเลกุล (Genotype) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการใช้ primer ทั้งสามชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มรุนแรง (รุนแรงและค่อนข้างรุนแรง) กับกลุ่มอ่อนแอ (อ่อนแอและค่อนข้างอ่อนแอ)
4. การศึกษาระดับโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยการใช้ไพรเมอร์ ทั้งสามชนิดคือ BOX ERIC และ REP เปรียบเทียบกับแหล่งที่มาของเชื้อ พบว่าเชื้อสาเหตุโรคนั้นไม่มีความแตกต่างตามแหล่งที่มาของเชื้อเนื่องจากพบว่าเชื้อตามแต่ละสถานที่นั้นกระจายอยู่ทั่วไปทุกกลุ่ม
5. ไพรเมอร์ BOX นั้น สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอที่ 495 bp.ทุกสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ BOX สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวได้ ในขณะที่ไพรเมอร์อีก 2 ไพรเมอร์ไม่ปรากฏในทุกสายพันธุ์

6. เชื้อสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์รุนแรงนั้นมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่ซึ่งอาจเป็นส่วนที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อทั้งสองกลุ่มได้ ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงหรือสายพันธุ์อ่อนแอของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้

7. การนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลมาตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อที่มีสายพันธุ์จำนวนมาก ๆ นั้นทำให้การวิเคราะห์ผลทำได้ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป โดยสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อในระดับสปีชีส์ได้อย่างแพร่หลายซึ่งในปัจจุบันสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากและประกอบกับเชื้อสามารถแพร่กระจายได้หลายทางจึงทำให้เชื้อมีความหลากหลายในแต่ละแหล่งที่มาของเชื้อซึ่งจะสามารถเป็นกุญแจในการบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในอนาคตอันใกล้ได้

8. การศึกษาครั้งนี้จะช่วยในการเลือกวิธีในการจัดการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ให้เหมาะสมกับแต่ละสภาพพื้นที่ซึ่งในพื้นที่ที่ไม่สามารถปลูกพันธุ์ด้านทานได้ก็สามารถที่นำมาเอาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ไปปรับใช้ให้เหมาะสม และสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ด้านทานในการปลูกข้าวที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ที่เหมาะสมต่อไป

9. จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรากข้าว ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* และส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวทางด้านความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสด ทั้งสามารถชักนำให้พืชมีกลไกในการป้องกันตนเองนำไปสู่กระบวนการด้านทานเชื้อสาเหตุโรคทั้งระบบ ISR ผลิตภัณฑ์การเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของ β -1,3-glucanase และยังส่งผลให้ข้าวพันธุ์ด้านทานนั้นสามารถต้านทานโรคได้สูงกว่าในพันธุ์อ่อนแออย่างเห็นได้ชัดเจน

10. จากการคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ครั้งที่อายุ 7 14 30 45 60 และ 75 วัน หลังปลูก และทำการปลูกเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ 36 วัน หลังปลูก พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อมากที่สุดที่วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 96) และสามารถลดโรคลงได้ 72% ในข้าวพันธุ์ด้านทาน สูงกว่าในพันธุ์อ่อนแอ ที่ลดโรคลงได้ 65 % แสดงให้เห็นว่าในข้าวพันธุ์ด้านทานสามารถสร้างกลไกในการกระตุ้นให้เกิดการปกป้องตนเองของพืชให้ด้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

11. การทดลองนี้สามารถนำไปปรับใช้เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้พันธุ์ข้าว ด้านทานโรคร่วมกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในระบบการผลิตข้าวในสภาพไร่เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้ในพื้นที่ที่ไม่สามารถใช้พันธุ์ด้านทานต่อโรคและแมลงได้เนื่องจาก สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ สภาพแวดล้อม หรือปัจจัยทางด้านการตลาดไม่เหมาะสม จำเป็นต้องปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อการเกิดโรค ก็สามารถแนะนำให้เกษตรกรใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคและแมลง และส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวได้

12. จากการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ประกอบด้วย talcum 60%, calcium 30%, CMC 8% และน้ำตาลกลูโคส 2% พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของ ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สูงที่สุดทางด้านความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดเฉลี่ย/ต้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ปัจจัยใด ๆ สูงถึง 72.98%, 25.61% และ 58.73% ตามลำดับ และสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคขอบใบแห้ง ได้ดีที่สุด 72% ในสภาพเรือนทดลอง และ 61 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพไร่ แตกต่างทางสถิติกับการใช้ เชื้อสด สารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่ระดับ ($P=0.05$)

13. สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ XA6 ยังคงมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อคุณภาพ หลังจากการเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน ดีที่สุดที่ 1.69×10^8 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าจากการผลิตสูตรสำเร็จนั้นมีการใช้สารพา คือ ทลัคม ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถใช้เป็นแหล่งที่อยู่และช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอด เนื่องจากมีความสามารถในการป้องกันความชื้น ทำให้ลดการปนเปื้อนจากเชื้อราได้ดี และช่วยเพิ่มความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อนได้ดี

14. เชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถใช้อาหารจากสารสกัดมันฝรั่ง (สูตรเพิ่มปริมาณ) เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลดีต่อการเจริญเติบโตได้ดี (Sandra *et al.*, 2000) ประกอบกับมีสาร CMC เป็นสารเสริมประสิทธิภาพช่วยปกป้องเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความแข็งแรงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งแตกต่างจากการใช้เชื้อเซลล์สดที่เมื่อนำมาปรับใช้ในสภาพเรือนทดลองที่มีสภาพแวดล้อมที่ผิดแปลกแตกต่างจากห้องปฏิบัติการ ทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะต้องมีการปรับตัวทำให้เชื้ออ่อนแอ ส่งผลให้เชื้อนั้นค่อยประสิทธิภาพลงไป (Muis, 2006)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการข้าว. 2551. ข้าวเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งที่มา: <http://human.rru.ac.th/icon/local-infor/rice.doc>, 30 ตุลาคม 2551.

กุลชนา เกศสุวรรณ. 2546. การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชูเกียรติ โอภาสวงศ์. 2551. ข้าวไทย. แหล่งที่มา: http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_008/rice_xx2-08_produce0007.htmlw, 30 มิถุนายน 2551.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา สดุดดี ประเทืองวงศ์ และ สุพจน์ กาเข็ม. 2548. ศักยภาพในการผลิตแบคทีเรียไอสอาร์ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ในรูปสูตรผง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอรัญญาพิช ครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550. จ. พิษณุโลก. หน้า 81-90.

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และ สดุดดี ประเทืองวงศ์. 2549. การสะสมเอนไซม์เพอรอกซิเดสและเบต้ากลูคาเนสในถั่วเหลืองที่ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคใบจุดนูนด้วยเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, น. 38-39. ใน การประชุมวิชาการพืชไร่ วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1. 30 สิงหาคม 2549. เชียงราย

ทรงเขาว์ อินสมพันธ์. 2545. วิชาเอกสารคำสอนวิชาพืชไร่สำคัญของประเทศไทย (ก.พร. 313): ข้าว (rice). ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

นันทยา เตชะติ. 2551. การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลบขีดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2546. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี. ประทุมทอง พรินต์ติ้ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

ประสาทร สมิตะมาน. 2534. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ปราณีต จิระสุทัศน์. 2531. ข้าว. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาลัยครูพระนคร. กรุงเทพฯ.

พะยอม โคเบल्ली. 2551. ข้าวไทย. แหล่งที่มา:

www.ubon.ricethailand.org/document/payorm/kresek/kresek.htm - 17k, 23 มีนาคม 2551.

มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 2551. ข้าวไทย. แหล่งที่มา:

http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm, 17 กรกฎาคม 2551.

ลินลี กาวิตะ. 2546. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและการพัฒนาการของพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วาสนา ผลารักษ์. 2523. ข้าว. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒินิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม, ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2549. การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิคุ้มกันโรคของกะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ, น. 795-810 ใน รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 44. 29 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม, จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ และ ดุสิต อธิณัฐ. 2548(ก). การชักนำภูมิคุ้มกันและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดที่ผลิตเป็นการค้าด้วยแบคทีเรียควบคุมโรค, น. 54-55. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 7. 2-4 พฤศจิกายน 2548. เชียงใหม่.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, สุพจน์ กาเข้ม, นันทิยา เตชะดี และ ประชุม จุฑาวรรณ. 2548(ข). แบคทีเรียไอบีเอสอาร์ที่ยับยั้งโรคที่สำคัญ และปรับปรุงเพิ่มพูนคุณภาพของข้าวโพด, น. 13-15. ใน

รายงานการประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่ 32, 13-15
มิถุนายน 2548, สุโขทัย.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และ สุพจน์ กาเข้ม. 2544. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพใน
การควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองตัดเทียมสารเคมี. ใน รายงานการประชุมวิชาการ
อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5, 21-23 พฤศจิกายน 2544, กาญจนบุรี.

สุพจน์ กาเข้ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากผิวใบและ
ดินบริเวณรากถั่วเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลงกรณ์ อมรศิลป์, ไฉไล คูวัฒนานกุล, ฐานิสร์ ดำรงวัฒนโกสิน และ โสมทัต วงศ์สว่าง. 2546.
การศึกษาพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Repetitive Sequence-Based
Polymerase Chain Reaction. *เวชสารสัตวแพทย์*. 33 (1):35-44.

Adhikari, T.B., R.C. Basnyat and T.W. Mew. 1999. Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv.
oryzae on Rice Lines Constraining Single Resistance Genes and Gene Combination.
Plant Dis. 83: 46-50.

Akhtar, M.A., A. Rafi and A. Hameed. 2008. Comparison of methods of inoculation of
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* in rice cultivars. *Pak. J. Bot.* 40(5): 2171-2175.

Anonymous. 2002. *Bacillus* spp. แหล่งที่มา: [http:// www.agrobiological.com](http://www.agrobiological.com). online 17 April 2004.

Arima, K., Kakinuma, A and Tamura, G. 1968. Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant
produced by *Bacillus subtilis*; isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot
formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 488-494.

Barry, D.A., and Miller, M.H. 1989. Phosphorus nutrient requirement of maize seedling for
maximum yield. *Agronomy Journal* 81: 95-99.

- Bouzar, M., J.B. Jones, R.E. Stall, F.J. Louws, M Schneider, J.L. Rademaker, F.J. deBruijn and L.F. Jackson. 1999. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America eviden for common lineages within and between countries. **Phytopathology**. 89: 328-335.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. **Biochem**. 72:248-254.
- Browen, G.D. and A.D. Rovira. 1976. Microbial colonization of plant roots. Annu. Rev. **Phytopathol**. 14: 121-144.
- Campbell, R. 1989. Biological Control of Microbial Plant Pathogens. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, W. and T. Kuo. 1993. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Aron, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. and Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria form subtropical soil and their tricalcium Phosphate solubilizing abilities. Applied soil Ecology. 34: 33-41.
- Dakora, F.D. and Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in Low-nutrient. Plant and soil 245: 35-47.
- David. O., NiNo. L.I.L. C. Pamela and J.B. Adum. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model of a model crop. Molecular Plant Pathology. 7 (5): 303-324.
- Delp, B.R., L.J. Stowel and J.J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathology**. 76: 1299-1305.

- El-Hassan, S.A. and S.R. Gowen. 2006. Formulation and Delivery of the Bacterial Antagonist *Bacillus subtilis* for Management of Lentil Vascular Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *Phytopatology* 154, 148-155.
- Ezu, A. and Kaku, H. 2000. **A historical review of bacterial leaf blight of rice.** *Bull. Natl. Agribiol. Resour.* 15: 1-207
- Fox, S.L. and G, Bala. 2000. Production of surfactant form *Bacillus subtilis* ATCC21332 using potato substrates. **Bioresource Technology.** 75: 235-240.
- Ghasemie, E., M.N. Kazempour and F. Padasht. 2008. Isolation and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* the causal agent of bacterial blight of rice in Iran. **J. Plant Protection Research.** 48: 51-61.
- Gonzales, C. S. Restrepo, J. Tohmo, V. Verdier. 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. **FEMS Microbial. Lett.** 215:23-31.
- Hamon, M.A. and Beth, A.L. 2001. The sporulation transcription factor SpoOA is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology.** 42(5): 1199-1209.
- Handelsman, J. and J.L. Parke. 1989. Mechanism in biocontrol of soilborne plant pathogens. *In* **T. Krouge and E.E. Nester (eds). Plant-Microbe.** 27-61p.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 2007. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.** The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Hulton, C.S.J., Higgins and P.M. Sharp. 1991. Eric sequence: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other eubacteria. **Mol. Microbial.** 59: 925-934.

IRRI-International Rice Research Institute. 1980. Standard Evaluation System for Rice.

International Rice Research Institute. Manila, Philippines. Interactions: Molecular and Perspective, vol 2. Macmillan, New York.

Jayaraj, J., N.V., Radhakrishnan, R., Kannan., K., Sakthivel., D., Suganya., S., Venkatesan., and R. Velazhahan., 2005. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. Biocontrol Science and Technology. 15: 1, 55-65.

Judd, A.K., M., S., Sadowsku, MJ., de Bruin, F.J., 1993. Used of repetitive sequences and the polymerase chain reaction techque to classify genetically relate Bradyrhizobium japonicum serocluster 123 strain. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1702-1708.

Kagale, S., Marimutha, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R and samiyappan, R. 2004. Antimicrobial activity and induction of Systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metal against Rhizoctonia solani and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular plant Pathology.** 65: 91-100.

Larkin J. C., J. F. Hunsperger, D. Culley, I. Rubenstein and C. D. Silflow. 1989. **The organization and expression of a maize ribosomal protein gene family.** Genes Dev. 3: 500-509.

Louws, F.J., D.W. fullbright, C.T. Stephens and F.J. de bruijn. 1994. Specific genomic Fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Appl. Environ. Microbial.** 60: 2286-2295.

Louws, F.J., J. Bell, C.M. Medina-Mora, C.D. Smart, D. Opgenorth, C.A. Ishimaru, M.K. Hausbeck, F.J. de bruijn and D.W. Fulbright. 1998. Rep-PCR-mediated genomic

fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*.

Phytopathology. 88: 862-868.

Marten, P., Smalla, K. and Berg, G. 2002. Genotypic and Phenotypic Identification of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. **Journal of Application Microbiology** 89. 463-471.

Martin, B.O., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mithchell, P. Andrew, M. Prudhommome, G. Alloing, R. Hakenbeck, D.A. Morrison, G.J. Boulnois and J.P. Claverys. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumonia*. **Nucl. Acids. Res.** 20: 3479-3483.

Mayer, J. M. 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Arch. Microbiol.** 174: 135-142.

McManus, P.S. and A.L. Jones. 1995. Genetic fingerprints of *Erwinia amylovora* strains isolated from three - fruit crops and *Rubus* ssp. **Phytopathology.** 85: 1547-1553.

Mehta, A., Y, Mehta and Y, Rosato. 2002a. ERIC- and REP-PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. **FEMS Microbiology Letters.** 211 (2002) 51-55.

Mehta, Y.R., Mehta, A and Rosato, Y.B. 2002b. ERIC and REP banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer region of *Stemphylium solani* of cotton. **Curr. Microbiol.** 44, 323-328.

Muis, A. 2006. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for Biological control. **Indonesia Journal of Agriculture science.** 7(2): 51-56.

- Munk vald, G.P. and J.J. Marios. 1993. Efficacy of nature epiphytes and colonizes of grapvine pruning wounds of biological control of *Eutypa dieback*. **Phytopathol.** 83: 624 – 629.
- Naoto A. and O. Takashi, 2000. PCR-mediated Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Amplification of the 16S–23S rDNA Spacer Region Sequence. *Plant Patholog.* 66: 303-309.
- Noda, T., C. LI., J. LI., H. Ochiai., K. Ise and H. Kaku. 2001. Pathogenic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains from Yunnan Province, China. **JARQ.** 35(2): 97-103.
- Ochiai, H., Horino, O and Miyajima, K. H. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strain form Sri Langka. **Phytopathology.** 90: 415-421.
- Pan, S. Q., X. S. Ye and J. Kuc. 1991. Association of β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 25-39.
- Phiriyaprasath, S., S. Prathuangwong and N. Changkhan. 2002. Effects of Termite Mound Bacteria on Disease Incidence and Growth of Soybean and Acacia. **Proc. of the Summary of the 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases.** Nov. 5-8, 2002. Chain Mai. 167.
- Prathuangwong, S. and S. Kasem. 2003. Potential of new antagonists for controlling soybean bacterial pustule and reducing bactericide application. **Proceeding of the 7th International Congress of Plant Pathogy.** New Zealand, 2, 11.
- Prathuangwong S., S. Kasem and J. Thowthampitak. 2004. Multiple Plant Response to Bacterial

Mediated Protection Against Various Diseases. **Proc of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciens (Scientific Meeting)**. Hani Agricultural University (HAU), Hanoi.

Ramamoorthy, V., T. Raguchander and R. Samiyappan. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Plant and Soil**. 239: 55-68.

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariation System Version 1.8. **Applied Biostatic Inc**, New York.

Sadowsky, M.J., L.L. Kinkel, J.H. Bower and J.L. Schottel. 1996. Use of repetitive intergenic DNA sequence to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3489-3493.

Sandra, L., S.L. Fox and G. A. Bala. 2000. Production of Surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Using potato substrates. **Elsevier Science Ltd**.

Schaad, N.W. 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society, St. Paul MN. 245 p.

Shanti, M.L., M.L.C. George., C.M.V. Cruz., M.A. Bernardo., R.J. Nelson., H. Leung., J.N. Reddy and R. Sridhar. 2001. "Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in eastern India". **Plant Disease**. 85: 506 - 512.

Specific approval and amendment. 2007. *Xanthomonas oryzae* this standard describes a dianotic protocol for *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *orizicola*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 37: 543-553.

- Suslow, T.V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of Sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathol.** 72: 199-206.
- Suwanto, A., H. Friska and I., Sudirman. 1996. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* B29 and profile, hypersensitivity test, and assay of bioactive compound. J Indonesia **Phytopathology.** 31(1): 15-20.
- Tagami, Y. and Mizukami, T. 1962. **Histological review of the researches on bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae*.** Special report of plant diseases and insect pests forecasting service No. 10 Plant Protection Division, Ministry of Agriculture and forestry. Tokyo, Japan. 112.
- Tika, B.A., T.W. Mew and J.E., Leach. 1999. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology.** 89: 687-694.
- Trivedi, P., Kumar, B., Pendey, A. and Palni, L.M.S. 2003. Growth promotion of rice by phosphate-sobilizing bio-inoculant in Hawalayan location. Plant. Soil sci. 102. 291-299.
- Vancura, V. 1987. Microorganisms, their mutual relations and functions in the rhizosphere, In V. Vancura and F. Kunc, eds. **Soil Microbial associations**, Academia Prague Czechoslovakia. 219-233 p.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Baker and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36: 453 – 83.
- Vera Cruz, C.M., E.Y. Ardales, D.Z. Skinner, J. Talay, R.J. Nelson, F.J. Louws, H. Leung, T.W. Mew and J.E. Leach. 1996. Measurment of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. **Phytopathology.** 86: 1352-1359.

- Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterium and application to fingerprinting of bacterium genomes. **Nucl. Acids. Res.** 19:6823-6831.
- Webster, R., K. Gunnell., and P.S. Título. 1992. Compendium of Rice Diseases. **American Phytopathological Society.** USA.
- Wattiau, P., Renard. M.-E. Ledent. P. Debois. V. Blackman. G and S.N. Agathos. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:816–819.
- Wonyong, K., Mi, O. S., Wonkeun, S., Ki, J. K., Sang, I. C., Chul, S. C., and H. P. Yong. 2003. Comparison of 16s rDNA analysis and rep-PCR genomic fingerprinting for molecular identification of *Yesinia pseddotuberculosis*. **Antonie van Leeuwenhoek.** 83: 125-133.
- Yasmin, S., Rahman, Bakar, M.A., Malik, K.A. and Hafeez, F. Y. 2004. Isolation, characterization and beneficial effect of rice associated plant growth-promoting bacteria from Zanzibar soil. *J. Basic Microbiol* 44: 241-252.
- Zotobowska, L., and H., Pospieszny. 1997. PCR detection of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* from various plants in Poland. In: BSPP (Ed.) Proceedings of International Conference of Plant Pathology August 9–16, Edinburgh, Scotland.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient glucose broth (NGB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

Nutrient glucose Agar (NGA)

Nutrient glucose broth		
Agar	15	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปหลอมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

Potato sucrose broth

Potato	300.0	กรัม
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม

เตรียมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGA ปรับ pH เท่ากับ 6.8-7

Potato sucrose agar (PSA)

Potato sucrose broth

Agar	8.0	กรัม
------	-----	------

LB medium

Bacto tryptone	10.0	กรัม
----------------	------	------

Yeast extract	5.0	กรัม
---------------	-----	------

NaCl	10.0	กรัม
------	------	------

เตรียมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGA

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Chen and Kuo, 1993)

1.1 Lysis buffer

Tris-acetate pH 7.8	40.0	มิลลิโมลาร์
---------------------	------	-------------

Sodium acetate	20.0	มิลลิโมลาร์
----------------	------	-------------

EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์
------	-----	-------------

1% SDS

1.2 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.3 Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)

1.4 Absolute ethanol (99.9%) แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.5 TE buffer

10 mM/1 Tris-HCl (pH 8.0)

1mM/1 EDTA (pH 8.0)

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 Isopropanol ที่แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 5X TBE

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 mol/1 EDTA pH 8.0	20.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 Gel loading dye

Bromophenol blue	0.025	กรัม
Glycerol	3.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร กรองตะกอนสีออกด้วยกระดาษกรอง
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

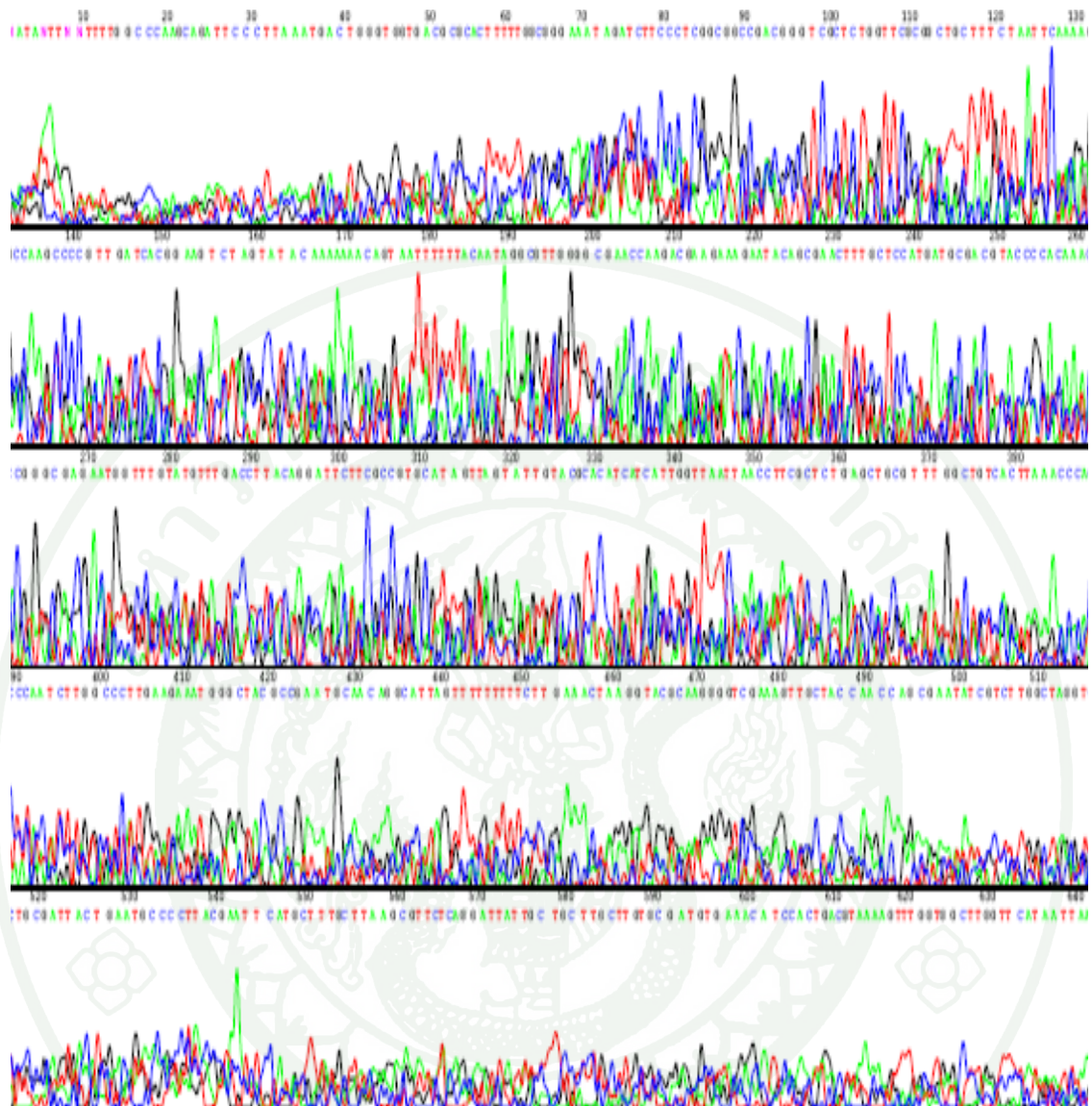
ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนโดยใช้ magnetic stirrer จนกว่าจะละลายห่อด้วย foil หรือเก็บใส่ขวดสีน้ำตาล เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ XA6 โดยโปรแกรม Blasé เปรียบเทียบข้อมูล Genebank

>XA6-R

TTACAATACGTAACTAATTTTATGTCGACGCCTGCTACCTCCAAAAAGAGTGGACTAGTGTTATAA
ACACATGATCAGAAGATGGGGAGAAATATACTCCGAAAAAAGAAGAGGGTATGGGGACGCTATG
GTGTTAGATCTATGAGTTATATATAGACTCGAAGCTTCCCCATATATACTAGAACGGACCCAAAG
AGAGGGTACCCTTTTGATTATAAAGAAACACATAGCGCGATACAGTCAAAACAAATATATTTTAC
TGAGATAAGAATAGACACCCCATCGCAGAAAAATTTATCAGTAGATTCTCTCCCCCCCCCTTTGTG
CCCCCTACGGGTTCGTTTTAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA
CCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTTGACTACCACTTACAGATGG
ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCTGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTAGGA
TCGTA



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาววราภรณ์ นามสกุล ภูักดีพันธ์

เกิดวันที่ 7 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527

สถานที่เกิด บ้านเลขที่ 015 หมู่ที่ 1 ต. เขียวเขา อ. เฉลิมพระเกียรติ จ. นครศรีธรรมราช

รหัสไปรษณีย์ 80190

ประวัติการศึกษา ปริญญา วท.บ. (พืชศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ E-mail:

por.fon@hotmail.com

ผลงานวิจัย

วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. การผสมเชื้อปฏิปักษ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคขอบใบแห้ง และส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าว. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. 14 - 17 มีนาคม 2552. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ. หน้า 601-610.

วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่กระตุ้นให้ข้าวพันธุ์ต้านทานผลิตเอนไซม์ปกป้องการติดเชื้อจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้เพิ่มขึ้นมากกว่าข้าวพันธุ์อ่อนแอ. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. จ.อุบลราชธานี. หน้า 649-658.

วราภรณ์ ภูักดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. 3 -5 กุมภาพันธ์ 2553. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ. หน้า

Chatnaparat, T., W. Pupakdeeapan and S. Prathuangwong. 2009. Bacterial antagonist mediated broad-spectrum resistance of maize against disease and water stress.

Proc. of the 1st International Conference on Corn and Sorghum Research and the 34th
National Corn and Sorghum Research Conference. Apr. 8-10, 2009. Patthaya.
36.

นิติตช่วยสอน รายวิชา 01008281 Introductory Plant Pathology (โรคพืชวิทยาเบื้องต้น) ภาคปลาย

ปีการศึกษา 2552 และภาคต้น ปีการศึกษา 2553

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์