



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง บทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว
โดยชีววิธี

Role of Chitinolytic Bacteria for Biological Control of Sheath Blight on Rice

นามผู้วิจัย นางสาวเพชรพิกุล วาญมุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์จินตนา อันอาดมั่งมาม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มทววิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

บทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวโดยชีววิธี

Role of Chitinolytic Bacteria for Biological Control of Sheath Blight on Rice

โดย

นางสาวเพชรพิกุล วาญมูล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพชรพิกุล วาญมูล 2553: บทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในการควบคุม
โรคกาบใบแห้งของข้าวโดยชีววิธี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์จรเดช แจ่มสว่าง, Ph.D. 107 หน้า

แยกแบคทีเรียย่อยไคตินจากรากข้าวซึ่งสุ่มเก็บจากแหล่งปลูกตามธรรมชาติด้วยวิธี tissue
transplanting บนอาหารจำเพาะ chitin agar ได้รวม 75 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 49 ไอโซเลท
เมื่อนำไปทดสอบการย่อย colloidal chitin และการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุ
โรคกาบใบแห้งของข้าว สามารถแบ่งแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ย่อย colloidal chitin ได้สูงและ
ยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ในช่วง 57.8-64.9 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ไอโซเลท และกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อย colloidal
chitin ได้ปานกลางและยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ในช่วง 23.3-57.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรียที่
คัดเลือกไว้บางไอโซเลทส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและการเจริญครอบครองรากของเชื้อสามารถคัดเลือก
แบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่พัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ 100 ppm ได้ 10 ไอโซเลท โดยทุก
ไอโซเลทยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani*

ศึกษาการเกิดโรคและการเปลี่ยนแปลงของค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสทุกวันในช่วง
0-10 วัน หลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* ที่กาบใบบริเวณ โคนกอข้าวอายุ 45 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์
ไคตินเนสเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 2-7 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 15.9-47.5 U/mg protein

การชักนำให้ข้าวต้านทานต่อโรคกาบใบแห้งด้วยการรดด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อย
ไคตินไอโซเลทพันธุ์กลายไอโซเลท PT1-3M, PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M, PT24-3M, PT25-6M,
PT49-9M, PT56-4M และ PT70-8M ก่อนปลูกเชื้อรา *R. solani* พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทพันธุ์กลายเกือบทุก
ไอโซเลทสามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังการปลูกเชื้อโรคที่ 7 วัน โดยมีค่าความรุนแรงของ
โรคลดอยู่ระหว่าง 62.4-68.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม (70.4 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ แบคทีเรีย
ย่อยไคตินทุกไอโซเลทสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้โดยเพิ่มความสูงต้น ความยาวรากและ
ผลผลิตข้าว โดยแบคทีเรียไอโซเลทพันธุ์กลาย PT56-4M มีประสิทธิภาพชักนำให้พืชสร้างเอนไซม์ไคตินเนส
ได้สูง ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว และช่วยให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้นด้วย

Petchpikul Vangmoon 2010: Role of Chitinolytic Bacteria for Biological Control of Sheath Blight on Rice. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Chiradej Chamswang, Ph.D. 107 pages.

Chitinolytic bacteria were isolated from the roots of rice plants randomly collected from natural rice field by using tissue transplanting technique on a chitin agar selective medium. From the total of 75 isolated chitinolytic bacteria, 49 isolates were gram positive. All gram positive isolates were further tested for colloidal chitin digestion and the mycelial growth suppression of *Rhizoctonia solani*, a causal agent of rice sheath blight. Two groups of chitinolytic bacteria were indentified, the first group comprised of 10 isolates with high colloidal chitin digestion activity and high percentages of *Rhizoctonia* mycelial growth suppression (57.8-64.9%). Another 10 isolates of the second group were the chitinolytic bacteria with moderate colloidal chitin digestion activity and 23.3-57.1% of *Rhizoctonia* mycelial growth suppression. Most of selected bacterial isolates for provided rice growth promotion and root colonization efficacy. Also, some selected isolates were developed for the resistance to 100 ppm rifampicin antibiotic while *Rhizoctonia* mycelial growth suppression efficacy remained.

Investigations on pathogenicity and expression of chitinase specific activity were conducted during 0-10 days after the inoculation of *R. solani* at the basal part of leaf sheath of 45 day-old-plant. Results indicated that the chitinase specific activity in rice leaf was increased between 15.9-47.5 U/mg protein during 2-7 days after inoculation of *R. solani*.

The experiment for inducing resistance in rice against sheath blight was conducted by drenching of rice plant with cell suspension of rifampicin resistant mutant chitinolytic bacterial isolates PT1-3M, PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M, PT24-3M, PT25-6M, PT49-9M, PT56-4M and PT70-8M prior to the inoculation of *R. solani*. Almost all isolates reduced sheath blight with disease incidence 62.4-68.3 % which were significantly lower as compared to a pathogen inoculated control (70.4%). All chitinolytic bacteria isolates promoted growth of rice plants by increasing plant height, root length and yield of rice. The mutant isolate, PT56-4M not only induced high chitinase specific activity in plant, but also effectively promoted growth and increased yield of rice as well.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ ทั้งในเรื่องงานวิจัยและการใช้ชีวิต ขอกราบขอบพระคุณ
ดร. จินตนา อันอาตม์งาม กรรมการร่วม ผศ.ดร. วรณวิไล อินทนู ประธานการสอบ และ
ดร. รัชมี จิตติเกียรติพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานตลอดจน
แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพ่อสุพจน์ คุณแม่อมสิน วางมูล ที่คอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา
รวมถึงกำลังใจจากพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพทุกท่านที่
มอบประสบการณ์และสิ่งดีๆ ให้ข้าพเจ้าตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนัก
พัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ
อุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ครอบครัว อาจารย์ผู้
ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดมาจน
สำเร็จการศึกษา

เพชรพิกุล วางมูล

เมษายน 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	31
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	66
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์	78
ภาคผนวก ข สีและน้ำยาที่ใช้ย้อมเซลล์แบคทีเรีย	82
ภาคผนวก ค สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	84
ภาคผนวก ง ตารางแสดงผลและภาพผลการทดลอง	89
ภาคผนวก จ การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog System	101
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนของแบคทีเรียย่อยไคตินซึ่งแยกได้จากฝักรากข้าวในระยะต่างๆ ซึ่งปลูกในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติด้วยการใช้อาหารแยกเชื้อ	33
2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อย colloidal chitin บนอาหารจำเพาะ chitin agar selective medium	35
3	จำนวนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จากรากข้าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร Potato Dextrose Agar	37
4	รัศมีโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร Potato Dextrose Agar	38
5	เปอร์เซ็นต์การงอก ค่าเฉลี่ยความยาวรากและค่าเฉลี่ยความสูงต้นกล้าข้าวเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการแช่ในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ย่อยไคติน เพาะลงบนกระดาษเพาะเมล็ด 7 วัน	43
6	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์ต้านทาน rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> บนอาหาร PDA เปรียบเทียบกับ wild type	46
7	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังปลูกเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> และโรคเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่อทำการปลูกเชื้อโรคและหลังปลูกเชื้อโรค 7 วัน	55
8	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตต่อรวง น้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดต่อ 1,000 เมล็ด หลังจากรดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนดินและรวงของข้าวจำนวน 3 ครั้ง หลังปลูก	56
9	ปริมาณประชากรของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินและเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากหลังจากรดด้วยแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์ต้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin (50 ppm) เมื่อดันข้าวมีอายุ 120 วัน	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง1	คุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินซึ่งแยกได้บริเวณผิวน้ำข้าว จากแหล่งปลูกข้าวตามธรรมชาติ	90
ง2	แสดงประสิทธิภาพในการย่อย colloidal chitin บนอาหารคัดเลือกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน	95
ง3	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินซึ่งแยกได้จากผิวน้ำข้าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i>	97
ง4	แสดงประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินสายพันธุ์ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm ในการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)	99

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคกาบใบแห้งโดยเกิดแผลเป็นรูปไข่ขอบสีน้ำตาล และเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน	32
2	เชื้อแบคทีเรียที่ streak บนอาหาร NGA อายุ 48 ชั่วโมง	34
3	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> ของแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน โดยวิธี Dual culture	41
4	ลักษณะเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินข้อมด้วย malachite green	47
5	ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวอายุ 20 วัน เมื่อพ่นด้วยแบคทีเรียย่อยไคตินได้สูง	49
6	ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวอายุ 20 วัน เมื่อพ่นด้วยแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้ต่ำ	52
7	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวเมื่อปลูกเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i>	58
8	ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวเมื่อรดด้วยแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้สูง และปลูกเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i>	61
9	ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวเมื่อรดด้วยแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้ต่ำและปลูกเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i>	63
ภาพผนวกที่		
ก1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)	86
ก2	แสดงกราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)	88

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance)
BSA	=	Bovine Serum Albumine
CFU	=	จำนวนโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony forming unit)
cm	=	เซนติเมตร (centimeter)
Conc	=	Concentration
M	=	โมลาร์ (Molar)
mg	=	มิลลิกรัม (milligram)
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
NAG	=	N-acetyl glucosamine
nm	=	นาโนเมตร (nanometer)
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (Potato dextrose agar)
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
PR – protein	=	pathogenesis-related protein
U	=	unit/mg protein
V	=	ปริมาตร (volume)
W	=	น้ำหนัก (weight)
WA	=	water agar
μg	=	ไมโครกรัม (microgram)
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

บทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในการควบคุม โรคกาบใบแห้งของข้าวโดยชีววิธี

Role of Chitinolytic Bacteria for Biological Control of Sheath Blight on Rice

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชในตระกูล Gramineae จัดเป็นอาหารหลักที่ใช้ในการบริโภค นอกจากนี้ยังจัดเป็นสินค้าส่งออกสำคัญที่ทำรายได้เข้าประเทศไทยเป็นมูลค่าสูงมาก จากการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในปีเพาะปลูก 2552/53 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 57.26 ล้านไร่ ประมาณการส่งออกข้าวของประเทศไทย ตั้งแต่วันที่ 1-12 มีนาคม 2553 มีปริมาณ 1,691,425 ตัน (<http://www.ricethailand.go.th>) แต่การผลิตข้าวยังประสบปัญหาซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต โดยปัญหาเรื่องโรคเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง โรคที่สำคัญที่มักพบได้แก่ โรคไหม้ (*Pyricularia oryzae*) โรคถอดฝักดาบ (*Fusarium moniliforme*) โรคขอบใบแห้ง (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) โรคเมล็ดด่างซึ่งเกิดจากเชื้อราหลายชนิดเป็นต้น โดยโรคที่สำคัญและพบระบาดในภาคกลางและภาคอีสาน คือ โรคกาบใบแห้งของข้าว (สมคิด, 2540)

โรคกาบใบแห้งของข้าว (Sheath blight disease of rice) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (สมบัติ และ นิตยา, 2527) สามารถพบระบาดทั่วไปในประเทศที่ปลูกข้าว เช่น ญี่ปุ่น ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เวียดนาม อินเดีย อเมริกาและไทย (ศิริวรรณ, 2521) มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ซึ่งทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 20-40 เปอร์เซ็นต์ และโรคนี้มีแนวโน้มว่าจะมีการแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้นเนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคแม้จะพบว่าบางพันธุ์มีความต้านทานโรคแต่ค่อนข้างต่ำ เชื้อราชนิดนี้มีความสามารถในการอยู่รอดในดินได้เป็นเวลานานในรูปของเมล็ดเคลือบโรเทียม (sclerotium) และสามารถเข้าทำลายข้าวได้อีกเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันและรักษาทำได้โดยการใช้สารเคมีซึ่งนอกจากจะมีราคาแพงทำให้ต้นทุนการผลิตข้าวสูงขึ้นแล้วยังก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งในระยะสั้นและระยะยาวนอกจากนี้ยังเกิดผลเสียต่อสุขภาพของชาวนา อาจเกิดพิษแบบเฉียบพลันหรือสารเคมีอาจสะสมในร่างกายได้ ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีจึงทำให้มีแนวความคิดในการควบคุมโรคด้วยชีววิธี (Biological Control) เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (Cook, 1993) ในประเทศไทยมีรายงานการทดสอบ

คุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้คือเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No. 16 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยการสร้างสารปฏิชีวนะที่ทนต่อความร้อน (Pengnoo *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการควบคุมโรคโดยชีววิธีอย่างแพร่หลายและพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica* และ *Streptomyces* sp. (Kishore *et al.*, 2005) สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินสับยั้งเชื้อราได้สูง โดยเอนไซม์ไคตินเนสจะย่อยสารไคตินที่เป็นโครงสร้างสำคัญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแมลงได้เป็น N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารชีวภาพควบคุมเชื้อโรคพืช เช่น เอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *S. marcescens* ใช้ควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุการเกิดโรคในถั่ว และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุการเกิดโรคในฝ้าย (Ordentlich *et al.*, 1988) เป็นต้น การใช้เชื้อราเช่น *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคตินเนส ในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) FITZP. (วารุณี, 2546) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสในพืชจะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานแบบ ISR (induced systemic resistance) เพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมโรคโดยชีววิธี

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินในการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในต้นข้าวเพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถชักนำความต้านทานในพืชต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวโดยชีววิธีต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินซึ่งแยกได้จากรากข้าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการครอบครองรากข้าว
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในต้นข้าวเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคติน
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินต่อการลดการเกิดโรค และชักนำให้ต้นข้าวต้านทานต่อการเกิดโรคกาบใบแห้งจากเชื้อรา *R. solani*

การตรวจเอกสาร

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชในตระกูล Gramineae เป็นอาหารหลักที่ใช้ในการบริโภค นอกจากนี้ยังเป็นสินค้าส่งออกสำคัญที่ทำรายได้เข้าประเทศไทยเป็นมูลค่าสูงมาก จากการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในปีเพาะปลูก 2552/53 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 57.26 ล้านไร่ ประมาณการส่งออกข้าวของประเทศไทย ตั้งแต่วันที่ 1- 12 มีนาคม 2553 มีปริมาณ 1,691,425 ตัน (<http://www.ricethailand.go.th>) โดยการผลิตข้าวในประเทศไทย แบ่งออกเป็น ข้าวนาปี และ ข้าวนาปรัง และสามารถจำแนกพื้นที่ปลูกข้าวตามประเภทของข้าว เช่น ข้าวหอมมะลิมีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวเจ้าพันธุ์อื่นๆ มีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคเหนือและภาคกลาง ส่วนข้าวเหนียวมีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรในการปลูกข้าวทุกชนิด คือ โรคของข้าวซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการขยายพื้นที่ปลูกข้าวและนำเทคโนโลยีใหม่ๆ มาใช้เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพนิเวศทางการเกษตร ทำให้โรคข้าวที่มีอยู่เกิดการปรับตัวและก่อให้เกิดปัญหาโรคข้าวระบาดทำให้เกิดความสูญเสียผลผลิตซึ่งพบว่าการปลูกข้าวเกิดปัญหาโรคพืชระบาด ตั้งแต่ระยะเริ่มปลูกไปจนถึงระยะการเก็บรักษาผลผลิตโดยจัดกลุ่มโรคของข้าวได้ 3 กลุ่มคือ

1. โรคที่เริ่มระบาดจากเมล็ดขยายพันธุ์ (sclerotia) เช่น โรคกาบใบแห้ง (*Rhizoctonia solani*) และ โรคลำต้นเน่า (*Helminthosporium sigmoideum*)
2. โรคที่ติดกับเมล็ด เช่น โรคถอดฝักดาบ (*Fusarium fujiculi*) โรคกาบใบเน่า (*Sarocladium oryzae*) และ โรคเมล็ดด่างซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด
3. โรคที่เกิดแผลที่ใบ เช่น โรคไหม้ (*Pyricularia grisea*) และ โรคใบจุดสีน้ำตาล (*Helminthosporium oryzae*) (สมคิด, 2540)

โรคกาบใบแห้งของข้าวซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ระบาดในแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วทุกภาคของประเทศไทย นับเป็นโรคหนึ่งที่เกิดความเสียหายมากที่สุดต่อการเพาะปลูกข้าว การติดเชื้อจะรุนแรงที่สุดในระยะต้นข้าวแตกกอ ส่งผลให้ผลผลิตของข้าวเสียหายประมาณ 20-40% ปัจจุบันการป้องกันและควบคุมโรคนี้ใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราฉีดพ่น ซึ่งมีข้อเสียคือสารเคมี

ตกค้างในเมล็ดข้าว ในน้ำและดินเกิดผลกระทบต่อเกษตรกรผู้บริโภค และระบบนิเวศในระยะสั้น และระยะยาวรัฐบาลได้มีนโยบายลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535-2539) เป็นต้นมาโดยสนับสนุนการวิจัยเพื่อหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจและควรได้รับการส่งเสริมอย่างยิ่งเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight)

โรคกาบใบแห้งที่พบในข้าวเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kühn [telomorph: *Thanatephorus cucumeris* (Frank.) Donk.] โรคนี้พบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศ พบมากและเป็นรุนแรงที่เขตจังหวัดทางภาคกลาง เช่น จังหวัดปทุมธานี นนทบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ฉะเชิงเทรา โรคนี้จะระบาดรุนแรงในแปลงที่มีการปักดำถี่ เมื่อข้าวแตกกอมากๆ จะเหมาะแก่การเกิดโรคนี้ได้เป็นอย่างดี จากการทดลองพบว่าข้าวที่แตกกอมากเป็น โรคนี้ได้ง่าย เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคนี้เข้าทำลายต้นข้าวในระยะที่ข้าวแตกกอ โดยมีคซายพันธุ์สเคลอโรเทีย (sclerotia) ซึ่งลอยไปติดกับต้นข้าวในช่วงระดับน้ำแล้งออกเส้นใยแทงผ่านกาบใบ ก่อให้เกิดแผลที่กาบใบและลุกลามขึ้นไปข้างบน อาจก่อให้เกิดแผลที่ใบได้ เชื้อราสามารถสร้างเม็ดสเคลอโรเทียที่แผลและมีชีวิตอยู่ข้ามฤดู (กรมวิชาการเกษตร, 2531) ในช่วงฤดูฝนจะพบการระบาดของโรคนี้ได้มาก (Saha and Dutta, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่าอุณหภูมิและความชื้นสูงเหมาะต่อการเกิดโรคกาบใบแห้ง ส่งเสริมความกว้างของแผลและอัตราการหายใจของต้นข้าวให้เพิ่มขึ้น (Sarker *et al.*, 2003)

ลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในพวก Fungi imperfecti อยู่ใน Class Deuteromycetes Order Mycelia sterilia ไม่สร้าง spore แต่สร้างเฉพาะเส้นใยสีขาวฟูและ resistance structure ที่เรียกว่า sclerotium perfect stage ของเชื้อรานี้คือ *Thanatephorus cucumeris* จัดอยู่ใน Class Basidiomycetes เชื้อรานี้ในระยะที่ยังอ่อนอยู่เส้นใยไม่มีสี แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมเหลือง เส้นผ่าศูนย์กลาง 8-12 ไมโครเมตร เส้นใยมีผนังกันมี 3 ลักษณะ คือ แบบแรกเป็นเส้นใยที่มีลักษณะยาวตรง มีแขนงสั้นแตกออกจากเส้นใย แบบที่สองเป็นแบบ lobate mycelium สร้าง penetration pegs เข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชและทำให้เกิดจุดแผลเป็นหย่อมๆ มีขนาดรูปร่างของแผลแตกต่างกันไป บนลำต้นข้าวที่เชื้อราเข้าทำลายพบเส้นใยขาวปกคลุมเกือบทั่วลำต้น เส้นใยแบบที่สามมีลักษณะเป็น moniloid cell ซึ่งเจริญร่วมกันสร้างเป็น sclerotium มีลักษณะด้านบนกลมหรือค่อนข้างกลม ระยะแรกมีสีอ่อนและจะมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มในระยะต่อมา Bandyopadthay and Mukhopdhyay (1980) รายงานว่า

การเจริญของเชื้อราในระยะ perfect stage เชื้อราสร้าง basidia ที่มีขนาด 10-15x7-9 ไมโครเมตร sterigma ขนาด 4.5-7x2-3 ไมโครเมตร และ basidiospores มีขนาด 8-11x5-6.5 ไมโครเมตร การพัฒนาของ sclerotium ในระยะแรกไม่สามารถลอยน้ำได้ต้องใช้ระยะเวลา 15-30 วัน เซลล์รอบๆ เม็ด sclerotium จึงพัฒนาเป็นช่องว่าง ทำให้มีคุณสมบัติในการลอยน้ำได้และ sclerotium นี้จะเป็น primary inoculum ทั้งในฤดูปลูกและอยู่ข้ามฤดูปลูกข้าวได้ (สิริวัฒน์, 2536) ข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนมากทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเนื่องจาก ข้าวแตกกอเบียดกันหนาแน่นซึ่งเป็นผลทำให้ความชื้นสูงข้าวอ่อนแอต่อการทำลายของโรคและเส้นใยลุกลามจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งง่ายขึ้นเส้นใยที่โคนต้นจะลุกลามขึ้นข้างบนเกิดแผลลุกลามถึงกันทำให้กาบใบแห้งทั้งกาบใบและทำให้เป็นโรค

ลักษณะอาการของโรคกาบใบแห้งของข้าว

ในระยะแตกกอเต็มที่ และระยะออกรวงอาการของโรคนี้จะเริ่มครั้งแรกที่บริเวณต้นกล้าระดับน้ำ เนื่องจากว่าเมื่อดขยายพันธุ์ของเชื้อโรคจะลอยไปตามน้ำและติดอยู่ตามกาบใบของต้นข้าว อาการที่กาบใบ พบว่าเมื่อเริ่มจะเกิดเป็นแผลซ้ำๆ รูปไข่ สีเขียวปนเทากว้าง 1-4 มิลลิเมตร ยาว 2-10 มิลลิเมตร ตรงกาบใบบริเวณระดับน้ำต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นยาว 1-3 เซนติเมตร ความกว้างของแผลมักเป็นครึ่งหนึ่งของความยาว เมื่อมีความชื้นสูงจะมีเส้นใยปกคลุมอยู่ทั่วไปบนส่วนที่เป็นโรค ต่อมาแผลจะเปลี่ยนเป็นสีขาวปนเทาหรือสีฟางข้าว ขอบมีสีน้ำตาลไหม้ เมื่อเป็นมากขึ้น แผลจะลุกลามถึงกัน ทำให้รูปร่างไม่แน่นอน กาบใบแห้งและพบเม็ดสเคลอโรเทียมรูปไข่หรือกลม บนส่วนที่แห้งนั้น บนใบเกิดอาการขึ้นเมื่อเชื้อทำลายกาบใบหมดแล้วรูปร่างของแผลไม่แน่นอนเมื่อเป็นมากๆ แผลลุกลามถึงกัน แผลสีฟางข้าวขอบสีน้ำตาลแดง เมื่อใบแห้งก็พบสเคลอโรเทียมบนใบเช่นกัน อาการบนเมล็ด นอกจากทำลายกาบใบและใบแล้ว เชื้อรายังทำลายเมล็ดทำให้เมล็ดเสียเมล็ดลีบ

การแพร่ระบาดของโรคกาบใบแห้งของข้าว

ดังกล่าวแล้วว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคกาบใบแห้งของข้าวอยู่ในรูปเมื่อดขยายพันธุ์ ซึ่งอยู่ได้นานในตอซังหรือวัชพืช จากการศึกษาของ Sarker *et al.* (2003) พบว่าในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงนั้นเหมาะต่อการเกิดโรคกาบใบแห้ง สังเกตได้จากพัฒนาของแผลที่กว้างและยาวขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ

เมื่อฝนเริ่มตกเมล็ดขยายพันธุ์ซึ่งมีชีวิตอยู่ข้ามฤดูจะเข้าทำลายวัชพืชในนาหรือตามคันนาและเมื่อปลูกข้าว เม็ดขยายพันธุ์เหล่านั้นก็ลอยไปติดกับต้นข้าว และเข้าทำลายต้นข้าวที่มันเกาะอยู่ เส้นใยเจริญอย่างรวดเร็วบนผิวใบ หรือในเนื้อเยื่อของข้าว เมื่อข้าวอายุมากขึ้นเส้นใยที่อยู่บนผิวของกาบใบเจริญเร็วขึ้น เพราะความชื้นภายในกอข้าวมากขึ้นและก่อให้เกิดแผลได้มากขึ้น เชื้อราจะสร้างเม็ดขยายพันธุ์ขึ้นที่แผล และติดอยู่กับตอซังหรือร่วงลงสู่พื้นนา และมีชีวิตข้ามฤดูจนถึงฤดูทำนาต่อไปใหม่ได้อีก

ในนาปรังพบโรคนี้บ่อยและอาการของโรคก็ไม่รุนแรงเท่านาปี นอกจากนี้ยังพบอีกว่าข้าวพันธุ์ต้นสูงแสดงอาการของโรครุนแรงน้อยกว่าข้าวพันธุ์เตี้ย และข้าวเบาเป็นโรคกาบใบแห้งรุนแรง ข้าวพันธุ์กข แสดงปฏิกิริยาไม่ต้านทานต่อโรคนี้โดยเฉพาะพันธุ์กข7 จะแสดงอาการได้รุนแรงถึงใบธงพันธุ์กข13 ต้านทานโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2531) Sarker and Gupta (2002) รายงานเกี่ยวกับความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งมีความสัมพันธ์กับดินทรายโดยพบว่าโรคเกิดมากในดินที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity; WTC) ที่ 50-60% WTC และเกิดโรคกาบใบแห้งต่ำในสภาพดินที่มีค่า 100% WTC

โรคกาบใบแห้งพบมากและรุนแรงในภาคกลาง โดยมีงานวิจัยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ (วิจิตรา และคณะ, 2542; พากเพียร และคณะ, 2543) ปัจจุบันมีการวิจัยนำสารพวกซิลิกอนมาศึกษาการป้องกันกำจัด ซึ่งพบว่าเมื่อนำไปใช้กับพันธุ์ที่เป็น partial resistant จะสามารถควบคุมโรคได้ระดับหนึ่ง

การควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวและเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

การควบคุมด้วยวิธีเขตกรรม

การปลูกพืชหมุนเวียนเป็นวิธีการที่ได้ผลน้อย เนื่องจากเชื้อรา *R. solani* มีพืชอาศัยที่กว้างขวางและสามารถอาศัยกับเศษซากพืชได้ จากงานทดลองของ Belmar *et al.* (1987) พบว่าการปลูกพืชหมุนเวียน ข้าว-ถั่วเหลือง-ข้าว เป็นโรคกาบใบแห้งเจือปนมากกว่าการจัดระบบการปลูกพืช ถั่วเหลือง-ถั่วเหลือง-ข้าว และทุ้งหญ้า-ทุ้งหญ้า-ข้าว รวมทั้งไม่มีการปลูกข้าวในพื้นที่ 1-2 ปี ลดปริมาณ inoculum เพราะส่วนของเชื้อที่ติดกับตอซังข้าวและเม็ดสกลอโรเทีย เมื่อมีการไถพรวนจะฝังจมอยู่ในดินซึ่ง Mew and Rosales (1986) พบว่าเม็ดสกลอโรเทีย จะตายไปหลังการไถพรวนดิน 14 วัน ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อราอยู่ในสภาพขาดออกซิเจน (สิริวัฒน์, 2536) การเกิดโรคกาบ

ใบแห้งในนาขึ้นขึ้นอยู่กับวิธีการปลูกและความหนาแน่นของพืชปลูกซึ่งข้อมูลการสำรวจจากแปลงของเกษตรกรและแปลงทดลองพบว่าวิธีการย้ายปลูกทำให้ผลผลิตข้าวมีดัชนีพื้นที่ใบสูงขึ้นและผลผลิตน้ำหนักแห้งดี โดยส่งเสริมความต้านทานโรคกาบใบแห้งและเป็นการเพิ่มผลผลิตขึ้น (Yang *et al.*, 2008)

การควบคุมด้วยการใช้พันธุ์พืชต้านทาน

จากการศึกษาของ พากเพียร และคณะ (2526) บนข้าวพันธุ์กข7 ในสภาพนาดำโดยการปลูกเชื้อรา *R. solani* พบว่าถ้าโรคนี้อมีผลลุกลามขึ้นไปถึงกาบหุ้มใบธงและใบธงของต้นข้าว จะทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 40% ในปี 2528 พากเพียรและคณะ พบว่าข้าวพันธุ์กข21 ถ้าเป็นโรคกาบใบแห้งและมีระดับความสูงของแผล 60 เซนติเมตร จะมีผลทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 22.8% ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานพันธุ์ข้าวต้านทานโรคกาบใบแห้ง พันธุ์ข้าวที่ปลูกในอเมริกาใต้มีตั้งแต่พันธุ์อ่อนแอจนถึงพันธุ์ที่มีความต้านทานบ้าง มีรายงานผลผลิตลดลง 8% ในข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอปานกลาง และผลผลิตลดลงมากกว่า 30% ในพันธุ์ที่อ่อนแอมาก ในสภาพแปลงนาที่มีการปลูกโรค (Groth, 2008)

การควบคุมด้วยสารเคมี

ในระหว่างปี ค.ศ. 1970 สารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้ง คือ benomyl (Kannaiyan and Prasad, 1976; Roy and Saikia, 1976) และยังมีการใช้สารปฏิชีวนะในการช่วยยับยั้งการเกิดโรคเช่น Validamycin, Polyoxin ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และยังมีสารที่ใช้ทั่วไป คือ Kitazin, Hinosan และ Dithane M-45 จากการรายงานของ IRRI (1978) พบว่า Iprodione มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งและควบคุมการเกิดโรคนี้ Suryadi and Sukamandi (1989) พบว่าการใช้สาร Triazole มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งและลดการขยายแผลของโรคกาบใบแห้ง รองลงมาได้แก่ chlorothalonil, mancozeb และ maneb+zineb การใช้ Vitavax คลุกเมล็ดปอแก้วสามารถลดการเกิดโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ผลดี นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น วาเลตามัยซิน, โปรพิโคนาโซล เพนไซคูรอน (25% WP) หรือเอดิเฟนฟอส พ่นบริเวณที่เริ่มพบโรคระบาด ไม่จำเป็นต้องพ่นทั้งแปลงนา เพราะโรคกาบใบแห้งเกิดเป็นหย่อมๆ

การควบคุมโรคโดยใช้หลายวิธีร่วมกัน (Integrated disease management: IDM)

การจัดการโรคภายในแปลงโดยใช้วิธี IDM ซึ่งเป็นการใช้หลายวิธีร่วมกัน โดยมีการใช้สารเคมีร่วมกับการใช้วิธีทางธรรมชาติ การควบคุมโรคโดยชีววิธีและการใช้พืชต้านทาน ทำให้วิธี IDM มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (Groth and Bond, 2007)

การควบคุมโรคโดยใช้ Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลาย species และหลากหลายสายพันธุ์ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* และ *Serratia* เป็นต้น โดย PGPR จะสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. พวกที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช หรือที่เรียกว่าความสัมพันธ์แบบ Symbiosis
2. พวกที่อาศัยแบบอิสระในดิน (Free-living form) และพบอยู่ใกล้ๆบริเวณรากพืช โดยแบคทีเรียจำพวก PGPR ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และช่วยให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น (Mew and Rosales, 1992)

การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control) หมายถึง การลดปริมาณของ inoculum หรือการลดปฏิกริยาการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกริยาหรือระยะพักตัวด้วยการใช้จุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง หรือมากกว่า 1 ชนิด ให้บรรลุผลสำเร็จในสภาพธรรมชาติหรือด้วยการจัดการสภาพแวดล้อมของพืชอาศัย หรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ กลไกของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อโรคพืชมีดังนี้ 1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) กลไกนี้เกิดจากการต่อต้านของจุลินทรีย์ antibiotic bacterium และผลิตสาร secondary metabolite ซึ่งมีฤทธิ์ไปทำลายเชื้อโรคเป้าหมายได้ 2. การแย่งแย่งอาหาร (competition) 3. การเป็นปรสิต (parasitism) (สุตฤดี และคณะ, 2541)

เชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญ และควบคุมเชื้อรา *R. solani* ได้แก่ *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Penicillium* spp., *Myrothecium* spp. (Cook

and Baker, 1983) เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยเริ่มจากการพันรัดเส้นใย ซึ่งเกิดขึ้นได้ 3 ลักษณะคือ 1. ลักษณะการแตกแขนงสั้นๆ จากเส้นใยแล้วไปพันรัดเส้นใยเชื้อราอื่น 2. ลักษณะเส้นใยพันรัดโดยตรง 3. ลักษณะที่เชื้อราเจริญขนานกันไปกับเชื้อราอื่นๆ แล้วแตกแขนงเป็นช่วงๆ พันรัดเส้นใยเชื้อราเหล่านั้น Harder *et al.*, 1979; Chet and Baker, 1980 พบว่า *T. harzianum* ผลิตน้ำย่อยสองชนิด คือ เอนไซม์ไคไนเนสและเอนไซม์ β -1-3 glucanase เมื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราอื่นแล้วก็เอาไปใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนต่อไป

นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *T. harzianum* ขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดิน pH ที่เหมาะสมคือ 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมมากกว่า 27 องศาเซลเซียส ความชื้นในดินค่อนข้างสูงช่วยส่งเสริมการเจริญของ *T. harzianum* Chet *et al.* (1983) ได้ทดลองใช้ *T. harzianum* กับต้นไทรส พบว่าสามารถลดการเกิดโรคเนื่องจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* และ *R. solani* ได้

การใช้จุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากเชื้อรา เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. กลูกเมล็ดข้าวโพดก่อนนำไปปลูกในดินที่มีเชื้อ *R. solani* และ *S. rolfsii* 3 isolate พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ลดการเกิดโรคต้นกล้าเนาได้ ลักษณะพิเศษของเชื้อ *Bacillus* sp. คือสามารถสร้างสปอร์ที่พักตัวได้ ทนความร้อนและการอบดินเชื้อเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่ง *Bacillus* sp. สามารถนำไคตินและสารที่ย่อยสลายไปเป็นองค์ประกอบของตัวเองได้ (Mitchell and Alexander, 1963) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PM5 ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตสารได้ 2 ชนิด คือ SPM5C-1 และ SPM5C-2 ซึ่งเป็นสารประกอบ lactone และ ketone carbonyl ตามลำดับ เมื่อนำสารทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยวิธี agar diffusion พบว่าสาร SPM5C-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และเชื้อรา *R. solani* ส่วน SPM5C-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae* ได้เพียงอย่างเดียว เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน พบว่าการพ่นด้วย SPM5C-1 ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดโรคไหม้ และโรคกาบใบแห้งได้ 76.1% และ 82.3% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวโดยสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Prabavathy *et al.*, 2006)

จุลินทรีย์ควบคุมโรค (BCAs) ในระบบการปลูกข้าวพบว่ามีหลายชนิด เมื่อกลูกเมล็ดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (BCAs) พบว่ากระตุ้นการเจริญมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง (*Rhizoctonia solani* AG1) แต่ข้อมูลที่ได้ไม่สอดคล้องกันถ้าใช้จุลินทรีย์เพียงอย่างเดียวในแปลงที่

มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคอยู่ในระหว่าง 50-90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจึงมีการใช้สารเคมีร่วมด้วยเช่น Jingangmycin ที่มีใช้ในประเทศจีนและ Validamycin ที่มีใช้ในประเทศเวียดนาม ถูกนำมาผสมร่วมกับ BCAs พบว่ามีประสิทธิภาพและลดความแปรปรวนในสภาพแปลงทดลอง หน้าที่ของ BCAs ในการจัดการโรค ได้แก่ ส่งเสริมการออกของเมล็ดข้าวและเพิ่มความแข็งแรงของต้นกล้าข้าว เป็นต้น (Mew *et al.*, 2004) พบว่า *B. cepacia* สายพันธุ์ In-b-6854 ลดการเกิดโรคกาบใบแห้งซึ่งพบมากในช่วงข้าวแตกกอและระยะเก็บเกี่ยวโดยดูจากผลผลิตข้าว

อย่างไรก็ตามนอกจากเชื้อราปฏิปักษ์แล้ว ยังพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค 4 ลักษณะ (นิพนธ์, 2546) ดังนี้

1. การแข่งขันกับเชื้อโรค (Competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น สำหรับการแข่งขันที่พบมากคือการที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืช เช่น การที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* ผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก (Iron, Fe^{+3}) จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* สามารถใช้ธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถเข้าทำลายรากของข้าวสาลีได้ ส่งผลให้ข้าวสาลีเจริญเติบโต และมีผลผลิตดีขึ้น ซึ่งนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะนี้ว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียนี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizosphere) (Schipers *et al.*, 1987)

2. การผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) เชื้อแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายมากที่สุด ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเอามาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีนี้นั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่น่าสนใจ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ด้วยสารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่นำมา

ผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน นอกจากนี้กลไกนี้ยังเป็นกลไกแรกที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี นั่นคือการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ซึ่งผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืช ช่วยป้องกันการเกิดโรคกับต้นพืชได้ (Thomson, 1987; Penyalver *et al.*, 2000) หรือในกรณีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylate ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรค Take-all ของข้าวสาลีได้ถึง 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Cook, 1993)

3. การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) สามารถเข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นปัจจุบันพบไม่มากนัก และการใช้เพื่อควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่ยังมีรายงานการเป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia uredinolytica* ที่เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม (rust) เชื้อแบคทีเรีย *Bdellovibrio bacteriovorus* ที่เป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *glycinne* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *B. penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่ได้ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจังจึงนับว่าเป็นส่วนหนึ่งที่น่าศึกษาพัฒนานำมาใช้ในการควบคุมโรคต่อไป

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induce disease resistance) เป็นกลไกที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค เมื่อนำมาทำให้สูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกแดง (cucurbit) จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช และช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine แล้วปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการควบคุมโรคเป็นจำนวนมากคือ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* sp. เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกเปปไทด์ และ โพลีเปปไทด์ โดยสารปฏิชีวนะที่

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ผลิตขึ้นและสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ คือ pyoluteorin, 2,4-diacetylphluoroglucinol (DAPG), siderophore, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid (PCA) anthranilic acid (Thomashow and Weller, 1990; Schnider *et al.*, 1995; Bakker *et al.*, 2002; Nagarajkumar *et al.*, 2004) phenazine-1-carboxamide (PCN) (Chin *et al.*, 2001) viscosinamide (Thrane *et al.*, 2000) chitinase, β -1,3 glucanase, salicylic acid (SA) และ hydrogen cyanide (HCN) (Nagarajkumar *et al.*, 2004)

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* นั้นมีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ถึง 65-70 ชนิด (Lee and Jame, 1985) โดยสารที่ผลิตขึ้นและสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ ได้แก่ Iturin A, Surfactin (Asaka and Shoda, 1996) bacilysin, fengymycin A และ B (Loeffler *et al.* 1986) baciliomycin (Chevanet, 1986) albolutin, bacillin, fungistatin (Katz and Demain, 1977) รวมทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ β -glucanase (Fergus and Richard, 1990) chitinase และ β -1,3 glucanase ได้ (Marten *et al.*, 2000) และพบสาร zwittermicin A ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* (He *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ก็สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ได้เช่นกัน (Reyes-Ramírez *et al.*, 2004)

มานะ และคณะ (2536) ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกจากธรรมชาติ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหลายชนิด เช่น เชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้ง เชื้อรา *P. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ (blast) และเชื้อรา *C. lunata* สาเหตุโรคเมล็ดดำของข้าวได้ และจากรายงานในต่างประเทศพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* ไอโซเลต PfMDU2 ที่แยกจากดินบริเวณ rhizosphere ของต้นข้าวมีการผลิต chitinase, β -1,3-glucanase, siderophore, salicylic acid และ hydrogen cyanide ในปริมาณสูง และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. solani* ได้ดีที่สุด (Nagarajkumar *et al.*, 2004)

และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี oxalic acid และสามารถลดความเป็นพิษของสารชนิดนี้ที่เชื้อรา *R. solani* สร้างขึ้น เพื่อใช้ในการก่อให้เกิดโรคกาบใบแห้งในข้าว รวมทั้งได้ทำการศึกษาว่า gene ที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของ oxalic acid อยู่บน plasmid หรือไม่ ซึ่งพบว่าในสายพันธุ์ที่ไม่มี plasmid (PfMDU2P) นั้นไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี oxalic acid และไม่สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งได้เลย และพบว่ากรรมวิธีที่ treat เมล็ดข้าวด้วยสายพันธุ์ PfMDU2 ร่วมกับการใส่ลงดินมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้สูงที่สุด (Nagarajkumar *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* สายพันธุ์ B2 ที่แยกจากบริเวณผิวใบของมะเขือเทศ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถควบคุมโรค cyclamen soil-borne สาเหตุจากเชื้อรา *R. solani* AG4 และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* โรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* และโรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง (Someya et al., 1997; Someya et al., 2000; Someya et al., 2002) และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. marcescens* สายพันธุ์ B2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของเมล็ด sclerotium ของเชื้อรา *R. solani* (Someya et al., 1997; 2000)

เช่นเดียวกับสุภาณี และคณะ (2539) ที่ได้ทำการทดลองและพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ No.26 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของเมล็ด sclerotium เมื่อนำเมล็ด sclerotium ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของเมล็ด sclerotium ถูกทำลายเสียหาย เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ No.26 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้งโดยวิธีลาดดินพบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้

นอกจากนี้สุภาณี และคณะ (2534) ทำการทดสอบการควบคุมโรคโดยวิธีการคลุกเมล็ด พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 ช่วยลดอัตราการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าได้ดี ไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและความแข็งแรงของเมล็ด ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่มีการคลุกเชื้อแบคทีเรีย และมีความเหมาะสมที่จะใช้ในสภาพที่มีโรคระบาดหรือมีโรคที่ติดมากับเมล็ดสูงขณะที่ พากเพียร และคณะ (2544) ศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว พบว่าชีวภัณฑ์ 4 ชนิด คือ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP และ Agroguard Liq. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดี

ต่อมา Someya et al. (2003) ได้นำเชื้อแบคทีเรีย *S. marcescens* สายพันธุ์ B2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* AG-1 IA พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เมื่อปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิกรณ์ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เมื่อปลูกเชื้อปฏิกรณ์ก่อนเชื้อโรค 28 วัน และพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อปฏิกรณ์จากดินบริเวณเขตอิทธิพลรอบราก เมื่อปลูกเชื้อปฏิกรณ์ไปแล้ว 28 วัน

นอกจากการนำจุลินทรีย์ปฏิกรณ์มาใช้ในการควบคุมโรคของข้าวแล้ว ยังพบว่าการใส่ปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สารประกอบซิลิกอนสามารถลดโรคกาบใบแห้ง และเพิ่มผลผลิตของข้าว

ได้ (วิชชุตา และคณะ, 2548) รัศมี และคณะ (2542) ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิดในนาข้าว เช่น *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani* เป็นต้น ส่วนสารสกัดจากพืชมี ไพล วานน้ำ ทองพันชั่ง และข่า ที่ใช้ได้ผลในพืชหลายชนิด ส่วนสารสกัดจากธรรมชาติ มีการศึกษาการใช้ภูไมท์ ซีโอไลท์ สเม็คไทต์ สารประกอบซิลิกา บัวยอินทรีย์น้ำ (Bacteria-Mineral-Water) ในการลดความเสียหายจากโรคพืช

จึงเห็นได้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงมีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากรากข้าวที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง

การป้องกันกำจัดโรคกาบใบแห้งของข้าวโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์

นลินี และคณะ (2534) ได้ศึกษาป้องกันกำจัดโรคข้าวที่สำคัญโดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) *Bacillus subtilis* 2 สายพันธุ์ ที่ได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวในปี 2530 และทดสอบความสามารถในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีในห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืชพบว่า *B. subtilis* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ ส่วนการทดสอบความสามารถในการเป็น root colonizer โดยใช้วิธีการคลุกเมล็ดพันธุ์ข้าวพบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็น root colonizer ที่ดีซึ่งไม่มีผลเสียต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ด

Pengnoo *et al.* (2000) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว โดยเริ่มตั้งแต่การทดสอบและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จากจำนวน 323 ไอโซเลท ที่ได้จากดินในนาข้าวของจังหวัดต่างๆในภาคใต้ พบว่า *B. megaterium* มีฤทธิ์ในการเป็นปฏิปักษ์ได้สูงสุด นอกจากนี้การใช้ *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้ง ส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นกลไกความต้านทานในพืช โดยพบสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวและในแปลงนามีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคกาบใบแห้งช่วงเวลาใช้เชื้อแบคทีเรียเป็นช่วงที่ข้าวอยู่ในระยะข้าวแตกกอ ซึ่งเป็นระยะที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด (Lai Van E *et al.*, 2001)

ลัดดา และคณะ (2536) พบเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ PTLR 9218 และเชื้อรา *Trichoderma konigii* สายพันธุ์ PTLR 9201 ที่แยกได้จากรากข้าวและดินแปลงทดลองโรคข้าว

ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ทดสอบการป้องกันกำจัดโรคกาบใบแห้งของข้าวโดยสำรวจและแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากข้าวในนา และส่วนของต้นข้าวทั้งที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคกาบใบแห้ง ซึ่งเกิดจากเชื้อราสาเหตุคือ *R. solani* เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* spp. มีคุณสมบัติยับยั้งหรือต่อต้านการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เมื่อนำมาทดสอบโดยการแช่เมล็ดข้าวในแบคทีเรีย (bacterization) ประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนนำเมล็ดไปปลูกในดินที่ปลูกเชื้อราพร้อมกับสาร suspension ของเชื้อแบคทีเรียบนต้นข้าวในโรงเรือนพบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลท ที่สามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งบนต้นข้าวได้ในฤดูนาปีและฤดูนาปรัง ปี พ.ศ. 2536 ได้คัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ไปทดสอบกับข้าวพันธุ์ กข.23 ในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีโดยเปรียบเทียบกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช 2 ชนิดคือ เบนโนมิลและวาลิดามัยซิน พบว่าแบคทีเรียเช่นนี้ลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่แตกต่างจากแปลงเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่ตัวเลขค่าเฉลี่ยมีแนวโน้มว่าให้ผลดีกว่าแปลงเปรียบเทียบคือเป็นโรคน้อยกว่าให้ผลผลิตสูงกว่า (สมคิด, 2540)

การใช้แบคทีเรียบริเวณรากพืช (rhizobacteria) ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค เช่น *P. putida* และ *Serratia marcescens* ในการชักนำให้แตงกวาด้านทานต่อโรค Fusarium wilt สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Liu *et al.*, 1995a) และโรคแอนแทรกคโนส สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum orbiculare* ได้ โดยพบว่ายังมีความต้านทานของโรค (induced systemic resistance) ของต้นแตงกวาอยู่ ถึงแม้ว่าปริมาณของแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดสอบจะลดปริมาณลงไปแล้วก็ตาม (Liu *et al.*, 1995b) และพบว่าการใช้ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ปลูกเมล็ดอย่างเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับการรดดิน สามารถชักนำให้ต้นแตงกวาเกิดความต้านทานต่อโรคแอนแทรกคโนส (Wet *et al.*, 1996) โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส cucumber mosaic virus (CMV) โรคใบจุดเหลี่ยมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *lachrymans* และแมลง *Acalymna vittatum* และ *Diabrotica undecimpunctata* ได้ (จิระเดช, 2549)

แหล่งของไคติน

ไคตินพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในพืชบางชนิดอาจมีไคตินแทนเซลลูโลสหรือเกิดร่วมกับเซลลูโลส (วิสิฐ และ ลูกจันทร์, 2533) ส่วนใหญ่ในสัตว์พบไคตินอยู่กับคิวติเคิล (cuticle) ที่ผิวหนังของอพิธิเลียม (epithelium) ในยีสต์พบในส่วนที่กำลังแตกหน่อของยีสต์ที่ใช้ทำเบียร์และไวน์ แต่ส่วนมากจะพบไคตินมากในเปลือกของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้ง ปู ปลาหมึก หอย โปรโตซัว และ nematode (Cody *et al.*, 1990) ในโครงสร้างชั้นนอกของแมลง เชื้อรา ในสาหร่ายบางชนิด นอกจากนี้ยังพบในเห็ดหลายชนิด (อุดมชัย, 2535)

แหล่งของเอนไซม์ไคตินเนส

เอนไซม์ไคตินเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน จัดเป็น PR โปรตีน ที่พืชสร้างขึ้นตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อโรค และสภาวะกดดันต่างๆ ยังสามารถถูกสร้างขึ้นมาตอบสนองต่อฮอร์โมน และการเจริญเติบโตภายในพืชปกติ (healthy plants) Mathieu และคณะ (1989) ศึกษา PR โปรตีน สร้างอะพอพลาส (apoplast) ของใบมะเขือเทศ พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์ β -1, 3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อป้องกันตนเองจากการบุกรุกของเชื้อโรค

เอนไซม์ไคตินเนสพบได้สิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ในพืช (Monreal และ Reese, 1969) จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไคตินเนสที่สำคัญ พบเอนไซม์นี้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ จากรายงาน Deshpande (1986) พบไคตินเนสในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Serratia*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Beneckea*, *Aeromonas* และ *Streptomyces* พบไคตินเนสในเชื้อราเช่น *Trichoderma*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Mucor*, *Beauveria*, *Lycopodon*, *Aspergillus*, *Mrothecium*, *Conidiobolus* และ *Agaricus* ในยีสต์พบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Correa *et al.*, 1982)

Vyas and Deshpande (1989) พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ยกเว้นจุลินทรีย์บางชนิดผลิตเอนไซม์ไคตินเนสอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น *M. mucedo* และ *S. cerevisiae* เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโคตินของจุลินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโคติน มีหลายประการที่สำคัญ คือ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่า pH และอุณหภูมิ ซึ่งผลของปัจจัยเหล่านี้จะต่างกัน ไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ Monreal and Reese (1969) ได้รายงานว่าการผลิตเอนไซม์โคตินได้ดีที่สุด เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีโคตินเป็นสับสเตรท โดยปริมาณโคตินที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์เหมาะสำหรับรา *Aspergillus fumigatus* ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอีกเมื่อใส่ yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปไนปริมาณ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า pH ที่ทำให้เกิดกิจกรรมโคตินของ *Serratia marcescens* ดีที่สุดคือ 7.0 และ ค่า pH 4.5 เหมาะสำหรับเชื้อรา และกลูโคส สาร metabolites บางชนิดก็มีผลต่อการผลิตโคตินของ *S. marcescens* โดยพบว่าเมื่อใส่กลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจเกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ เนื่องจากกลูโคสที่ใส่ทำให้ค่า pH ลดลงมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเกิด catabolite repression ทำให้มีการผลิตเอนไซมน้อยลง

Sherief *et al.* (1991) รายงานว่า *A. carneus* ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ซึ่งใกล้เคียงกันกับค่า pH ที่เหมาะสมของ *A. fumigatus* ที่ Monreal and Reese (1969) ได้รายงานไว้ และ *Trichoderma harzianum* ที่ Elad *et al.* (1982) ได้รายงานไว้ แหล่งคาร์บอนที่สำคัญคือ โคตินปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract หรือ peptone, meat extract, corn steep, soybean, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ยูเรียและ NaNO_3 แต่แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับ *A. carneus* คือ yeast extract รองลงมาคือ peptone และ meat extract ตามลำดับ ส่วน surfactant เช่น tween 80 หรือ tween 20 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลในการเพิ่มการสังเคราะห์ของเอนไซม์แต่ช่วยให้การส่งผ่านของเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้น

คุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยโคติน

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โคตินได้แตกต่างกันและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ก็มีความแตกต่างกัน โดยพบว่า พบว่าช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคตินของ *Streptomyces* sp. คือ pH 6.5-7.5 แต่ pH ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์โคตินสูงสุดคือ pH 7.0 และ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าช่วง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โคตินที่ได้จาก *Serratia marcescens* คือ pH 6.4 และ 50 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมเอนไซม์จะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยที่ pH ต่ำกว่า 4.8 หรือมากกว่า 7.2

Yabuki *et al.* (1986) ศึกษาการแยกเอนไซม์ไคตินเนสและลักษณะของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* subsp *anaerogenes* A52 โดยวิธี affinity adsorption ของไคตินบนไคติน จากนั้นทำไคตินเนสให้บริสุทธิ์ต่อด้วย ion-exchange chromatography (CM-Sephadex C50) แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis หาค่า isoelectric point ของไคตินเนสได้ 4.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของไคตินเนส คือ 45 องศาเซลเซียส

Ueda and Arai (1992) ศึกษาไคตินเนสจาก *Aeromonas* sp. โดยผ่าน filtration column ด้วย gel ต่างๆ คือ Sp-Sephadex C-50, Sp-Sephadex S-200 และใช้ chromatofocusing ion exchange แยกเอนไซม์ได้ 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์

Ohtakara *et al.* (1979) รายงานการแยกเอนไซม์จาก *Vibrio* sp. โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-25, Hydroxylapatite และ gel filtration (Sephadex G-100) ดูความบริสุทธิ์บน gel electrophoresis พบว่า pH ที่เหมาะสมคือ 6.0-8.0 เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรทและ 10.5 สำหรับ glycol chitin

การสกัดเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อใช้เป็นสารชีวภาพควบคุมเชื้อโรคพืช จากการศึกษพบว่า การใช้เอนไซม์ไคตินเนสจาก *S. marcescens* ควบคุมเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ที่ทำให้เกิดโรครินถั่ว และ *Rhizoctonia solani* ที่ทำให้เกิดโรครินฝ้าย (Ordentlich *et al.*, 1988) เอนไซม์ไคตินเนสจาก *Arthrobacter* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคน้ำในสน (Barrow Broadbush and Kerr, 1981) และ *Trichoderma harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชทางเศรษฐกิจ (Ridout *et al.*, 1988) เชื้อราที่เป็นโรคต่อแมลง เช่น *Beauveria bassiana* และ *Verticillium lecanii* เป็นปรสิตที่พบในเพลี้ย แมลงปีกแข็งที่ทำลายมะเขือเทศและอ้อย โดยต้นพืชเหล่านี้มีไคตินอยู่ในส่วนของ cuticle และเอนไซม์ที่มีบทบาท คือ เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ PGPR บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้โดยไปย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราเหล่านั้น โดยมีรายงานว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria บางสายพันธุ์เช่น *Pseudomonas stutzeri* สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular chitinase และเอนไซม์ laminarinase ซึ่งย่อยเส้นสายของเชื้อรา *F. solani* สาเหตุของโรครากเน่าได้ (Lim *et al.*, 1991) มีรายงานว่า PGPR สายพันธุ์ *P. cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่ย่อยเส้นสายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเช่น *R. solani*, *S. rolfsii* และ *Pythium ultimum* ได้ (Fridlender *et al.*, 1993)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สำหรับตรวจสอบเอนไซม์

- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่อง Refrigerated centrifuge
- Micro tube, tube, pipette man, beaker
- Vortex
- Hot plate stirrer
- Water bath shaker
- เครื่อง spectrophotometer

สารเคมี

- สารละลาย alkaline copper
- สารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent
- Bovine serum albumin (BSA)
- สารละลาย copper reagent
- สารละลาย Nelson's reagent
- สารละลาย Laminarin
- 0.05M sodium acetate buffer pH 5.5

วิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว

1.1 การแยกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

แยกเชื้อรา *R. solani* จากกาบใบข้าวบริเวณที่แสดงอาการของโรคกาบใบแห้งด้วยวิธี tissue transplanting technique (ดัดแปลงจาก Agrios, 1997) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคกาบเกี่ยวกับส่วนพืชปกติขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำส่วนพืชดังกล่าวแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 0.525% เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ซับชิ้นส่วนพืชให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาด แล้วนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จำนวน 5 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (จานเลี้ยงเชื้อ) ก่อนนำจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนของพืชเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน และแยกเชื้อรา *R. solani* ให้บริสุทธิ์ (ไพโรจน์, 2525)

1.2 การเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืชเจริญอยู่ จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อ ตักชิ้นวุ้นอาหารและนำไปวางบนอาหารเอียง potato dextrose agar (PDA slant) บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (Intana, 2003)

1.3 การพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation)

เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ตัดชิ้นวุ้นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำเชื้อรา *R. solani* ใส่ในถุงพลาสติกที่บรรจุด้วยเมล็ดข้าวเปลือกดกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 7 วัน ให้เชื้อราเจริญสร้างเส้นใยจนเต็มถุง นำเชื้อรา *R. solani* ที่เจริญจนเต็มถุง บรรจุในถุงซองชาขนาดเล็กถุงละ 2 กรัม ปลุกเชื้อรา *R. solani* ด้วยการเห็บห่อเชื้อไว้กลางกอข้าวอายุ 45 วัน จากนั้นตรวจดูอาการโรคที่เกิดขึ้นและแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อโรคชนิดเดียวกัน

2. การแยกแบคทีเรียย่อยโคตินจากรากข้าวในแหล่งปลูกตามธรรมชาติ

2.1 การแยกแบคทีเรียย่อยโคตินจากรากข้าว

แยกแบคทีเรียจากบริเวณรากของข้าวตามแหล่งปลูกธรรมชาติในข้าว 3 ระยะ คือ ข้าวระยะต้นกล้า (seedling stage) ข้าวระยะแตกกอ (tillering stage) และข้าวระยะตั้งท้อง (booting stage) มาตัดให้มีขนาดเล็กประมาณ 1.0 เซนติเมตร นำส่วนรากข้าวทุกระยะดังกล่าว แช่ใน sodium hypochlorite 0.525% เป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ซับชิ้นส่วนรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำรากข้าววางบนอาหารจำเพาะ (chitin agar selective medium) (วาสนา, 2539) จำนวน 10 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (จานเลี้ยงเชื้อ) บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง 24-72 ชั่วโมง ก่อนแยกเชื้อแบคทีเรียในจานเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษา

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate ด้วยการใช้ loop แต่ละเซลล์แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมา streak บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อนบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop แต่ละโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บในตู้เย็นเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

2.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียย่อยโคติน

ศึกษาลักษณะและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ ทดสอบแกรมของแบคทีเรียด้วย 3% KOH (potassium hydroxide) และการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย การสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้อมแกรมและจัดจำแนกชนิดโดยใช้ระบบการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (Biolog Microlog System, Hayward, CA, USA) (วิชัย, 2537)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในระดับห้องปฏิบัติการ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินบนอาหารจำเพาะ (chitin agar selective medium) (ภาคผนวก ก) โดยนำแบคทีเรียจากรากข้าวที่แยกได้บริสุทธิ์มา cross streak บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยและโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียมาจุดบนอาหารคัดเลือกเชื้อในลักษณะ point inoculation บนอาหารจำเพาะ (วาสนา, 2539) เพื่อใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียย่อยไคติน โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสบนที่กผลและหาสัดส่วนการย่อย colloidal chitin บนอาหารแข็งโดย

สัดส่วนการย่อย colloidal chitin บนอาหารแข็งจากสูตร = CZ/CS

CZ = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone = cz)

CS = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (colony size = cs)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizotonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียย่อยไคตินมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. solani* ด้วยวิธี dual culture โดยใช้เข็มเขี่ยและเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีอายุ 48 ชั่วโมง และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท บ่มไว้ 1 วัน ก่อนตัดเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้ออาหาร PDA บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องวัดรัศมีการเจริญของเชื้อราที่ออกมาจากจุดศูนย์กลางทุกวันเป็นเวลา 3-5 วัน คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยไคตินได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีด้วยเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป (วรรณวิไล และ จิระเดช, 2543) บันทึกการเจริญของเส้นใยเชื้อราและนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีทดสอบ

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าววิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($P=0.05$) เพื่อทำการทดลองต่อไป

5. อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินต่อการงอกของเมล็ดข้าว และการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

5.1 การเตรียมเมล็ดข้าว

นำเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ด้วยสารละลาย sodium hypochlorite 0.525% ก่อนผึ่งเมล็ดข้าวให้แห้งแล้วนำไปทดสอบต่อไป

5.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคติน

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏโดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร nutrient glucose broth (NGB) นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (CFU/ml) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2$)

5.3 การทดสอบอิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินต่อการงอกของเมล็ดข้าว

ห่อเมล็ดข้าวเปลือกที่สมบูรณ์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยผ้าดิบให้มีลักษณะเป็นตุ่มขนาดตุ่มละ 10 กรัม ก่อนแช่ในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 12 ชั่วโมง ยกขึ้นให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาแช่ต่อในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินที่คัดเลือก (เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียตามข้อ 5.2) กรรมวิธีต่างๆ จำนวน 20 ไอโซเลท ส่วนกรรมวิธีควบคุมแช่เมล็ดข้าวในน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแช่เมล็ดข้าวไว้ในเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 30 นาที ยกขึ้นให้สะเด็ดน้ำเชื้อจากนั้นบ่มเมล็ดข้าวในห่อผ้าที่ขึ้นไว้ 12 ชั่วโมง ก่อนตรวจนับเปอร์เซ็นต์ความงอกจากเมล็ดข้าว 10 กรัม ในแต่ละกรรมวิธี จากนั้นนำมาเพาะลงบนกระดาษเพาะเมล็ด (tissue towel) เพื่อศึกษาการเจริญของต้นกล้าข้าว

โดยในแต่ละกรรมวิธีแบ่งออกเป็น 4 ชั่วโมง ใช้เมล็ดข้าว 100 เมล็ด/ 1 ชั่วโมง เติมน้ำให้กระดาษาเพาะมีความชื้นตลอดการทดลองวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบเมล็ดที่มีรากและลำต้นงอกออกมาจากเปลือกของเมล็ดข้าวโดยสมบูรณ์ วัดความยาวราก โดยวัดจากโคนรากถึงปลายราก วัดความสูงของกล้าข้าว โดยวัดจากโคนต้นที่ติดกับเมล็ดจนถึงยอดสูงสุด (จิระเดช, 2548)

6. การพัฒนาแบคทีเรียย่อยไคตินให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

คัดเลือกแบคทีเรียย่อยไคตินที่มีประสิทธิภาพมาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเพื่อติดตามตรวจสอบปริมาณประชากรของแบคทีเรียโดยเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคติน (ตามวิธีการในข้อ 5.2) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปหยดและเกลี่ยบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญได้บนอาหารดังกล่าว มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ก่อน 2-3 ครั้ง แล้วจึงนำไปเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเพื่อนำไปเกลี่ยบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 5, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) (จิรัชสา, 2546) คัดเลือกแบคทีเรียย่อยไคติน 10 ไอโซเลท นำมาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) โดยแบคทีเรียในแต่สายพันธุ์ก็จะมี การคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* เปรียบเทียบกับโคโลนีที่เป็น wild type อีกครั้งและเลือกโคโลนีที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เพื่อนำไปทดสอบอิทธิพลของแบคทีเรียย่อยไคตินต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้าต่อไป โดยคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ของแบคทีเรียย่อยไคตินมาสายพันธุ์ละ 10 โคโลนี เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* เปรียบเทียบกับโคโลนีสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยไคตินในการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเอส

7.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคติน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินซึ่งผ่านการพัฒนาให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin 10 ไอโซเลท คือ PT1-3M, PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M, PT24-3M, PT25-6M, PT49-9M, PT56-4M และ PT70-8M เขย่าเลี้ยงในอาหาร NGB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ (ตามข้อ 5.2)

7.2 การเตรียมต้นข้าว

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มาห่อด้วยผ้าดิบแล้วแช่ในน้ำสะอาด 12 ชั่วโมง ยกขึ้นให้สะเด็ดน้ำแล้วบ่มเมล็ดข้าวในห่อผ้าขึ้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะในกระบะเพาะจำนวน 20 หลุม ซึ่งบรรจุวัสดุเพาะดินเหนียวหนึ่งผ่าเพื่อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 24 ชั่วโมง โดยเพาะ 1 เมล็ด/หลุม ย้ายปลูกลงในกระถางดำกันกระถางไม่มีรูขนาด 10 นิ้ว (ปริมาตร 6 ลิตร) เมื่อกกล้าข้าวมีอายุได้ 15 วัน ดูแลจนต้นข้าวอายุ 20 วัน จึงฟั่นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคตินและเก็บตัวอย่างต้นข้าวที่ 0-10 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสต่อไป

7.3 การตรวจสอบ specific activity ของเอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นข้าว (อายุ 20 วัน)

7.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์ specific activity ของเอนไซม์และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เลือกเก็บตัวอย่างส่วนใบและยอดของต้นข้าวอายุ 20 วัน ภายหลังการฟั่นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคตินไปแล้วที่ 0-10 วัน นำไปชั่งน้ำหนักใบ ก่อนบดด้วยโกร่ง แล้วเติมสารละลาย 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 (อัตราส่วนตัวอย่างพืช 0.5 กรัมต่อ acetate buffer 2 มิลลิลิตร) คูดสารแขวนลอยพืชใส่ micro tube ขนาดบรรจุ 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวส่วนใส (crude enzymes) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

7.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำนิ่งผ่าเชื้อในอัตรา 1:10 ใช้ pipette คูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ใส่ใน Micro tube โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย colloidal chitin 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (water bath shaker) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2000 x g นาน 5 นาที คูดสารละลายใส

ส่วนบน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วเดิมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร นำหลอดแก้วไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 °C เติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณของ เอนไซม์ chitinase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย N-acetylglucosamine เป็นสารละลายมาตรฐาน (ขวัญเนตร, 2550)

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ (unit; U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
specific activity ของเอนไซม์ คือ ปริมาณ unit ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U/mg protein)

7.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อในอัตรา 1:5 ใช้ pipette วัดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วโดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบเติมสารละลาย Alkaline Copper 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม สารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

8. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินในการลดการเกิดโรคและชักนำให้ต้นข้าวต้านทานต่อการเกิดโรคกาบใบแห้งสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

8.1 การเตรียมต้นข้าว

เตรียมต้นข้าวเช่นเดียวกับข้อ 7.2 ย้ายปลูกในกระถางดำขนาด 10 นิ้ว (ปริมาตร 6 ลิตร) โดยปลูกข้าวกระถางละ 1 ต้น ดูแลจนต้นข้าวจนอายุ 45 วันจึงนำต้นข้าวมาทดสอบ

8.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียย้อยไคดินซึ่งผ่านการพัฒนาให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin 10 ไอโซเลท คือ PT1-3M, PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M, PT24-3M, PT25-6M, PT49-9M, PT56-4M และ PT70-8M เขย่าเลี้ยงในอาหาร NGB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ (ตามข้อ 5.2)

8.3 กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ RCD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น ทั้งหมด 12 กรรมวิธี ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมโดยใส่น้ำนิ่งมาเชื้อ (control)
- กรรมวิธีที่ 2 กรรมวิธีควบคุมปลูกเชื้อรา *R. solani* (Inoculated control)
- กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT1-3M
- กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT7-1M
- กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT9-1M
- กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT10-9M
- กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT20-10M
- กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT24-3M
- กรรมวิธีที่ 9 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT25-6M
- กรรมวิธีที่ 10 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT49-9M
- กรรมวิธีที่ 11 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT56-4M
- กรรมวิธีที่ 12 ปลูกเชื้อรา *R. solani* และรดแบคทีเรียย้อยไคดินไอโซเลท PT70-8M

8.4 การตรวจความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งของข้าว

หลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* เป็นเวลา 7 และ 14 วัน วัดความสูงของแผล โดยวัดจากโคนต้นที่ระดับความสูงของน้ำถึงจุดสูงสุดที่แผลลุกลาม และความสูงของกาบใบ โดยวัดจากโคนต้นที่ระดับน้ำถึงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ (ข้อต่อใบ) แล้วคำนวณความรุนแรงของโรค (นิชากร, 2551)

$$\text{ดัชนีการความรุนแรงของโรค (\%)} = \frac{\text{ความสูงของแผล}}{\text{ความสูงของกาบใบ}} \times 100$$

8.5 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

ทดสอบต้นข้าวอายุ 45 วัน โดยนำเชื้อรา *R. solani* ที่เลี้ยงบนข้าวเปลือก (ตามภาคผนวก ก) บรรจุในซองชาห่อละ 2 กรัม ปลุกเชื้อโดยตรงด้วยการเหน็บห่อเชื้อไว้ที่กลางกอข้าว จากนั้นใช้ไหมพรมผูกไว้บริเวณที่ปลุกเชื้อเก็บตัวอย่างพืช ร่วมกับการรดแบคทีเรียย่อยไคตินตามกรรมวิธีทดสอบ (ข้อ 8.3) หลังการปลุกเชื้อรา *R. solani* ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ไคตินเนส วันที่ 0-10 ตามข้อ 7.3

8.6 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินในวัสดุปลูกภายหลังการทดลอง

ตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการเก็บน้ำในกระถางแต่ละกรรมวิธีมาตรวจด้วยวิธี serial dilution แล้วหยดลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 50 ppm จำนวน 0.1 มิลลิลิตรต่อจานบ่มไว้ 2-3 วัน ตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร บันทึกค่าปริมาณเชื้อเป็นหน่วยโคโลนี (colony forming unit) ต่อสารละลายธาตุอาหาร 1 มิลลิลิตร (CFU/ml)

8.7 การตรวจนับเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวในกรรมวิธีต่างๆ

เก็บต้นข้าวอายุ 120 วัน วัดความยาวรากและลำต้นจากกรรมวิธีต่างๆ การวัดความยาวรากได้จากการวัดจากโคนรากถึงปลายราก ส่วนการวัดความสูงของลำต้น วัดจากโคนต้นจนถึงยอดสูงสุด นำรากมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างด้วย sodium hydrochlorite 0.525 % นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง นำรากมาซบให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู นึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำรากที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาวางบนอาหาร NGA ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับปริมาณการครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินทั้ง 10 ไอโซเลท โดยดูจากการเจริญของเชื้อรอบบริเวณราก

8.8 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

เมื่อต้นข้าวอายุ 120 วัน ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อรวงข้าวแก่เต็มที่ นำมาตากแดดให้ รวงข้าวและเมล็ดข้าวเปลือกแห้งสนิท สุ่มเก็บรวงข้าวกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 รวง เพื่อนำไปชั่งหา ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตต่อรวง แยกเมล็ดข้าวเปลือกออกจากรวงโดยฝัดข้าวและนำเมล็ดข้าวเปลือก ที่ได้แยกออกเป็นแต่ละกรรมวิธี นำเมล็ดข้าวเปลือกไปชั่งน้ำหนักของกรรมวิธีต่างๆ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ และเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ 2549 – ธันวาคม 2552

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว พบว่าลักษณะแผลบนกาบใบ เริ่มแรกเกิดแผลซ้ำๆ รูปไข่ สีเขียวปนเทาตรงกาบใบบริเวณระดับน้ำ ต่อมาแผลขยายขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีขาวปนเทาหรือสีฟางข้าว ขอบมีสีน้ำตาลไหม้ เมื่อเป็นมากๆ แผลลุกลามถึงกันทำให้รูปร่างไม่แน่นอน (ภาพที่ 1) เมื่อแยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี tissue transplanting technique บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) พบว่ามีเชื้อราเจริญออกมาจากบริเวณชิ้นส่วนกาบใบข้าวที่แสดงอาการเป็นเส้นใยเป็นสีขาว เมื่อเจริญเต็มที่เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล สามารถเจริญและสร้างเส้นใยได้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษพบว่าเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง ยิ่งต้นกล้าข้าวมีการแตกกอมาก ต้นข้าวเบียดเสียดกันมาก ทำให้เกิดโรครุนแรง ปรากฏอาการตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ แผลลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัด และลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าว ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบเหี่ยวแห้งผลผลิตลดลงอย่างมาก (ดารา และคณะ, 2545) จากการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเชื้อรานี้ในระยะยังอ่อน เส้นใยจะไม่มีสี เมื่ออายุมากขึ้นจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมเหลือง และมีผนังกันเซลล์ (septa) กันบริเวณใกล้จุดที่แตกแขนง เส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน มีการสร้างเม็ด sclerotium ที่ประกอบด้วยเส้นใยประสานกันเป็นกลุ่มอย่างหลวมๆ ลักษณะเป็นก้อนค่อนข้างแบน ขนาดไม่สม่ำเสมอ มีสีน้ำตาล (Ou, 1985; วิจัย, 2551)

จากการนำเชื้อรา *R. solani* ที่แยกได้ไปปลูกเชื้อให้กับต้นข้าวอายุ 45 วัน ที่ปลูกในกระถาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 10 นิ้ว เพื่อพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation) พบว่าหลังจากปลูกเชื้อแล้ว ประมาณ 3-5 วัน ต้นข้าวเริ่มแสดงอาการ ระยะแรกเกิดแผลซ้ำๆ เป็นรูปไข่ สีเขียวปนเทา ตรงกาบใบบริเวณระดับน้ำ ต่อมาแผลขยายโตขึ้น เมื่อนำบริเวณที่แสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งบนอาหาร PDA พบว่ามีเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* เจริญออกมาจากชิ้นกาบใบข้าวที่แสดงอาการและมีลักษณะเหมือนกับเชื้อราที่ได้ปลูกเชื้อลงไปในต้นข้าว



ภาพที่ 1 ก. กาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคกาบใบแห้ง โดยเกิดแผลเป็นรูปไข่ขอบสีน้ำตาลไหม้
ข. เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

2. การแยกแบคทีเรียย่อยไคตินจากรากข้าวในแหล่งปลูกตามธรรมชาติ

จากการแยกแบคทีเรียย่อยไคตินบริเวณรอบพืชรากของต้นข้าวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ จากข้าวที่มีระยะการเจริญ 3 ระยะ คือ ระยะต้นกล้า (seedling stage) ระยะแตกกอ (tillering stage) และระยะตั้งท้อง (booting stage) ด้วยวิธีการล้างรากข้าวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite 0.525% แล้วแยกบนอาหารจำเพาะ (chitin agar selective medium) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลท โดยได้จากข้าวระยะต้นกล้า 28 ไอโซเลท ได้จากข้าวระยะแตกกอ 22 ไอโซเลท และได้จากระยะตั้งท้อง 25 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งในการแยกเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถพบเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากข้าวได้ในทุกระยะการเจริญของต้นข้าวเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะคล้ายคลึงกันในช่วงระยะ นอกจานี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในส่วนรากข้าว นั้นมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีน้อยแต่มีปริมาณเชื้อที่พบมาก เนื่องมาจากบริเวณส่วนของรากนั้นมีความชื้นและธาตุอาหารอยู่มากส่งผลต่อความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

การแยกเชื้อแบคทีเรียในแต่ละสภาพแปลงปลูกสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติได้ทุกแหล่งและมีความหลากหลาย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถพบได้ทั่วไปในสภาพตามธรรมชาติทุกสภาพแวดล้อมเพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โดยพบว่าสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้จำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น จากการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ chitin agar selective

medium นั้นพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย colloidal chitin และสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ทั้งหมดได้

สำหรับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้พบว่ามีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไม่เท่ากัน เหตุที่เป็นเช่นนั้นอาจเป็นเพราะความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในแหล่งที่เก็บตัวอย่างรากข้าว ความอุดมสมบูรณ์ของดินซึ่งมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดินและบริเวณรอบพืชรากด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 1 จำนวนของแบคทีเรียย่อยโคตินซึ่งแยกได้จากพืชรากข้าวในระยะต่างๆ ซึ่งปลูกในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติด้วยการใช้อาหารแยกเชื้อ ^{1/}

ข้าวระยะต่างๆ	จำนวนไอโซเลต	แกรมบวก	แกรมลบ
ระยะต้นกล้า	PT1 – PT28 = 28	16	12
ระยะแตกกอ	PT29 – PT50 = 22	18	4
ระยะตั้งท้อง	PT51 – PT85 = 25	15	10
รวม	75	49	26

^{1/} อาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียย่อยโคติน คือ chitin agar selective medium

จากตารางที่ 1 แบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากพืชรากของต้นข้าวที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ 75 ไอโซเลต เมื่อทดสอบแกรมด้วยสารละลายต่าง 3% KOH โดยแบคทีเรียแกรมลบมีปฏิกิริยาเป็นบวก มีลักษณะยัดและแกรมบวกมีปฏิกิริยาเป็นลบมีลักษณะไม่ยัดเมื่อทดสอบด้วยสารละลายต่าง (Schaad *et al.*, 1980) พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 49 ไอโซเลต แกรมลบ 26 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jager *et al.* (2001) อธิบายเกี่ยวกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ และพบว่าแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกจะสามารถทนต่อสารเคมีได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ การแยกแบคทีเรียจากพืชรากข้าวในระยะต่างๆ สามารถแยกแบคทีเรียซึ่งมีความหลากหลายของลักษณะโคโลนี เช่น กลุ่มที่มีสีครีม ลักษณะกลม ขอบโคโลนีเรียบ กลุ่มที่มีสีขาว ลักษณะกลม ขอบโคโลนีไม่เรียบ กลุ่มที่มีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน (ตารางภาคผนวกที่ 1) เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (วิชัย, 2549) และพบว่าแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกซึ่งแยกได้จากกรรมวิธีการใช้สารละลาย sodium

hypochlorite 0.525% ฆ่าเชื้อที่อยู่บริเวณผิวรากด้านนอก แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้นั้นสามารถเจริญครอบครองผิวของรากข้าวด้านในได้ จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นเอนโดไฟท์ (endophyte) เช่นเดียวกับรายงานของ Hallman และคณะ (1997) ที่ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียที่เป็นเอนโดไฟท์ (endophytic bacteria) คือแบคทีเรียที่สามารถพบได้ภายในเนื้อเยื่อของพืชและที่อาจเป็นอันตรายหรือก่อภูมิต้านทานให้กับพืชอาศัย



ภาพที่ 2 เชื้อแบคทีเรียที่ streak บนอาหาร NGA อายุ 48 ชั่วโมง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยไคติน ทั้งหมด 49 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เลี้ยงบนอาหารจำเพาะ chitin agar selective medium โดยปลูกเชื้อแบบ point inoculation บนอาหารจำเพาะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียย่อยไคตินซึ่งมีค่าสัดส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากกว่า 2.0 มีจำนวน 14 ไอโซเลท และแบคทีเรียย่อยไคตินซึ่งมีสัดส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในช่วง 1.0-2.0 มีจำนวน 30 ไอโซเลท และแบคทีเรียย่อยไคตินซึ่งมีค่าสัดส่วนน้อยกว่า 1.0 มีจำนวน 5 ไอโซเลท ดังแสดงตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อย colloidal chitin บนอาหารจำเพาะ chitin agar selective medium

สัดส่วน CZ/CS ^{1/}	ไอโซเลท (จำนวน)
มากกว่า 2.0	PT7, PT9, PT10, PT20, PT23, PT26, PT27, PT28, PT31, PT33, PT36, PT47, PT56 และ PT65 Total = 14
1.0-2.0	PT1, PT8, PT17, PT19, PT22, PT24, PT25, PT29, PT32, PT34, PT37, PT38, PT39, PT40, PT41, PT43, PT45, PT48, PT49, PT51, PT53, PT60, PT62, PT63, PT66, PT68, PT69 และ PT70 Total = 30
น้อยกว่า 1.0	PT12, PT46, PT59, PT74 และ PT75 Total = 5

^{1/} สัดส่วนการย่อย colloidal chitin บนอาหารแข็งจากสูตร = CZ/CS

CZ = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone = cz)

CS = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (colony size = cs)

เชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินที่มีสัดส่วนการย่อย colloidal chitin มากกว่า 2 มีจำนวน 14 ไอโซเลท แสดงถึงแนวโน้มของการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ดี เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อย colloidal chitin ทุกไอโซเลทก่อให้เกิด clear zone มีขนาดแตกต่างกันไป แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส แบบส่งออกนอกเซลล์เพื่อย่อย colloidal chitin ที่แตกต่างกัน (สายพิณ และคณะ, 2551)

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้สูงในการทดสอบเบื้องต้นด้วยการใช้อาหารที่มีซับซ้อนของเอนไซม์ไคตินเนส (colloidal chitin) เป็นองค์ประกอบนั้น สามารถพบบริเวณใสในจานอาหารทดสอบได้แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากสภาพในจานอาหารทดสอบที่มีความเหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินแต่ละไอโซเลทได้ต่างกันของ สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสในจานอาหารทดสอบแบคทีเรียไอโซเลท PT9 ได้มากที่สุดโดยมีสัดส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 2.89 จากรายงานของ Zhang (2000) พบว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยปกตินั้นอาจไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์หรือสร้างได้ในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งจากงานทดลองที่ใช้ผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ทำให้สามารถสกัดหรือแยกเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากขึ้น

4. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizotonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ด้วยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกแต่ละไอโซเลทจากทั้งหมด 49 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้แตกต่างกันโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในช่วง 0-30, 31-60 และมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 25, 18 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จากรากข้าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร Potato Dextrose Agar

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^{1/}	ไอโซเลต (จำนวน)
0-30	PT12, PT29, PT32, PT34, PT37, PT38, PT39, PT40, PT41, PT43, PT44, PT45, PT46, PT48, PT51, PT53, PT59, PT60, PT62, PT63, PT66, PT68, PT69, PT74 และ PT75 Total = 25
31-60	PT1, PT7, PT8, PT9, PT17, PT19, PT22, PT24, PT25, PT26, PT27, PT31, PT33, PT36, PT47, PT49, PT61 และ PT70 Total = 18
61-100	PT10, PT20, PT23, PT28, PT56 และ PT65 Total = 6

^{1/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *R. solani* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

$$\text{คำนวณจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีทดสอบ

พบว่าแบคทีเรีย 20 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 23.3-64.9 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต PT56 (64.9 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างกับ PT28 (63.6 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งรองลงมา และแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ต่ำที่สุด คือ ไอโซเลต PT69 (23.3 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4) โดยเส้นใยของเชื้อราหยุดการเจริญบริเวณที่พบกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 3) ซึ่งแบคทีเรียย่อยโคดินในแต่ละไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งได้นั้นมีลักษณะการยับยั้งในแนวทางที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยพบว่ารอบๆ โคโลนีมีลักษณะเป็น clear zone ทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณดังกล่าว

ตารางที่ 4 รัศมีโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture บนอาหาร Potato Dextrose Agar

ไอโซเลท	รัศมีโคโลนีของเชื้อรา <i>R. solani</i> ^{1/} (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของ เส้นใย ^{2/} (%)	สัดส่วน CZ/CS ^{3/}
PT1	2.5	44.2 g ^{4/}	1.36
PT7	1.9	58.9 c-e	2.10
PT8	2.7	40.8 h	1.90
PT9	1.9	58.9 c-e	2.87
PT10	1.7	62.2 a-c	2.70
PT17	3.0	33.2 i	1.47
PT19	3.4	25.0 j	1.50
PT20	1.7	62.2 a-c	2.08
PT23	1.6	64.3 ab	2.00
PT24	2.7	39.1 h	1.70
PT25	2.5	44.9 g	1.83
PT27	1.9	58.3 de	2.33
PT28	1.5	63.6 a-c	2.54
PT31	1.9	57.8 e	2.31
PT48	3.3	26.9 i	1.46
PT49	2.3	50.0 f	1.58
PT56	1.6	64.9 a	2.40
PT65	1.7	62.2 a-c	2.86
PT69	3.5	23.3 j	1.30
PT70	2.1	54.2 f	1.14
Control	4.5	0.00 k	ND ^{5/}

ตารางที่ 4 (ต่อ)

^{1/} รัศมีของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* วัดจากกึ่งกลางของโคโลนีถึงปลายเส้นใย (เซนติเมตร) ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ หลังจากวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 วัน

^{2/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *R. solani* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย = $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$

R1

R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีทดสอบ

^{3/} สัดส่วนการย่อย colloidal chitin บนอาหารจำเพาะ chitin agar selective medium

จากสูตร = CZ/CS

CZ = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone = cz)

CS = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (colony size = cs)

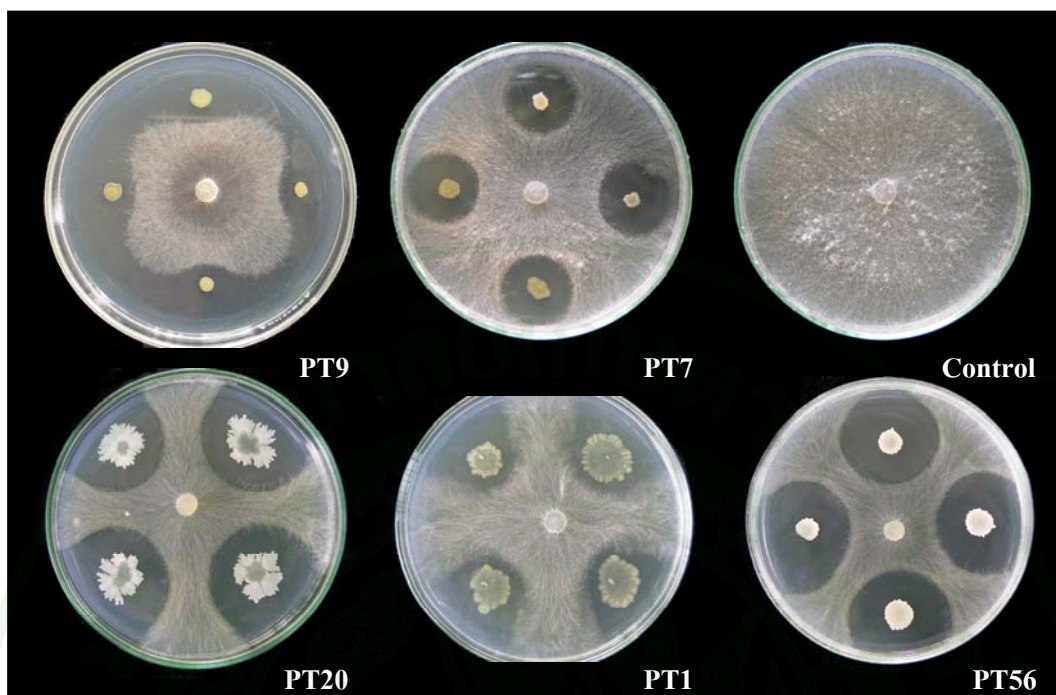
^{4/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

^{5/} ND = ไม่ได้ตรวจสอบ (not- determined)

จากการแยกและทดสอบแบคทีเรียที่ย่อย colloidal chitin บนอาหารคัดเลือกเชื้อแล้วทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนอาหาร PDA พบว่ามีการยับยั้ง 2 ลักษณะคือ แบบที่สร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) และแบบแข่งขัน (competition) ซึ่งเป็นชนิดที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีการแข่งขันการใช้อาหารมีผลให้เชื้อสาเหตุโรคเจริญได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญได้ (Whipps, 1987) จากการทดลองวัดรัศมีเส้นใยเชื้อรา *R. solani* จากจุดกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงปลายเส้นใยแล้วเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แสดงให้เห็นบริเวณใสและยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *R. solani* ได้ จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกมีการสร้างสารปฏิชีวนะทั้งหมด และมีโอกาสที่จะควบคุมโรคได้ดี เนื่องจากคาดว่าจะมีกลไกในการยับยั้งเชื้อมากกว่า 1 กลไก จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียย่อยโคตินได้สูงและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ จำนวน 10 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PT7, PT9, PT10, PT20, PT23, PT27, PT28, PT31, PT56 และ PT65 และแบคทีเรียที่ย่อยโคตินได้ต่ำแต่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ จำนวน 10 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PT1, PT8, PT17, PT19, PT24, PT25, PT48, PT49, PT69 และ PT70 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้สูงพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ดีซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kamil *et al.* (2007) ที่พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและย่อยไคตินใช้เป็นแหล่งพลังงาน เช่น ยีน *chiA* ที่ผลิตจาก *Serratia marcescens* มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียย่อยไคตินได้ต่ำแต่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ดีเนื่องจากแบคทีเรียย่อยไคตินเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคทำให้มีการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการเป็นปรสิตรได้ ซึ่งในสภาพการเจริญตามปกติของแบคทีเรียอาจไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์หรือสร้างได้ในปริมาณที่น้อยมาก

แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. solani* บางไอโซเลทที่คัดเลือกไว้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ สารที่สร้างปลดปล่อยออกนอกเซลล์มีผลให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าไปในบริเวณนั้นได้ โดยสารดังกล่าวอาจเป็นได้ทั้งเอนไซม์หรือ bioactive compound (สายพิน และคณะ 2551) อันที่ไม่ใช่เอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามถ้าเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างสัมผัสกับเส้นใยของรา *R. solani* ซึ่งมีโครงสร้างหลักคือไคตินย่อมสร้างความเสียหายให้กับเชื้อรา *R. solani* ได้ จากการที่โครงสร้างของเชื้อราโดยส่วนใหญ่พบว่าส่วนที่เป็นผนังเซลล์ประกอบด้วยไคตินเป็นหลักและไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนส มีจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตไคติเนสได้ เช่น แบคทีเรีย *S. marcescens* *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* และ Actinomycetes หลายชนิดที่สร้างไคติเนสได้โดยเฉพาะพวกที่พบมากในดินคือ *Streptomyces* (Gupta *et al.*, 1995)



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
Rhizoctonia solani บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน โดยวิธี Dual culture

5. อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินต่อการงอกของเมล็ดข้าวและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวหลังจากแช่ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินเป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะในกระดาดเพาะ พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคตินมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ในช่วง 92.50-99.75 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท PT10 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 99.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไอโซเลท PT56, PT9, PT23 และ PT28 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอก 99.50, 99.25, 99.00 และ 98.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลทส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอก 98.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท PT24 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุดคือ 92.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5)

การวัดความยาวรากและความสูงของส่วนยอดต้นกล้า อายุ 7 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวรากของต้นกล้าพบอยู่ระหว่าง 9.08-12.48 เซนติเมตร โดยเมล็ดข้าวที่ผ่านกรรมวิธีการแช่ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินไอโซเลท PT31 จะพบค่าเฉลี่ยความยาวรากที่สูงที่สุด คือ 12.48 เซนติเมตร รองลงมาคือ PT9, PTPT20, PT56 และ PT10 มีค่าเฉลี่ยความยาวรากที่ 12.74, 12.46, 12.36 และ 12.33 เซนติเมตร ตามลำดับโดยไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีค่าความยาวราก 12.35 เซนติเมตร

ส่วนความสูงของส่วนกล้าข้าวพบว่ามีค่าเฉลี่ยความสูงของส่วนยอดต้นกล้าอยู่ระหว่าง 2.57-6.33 เซนติเมตร โดยกรรมวิธีการแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินไอโซเลท PT25 พบค่าเฉลี่ยความสูงของส่วนยอดข้าวที่สูงที่สุดคือ 6.33 เซนติเมตรรองลงมาคือ PT 65 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความสูง 6.31 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมในขณะที่ไอโซเลท PT19 พบว่ามีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นกล้าน้อยที่สุดคือ 2.57 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การงอก ค่าเฉลี่ยความยาวรากและค่าเฉลี่ยความสูงต้นกล้าข้าวเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการแช่ในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ข่อย เพาะลงบนกระดาษเพาะเมล็ด 7 วัน

ไอโซเลท	การงอกบนกระดาษเพาะ (%)	ความยาวราก ^{1/} (ซม.)	ความสูงลำต้น ^{2/} (ซม.)
PT1	97.50 ab ^{3/}	11.03 cd ^{3/}	3.72 ef ^{3/}
PT7	98.75 a	10.20 ef	5.47 bc
PT8	96.00 a-d	10.18 ef	5.20 c
PT9	99.25 a	12.47 a	4.25 d
PT10	99.75 a	12.33 a	4.11 de
PT17	94.25 b-d	11.98 ab	4.48 d
PT19	94.25 b-d	11.12 cd	2.57 h
PT20	98.50 a	12.46 a	5.50 bc
PT23	99.00 a	12.16 ab	4.61 d
PT24	92.50 d	9.08 g	2.55 h
PT25	98.50 a	9.73 e-g	6.33 a
PT27	96.75 a-c	11.45 bc	4.15 de
PT28	98.75 a	9.66 fg	4.44 d
PT31	96.50 a-c	12.48 a	3.00 gh
PT48	97.75 ab	9.15 g	3.72 ef
PT49	96.75 a-c	9.55 fg	5.32 bc
PT56	99.50 a	12.36 a	5.81 b
PT65	96.75 a-c	10.25 ef	6.31 a
PT69	96.00 a-d	10.45 de	4.17 de
PT70	93.00 cd	9.33 g	3.30 fg
Control	98.75 a	12.35 a	5.30 bc

ตารางที่ 5 (ต่อ)

^{1/} ความยาวรากวัดจากส่วนโคนรากที่ติดกับเมล็ดข้าวถึงส่วนปลายสุดของรากจากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

^{2/} ความสูงต้นกล้าข้าววัดจากส่วน โคนของลำต้นที่ติดกับเมล็ดข้าวจนถึงส่วนปลายใบข้าวจากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดังของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$)

จากการทดสอบการแช่เมล็ดข้าวด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียย้อยไคติน พบว่าแบคทีเรียย้อยไคตินบางไอโซลทช่วยให้ต้นข้าวมีความยาวรากและความสูงต้นกล้าเจริญดีกว่าปกติ อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารบางชนิดไปกระตุ้นการเจริญของต้นข้าวได้ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ จิระเดช และคณะ (2548) ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (B-03) แช่เมล็ดก่อนนำไปทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของต้นกล้าข้าว พบว่าเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกเร็วสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าต้นกล้าข้าวมีการเจริญยืดยาวของรากและส่วนสูงของต้นกล้ามากกว่าการเพาะด้วยวิธีการปกติ นอกจากนี้ Kleifield and Chet (1992) พบว่าการตอบสนองการเจริญของพืชโดยการใช้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากนั้นมาจากการที่จุลินทรีย์ที่ใช้มีชีวิตรอดและพัฒนาตัวเองในบริเวณรากพืช สามารถครอบครองรากพืชจึงส่งเสริมการเจริญของพืชได้ แบคทีเรียที่อาศัยบริเวณดินรอบรากพืช (plant growth promotion rhizobacteria; PGPR) มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มความต้านทานของพืชต่อโรค สามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้โดย PGPR มีการสร้างกลไกมากกว่า 1 กลไกในการพัฒนาการเจริญและความแข็งแรงของต้นพืชซึ่งกลไกเหล่านี้อาจเกิดขึ้นเป็นไปตามลำดับหรือเกิดขึ้นได้พร้อมกันในช่วงตอนการเจริญของพืชก็ได้สำหรับกลไกที่สำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืชมีหลายกลไกแต่กลไกที่สำคัญและได้รับการยอมรับกัน คือ การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช กลไกการกระตุ้นให้พืชดูดซึมธาตุอาหารได้ดีขึ้น และกลไกการเปลี่ยนธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ (Chaiham et al., 2008) สอดคล้องกับการศึกษาของ สุดฤดี และคณะ 2548 ที่ได้วิจัยและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อระบบการผลิตพืชหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus firmus* KPS46, *B. cereus* SPt245 และ *Bacillus* sp. KS217 โดยแบคทีเรียเหล่านี้ส่งเสริมให้ราก ลำต้น และยอดพืชเจริญยืดยาวอย่างรวดเร็ว วิธีการใช้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถประยุกต์ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ การคลุกเมล็ด การคลุกเมล็ดร่วมกับการราดดิน การผสมในดินหรือวัสดุปลูกและการพ่นด้วย cell suspension รวมทั้งการพ่นด้วยสารเหลวที่กรองเอาเซลล์แบคทีเรียออก

(cell free culture filtrate) ทั้งนี้การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อพบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าแก้วเหลืองได้ดี

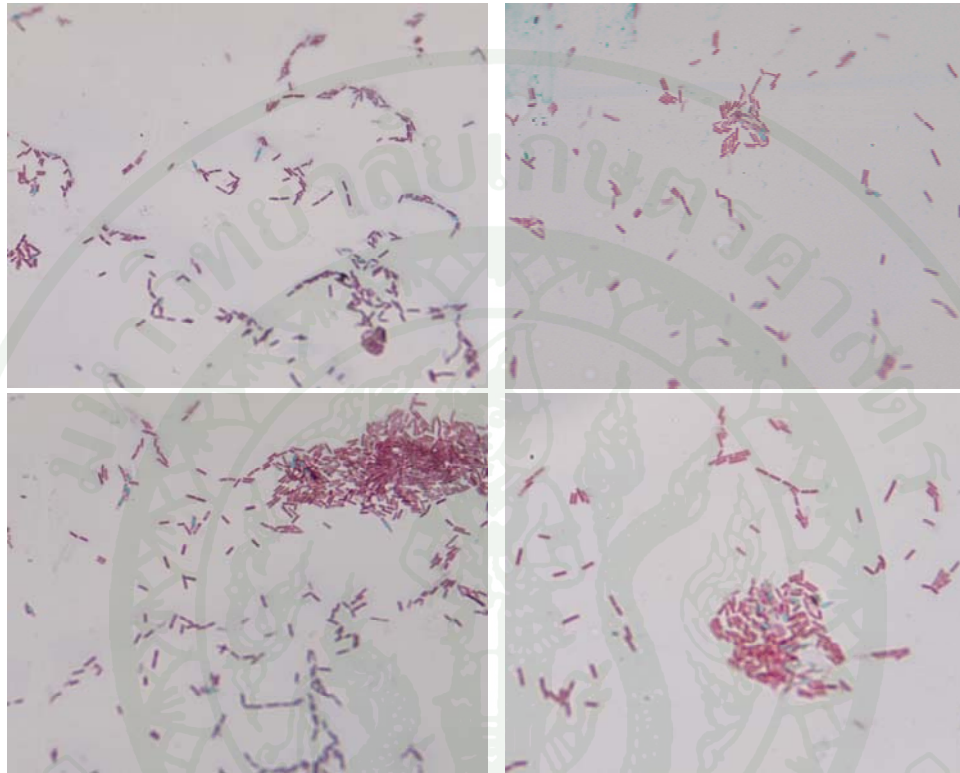
6. การพัฒนาแบคทีเรียย่อยโคตินให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

จากการนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 10 ไอโซเลทไปพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) แล้วพบว่าทุกไอโซเลทสามารถพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้โดยที่ไอโซเลท PT25-6M แม้จะนำไปพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแล้วยังคงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ไม่แตกต่างจาก wild type ในขณะเดียวกันในไอโซเลท PT1-3M, PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M, PT24-3M, PT49-M, PT56-4M และ PT70-8M กลับมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ wild type (ตารางที่ 6) นอกจากนี้แบคทีเรียบางไอโซเลทยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ลดลง (ข้อมูลในภาคผนวก) คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น เจริญช้ากว่าเดิม ลักษณะโคโลนีเล็กกว่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะ rifampicin มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียอย่างชัดเจน

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์กลาย (mutant isolate ; M) ที่ต้านทาน rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนอาหาร PDA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strain)

กรรมวิธี	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย
	<i>Rhizoctonia solani</i> (%)
PT1-3M	57.8
PT1 wild type	44.2
PT7-1M	64.9
PT7 wild type	58.9
PT9-1M	65.6
PT9 wild type	58.9
PT10-9M	63.3
PT10 wild type	63.1
PT20-10M	64.0
PT20 wild type	62.6
PT24-3M	42.2
PT24 wild type	39.1
PT25-6M	44.9
PT25 wild type	44.9
PT49-9M	59.9
PT49 wild type	50.0
PT56-4M	65.3
PT56 wild type	64.9
PT70-8M	60.0
PT70 wild type	54.2

เมื่อนำแบคทีเรียย่อยไคตินที่ผ่านการพัฒนาให้มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นไปย้อมสีเพื่อตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์พบว่าทุกสายพันธุ์มีการสร้างเอนโดสปอร์เนื่องจากเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียย้อมติดสีเขียวของ malachite (ภาพที่ 4)

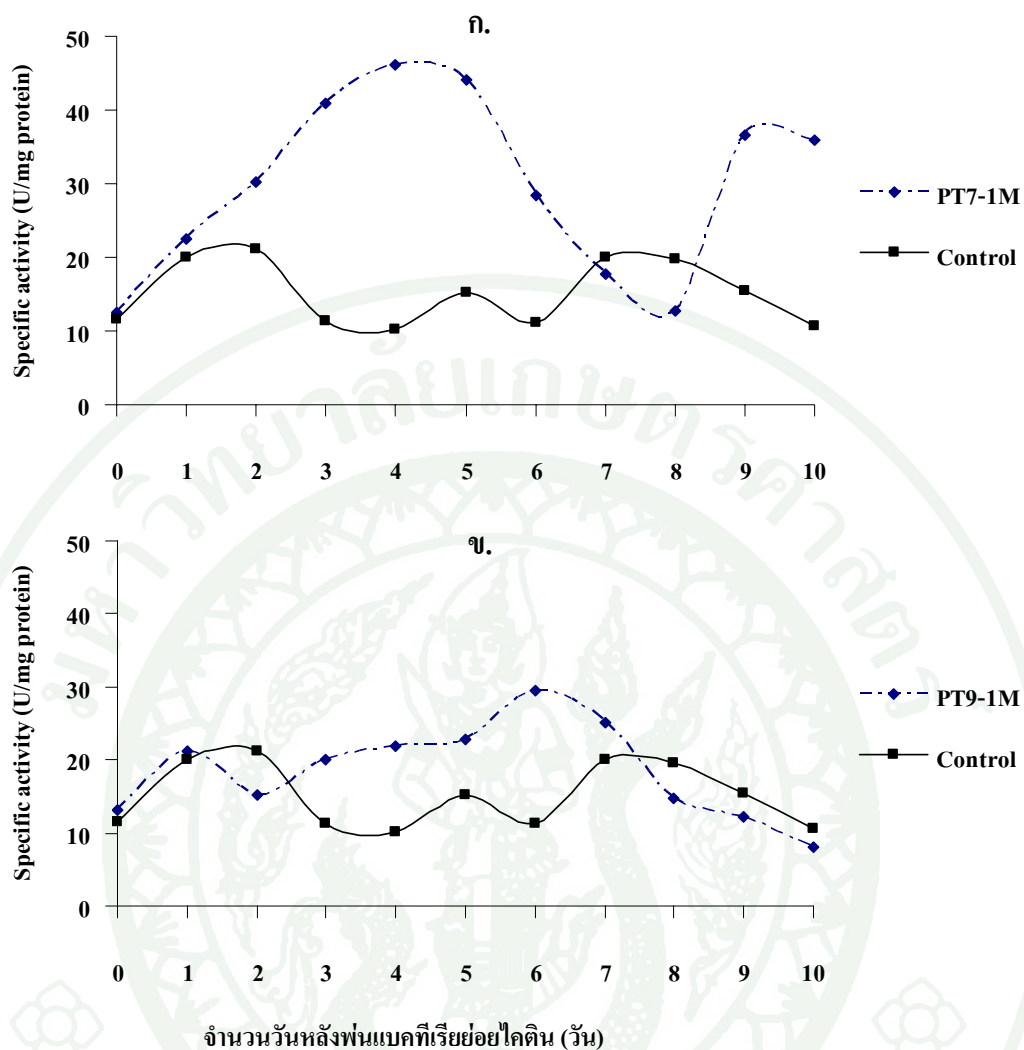


ภาพที่ 4 ลักษณะเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินย้อมด้วย malachite green

จากการจำแนกแบคทีเรียที่ย่อยไคตินโดยใช้ระบบการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (Biolog System, Hayward, CA, USA) พบว่าแบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้สูง 5 ไอโซเลตได้แก่ PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M และ PT56-4M จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. (unidentified species) (รายละเอียดตามภาคผนวก)

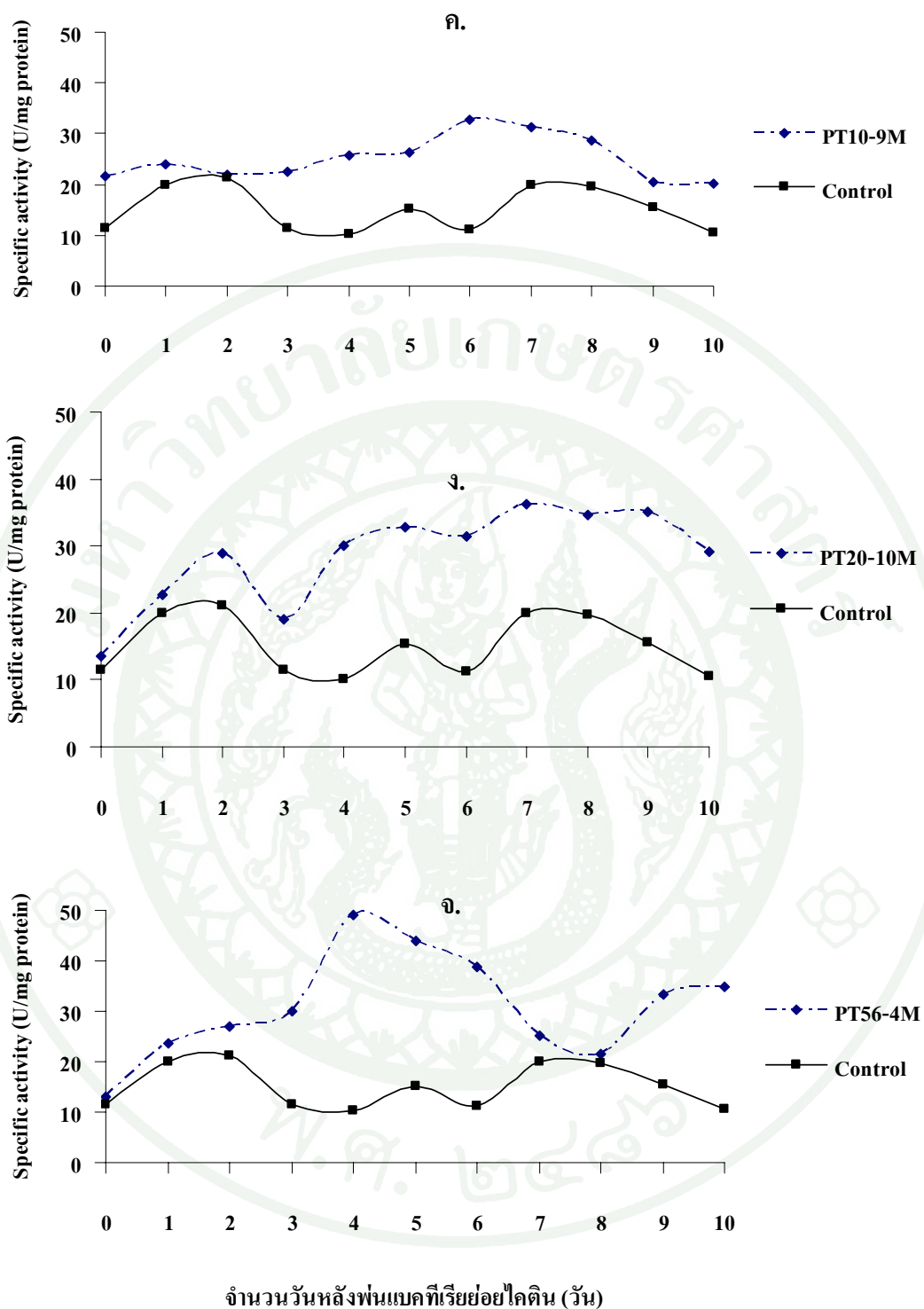
7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยโคตินในการชักนำการสร้างเอนไซม์โคตินเอส

การตรวจกิจกรรมของเอนไซม์โคตินเอสและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้าข้าวหลังการใส่แบคทีเรียย่อยโคตินที่ 0-10 วัน การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคตินเอสในตัวอย่างใบและยอดของกล้าข้าวในกรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินสูงได้แก่ ไอโซเลท PT7-1M, PT9-1M, PT10-9M, PT20-10M และ PT56-4M พบว่าสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้โดยแบคทีเรียไอโซเลท PT7-1M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และสูงที่สุดในวันที่ 4 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 46.1 U/mg protein (ภาพที่ 5 ก) กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินไอโซเลท PT9-1M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้สูงในวันที่ 1 และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 6 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวโดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 21.1 และ 34.1 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 5 ข) กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินไอโซเลท PT10-9M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้สูงในวันที่ 1 และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 6 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวโดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 24.1 และ 32.7 U/mg protein ตามลำดับ และลดลงในวันที่ 7 (31.2 U/mg protein) (ภาพที่ 5 ค) กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินไอโซเลท PT20-10M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้สูงในวันที่ 5 และ 7 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 32.7 และ 36.2 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 5 ง) และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินไอโซเลท PT56-4M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคตินเอสได้สูงที่สุดในวันที่ 4 และลดลงวันที่ 5 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 49 และ 43.9 U/mg protein (ภาพที่ 5 จ) ตามลำดับ



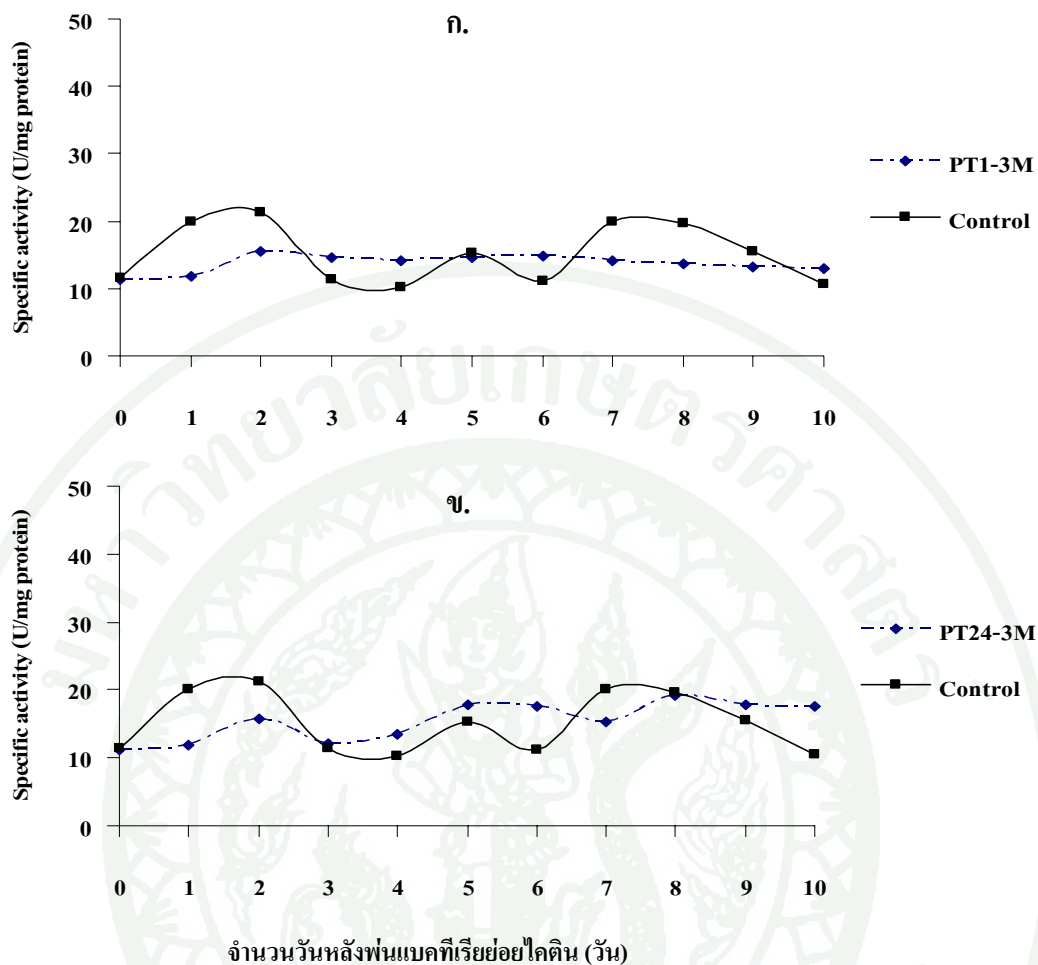
ภาพที่ 5 ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวอายุ 20 วัน เมื่อพ่นด้วยแบคทีเรียย่อยไคตินได้สูง

- ก. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT7-1M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ข. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT9-1M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ค. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT10-9M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ง. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT20-10M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- จ. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT56-4M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม



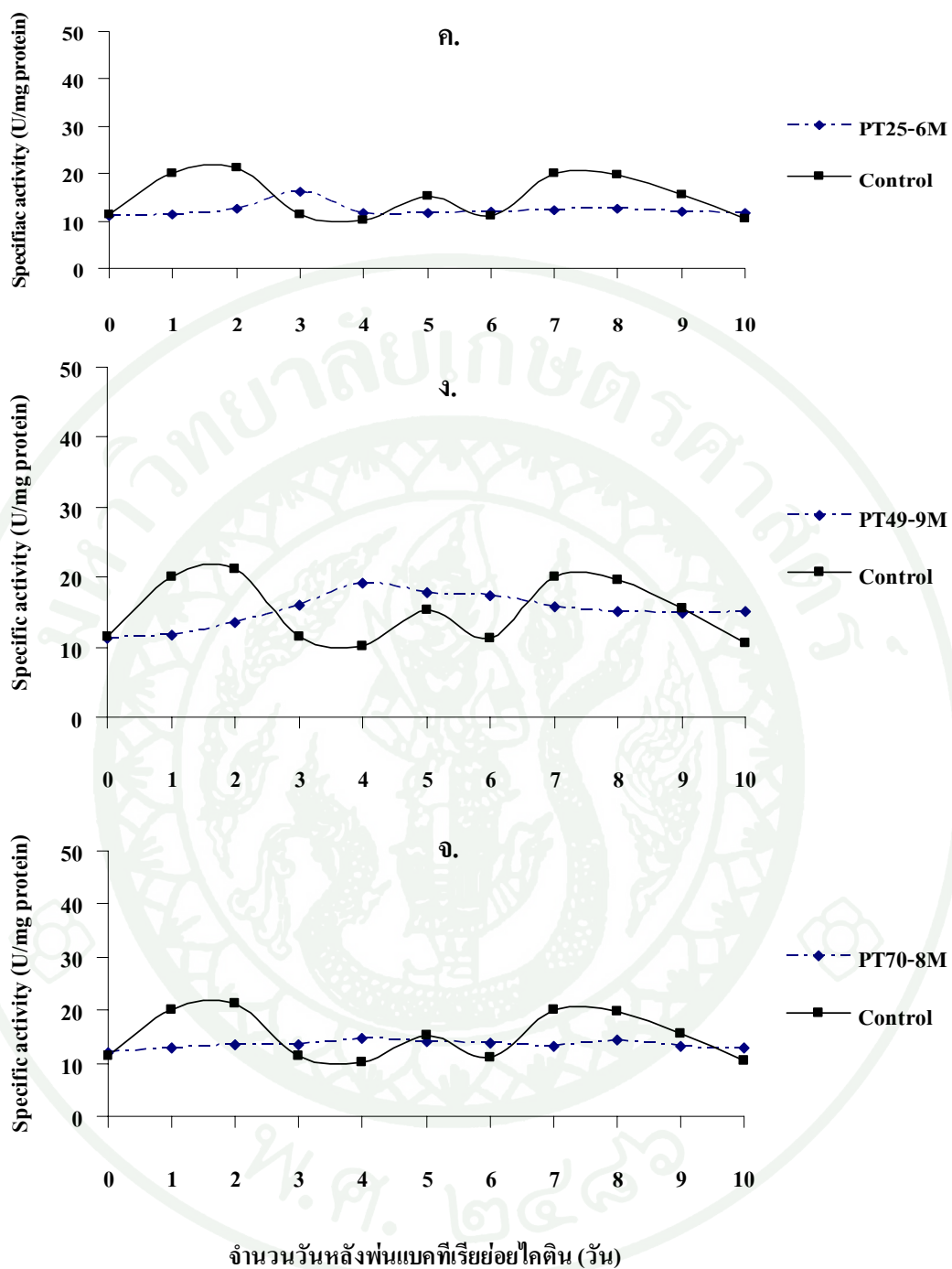
ภาพที่ 5 (ต่อ)

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคติเนสในตัวอย่างใบและยอดของกล้าข้าวในกรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคติเนสต่ำที่คัดเลือกมาใช้ทดสอบได้แก่ไอโซเลท PT1-3M, PT24-3M, PT25-6M, PT49-9M และ PT70-8M โดยแบคทีเรียย่อยโคติเนสไอโซเลท PT1-3M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคติเนสได้เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และสูงที่สุดในวันที่ 2 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 15.5 U/mg protein (ภาพที่ 6 ก) จากนั้นเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดช่วงระยะเวลาการตรวจสอบ กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคติเนสไอโซเลท PT24-5M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคติเนสได้สูงในวันที่ 2 และ หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 15.8 และ 17.9 U/mg protein ตามลำดับ จากนั้นเอนไซม์โคติเนสก็ลดลงในวันที่ 6 (17.5 U/mg protein) (ภาพที่ 6 ข) กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคติเนสไอโซเลท PT25-6M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคติเนสได้สูงในวันที่ 3 หลังการรดต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 16.8 U/mg protein จากนั้นเอนไซม์โคติเนสก็ลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่ตรวจพบเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 6 ค) ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคติเนสไอโซเลท PT49-9 กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคติเนสได้สูงขึ้นเรื่อยๆ และสูงที่สุดในวันที่ 4 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 19.2 U/mg protein (ภาพที่ 6 ง) และในกรรมวิธีที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคติเนสไอโซเลท PT70-8M กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์โคติเนสได้น้อยเนื่องจากพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคติเนสที่วัดได้ในแต่ละวันเพียงเล็กน้อยและในวันที่ 4 หลังการพ่นต้นกล้าข้าวด้วยแบคทีเรียย่อยโคติเนสมีการเปลี่ยนแปลงโดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 14.7 U/mg protein (ภาพที่ 6 จ)



ภาพที่ 6 ค่า specific activity ของเอนไซม์โคตินเนสในใบและยอดข้าวอายุ 20 วัน เมื่อฟันด้วยแบคทีเรียที่ย่อยโคตินได้ต่ำ

- ก. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT1-3M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ข. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT24-5M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ค. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT25-6M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ง. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT49-9M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- จ. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT70-8M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม



ภาพที่ 6 (ต่อ)

จากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสในต้นข้าวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียที่ย่อยไคตินสูง (ภาพที่ 5) และต่ำ (ภาพที่ 6) พบว่าวิเคราะห์ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเอสระหว่าง 49.0-14.7 U/mg protein โดยไอโซเลท PT56-4M มีค่า specific activity สูงที่สุด (49.0 U/mg protein) ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (21.2 U/mg protein) และไอโซเลท PT1-3M และ PT 70-8M มีค่า specific activity ต่ำที่สุด (14.7 U/mg protein) ถึงแม้ไอโซเลท PT1-3M และ PT 70-8M จะมีค่า specific activity ต่ำที่สุดที่ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่เชื้อไอโซเลทดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงเพราะยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้

8. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินในการลดการเกิดโรคและชักนำให้ต้นข้าวด้านทานต่อการเกิดโรคกาบใบแห้งสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

จากการประเมินความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังการปลูกเชื้อรา *R. solani* ที่ 7 วัน ร่วมกับการลดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินลงบริเวณโคนกอข้าว พบว่าหลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* โดยวิธีเหน็บของชาที่ใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *R. solani* เจริญอยู่ไว้ที่กอข้าวกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียที่ย่อยไคติน PT10-9M มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด คือ 62.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลท PT7-1M, PT56-4M และ PT9-1M โดยมีความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 63.1, 63.4 และ 64.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ผลที่ได้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า specific activity สูงในช่วงวันที่ 0-7 จากนั้นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ไคตินเอสจะมีแนวโน้มลดลง

ในขณะที่เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อรา *R. solani* 14 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT56-4M มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งต่ำที่สุดคือ 81.3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียย่อยไคตินในทุกไอโซเลทไม่สามารถด้านทานต่อความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อ 14 วัน ได้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสที่มีแนวโน้มการกระตุ้นที่ลดลงตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไป (ตารางที่ 8) จึงเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคนั้นควรใช้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูง

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และโรคเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ เมื่อทำการปลูกเชื้อโรค และหลังปลูกเชื้อโรค 7 วัน

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรคที่ปลูกเชื้อโดย	
	วิธีเห็บของชาในกอข้าว (%) ^{1/}	
	หลังปลูกเชื้อ 7 วัน ^{2/}	หลังปลูกเชื้อ 14 วัน ^{2/}
PT1-3M	65.9 cd ^{3/}	85.4 a ^{3/}
PT7-1M	63.1 e	82.3 b-d
PT9-1M	64.6 de	83.5 b-d
PT10-9M	62.4 e	80.1 cd
PT20-10M	67.3 bc	82.7 b-d
PT24-3M	68.3 b	83.2 c-d
PT25-6M	70.7 a	84.6 ab
PT49-9M	69.8 b	84.8 ab
PT56-4M	63.4 de	81.3 d
PT70-8M	67.2 cd	84.5 a
Control	70.4 a	85.2 a-c

^{1/} เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งของข้าวจากการปลูกเชื้อโดยเห็บของชาที่ใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เจริญอยู่ถุงละ 2 กรัมไว้ที่กอของข้าว

^{2/} ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งของข้าวหลังปลูกเชื้อรา *R. solani* เป็นเวลา 7 วันและ 14 วัน โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{ความรุนแรงของโรค} = \frac{\text{ความสูงของแผล}}{\text{ความสูงของกาบใบ}} \times 100$$

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.01)

เมื่อพิจารณาน้ำหนักผลผลิตของเมล็ดต่อรวง พบว่ากรรมวิธีเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคติน ไอโซเลท PT7-1M ให้น้ำหนักเมล็ดต่อรวงมากที่สุดเท่ากับ 2.81 กรัม/รวง สูงกว่ากับกรรมวิธีควบคุม ที่มีค่า 1.95 กรัม/รวง อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) ส่วนน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1,000 เมล็ดนั้น พบว่ากรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคติน ไอโซเลท PT56-4M ให้น้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ดมากที่สุด คือ 33.10 กรัม/1,000เมล็ด รองลงมาคือกรรมวิธีใช้แบคทีเรียที่ย่อยไคติน ไอโซเลท PT70-8M และ กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียที่ย่อยไคติน ไอโซเลท PT49-9M โดยมีน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ดเท่ากับ 31.1 และ 29.97 กรัม/1,000เมล็ด ตามลำดับ โดยมีค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (19.91 กรัม/1,000 เมล็ด) อย่าง มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตต่อรวง น้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดต่อ 1000 เมล็ด หลังการรดเชื้อ แบคทีเรียปฏิชีวนะบริเวณโคนกอข้าวจำนวน 3 ครั้ง หลังปลูก

กรรมวิธี	น้ำหนักผลผลิต/รวง (กรัม/รวง) ^{1/}	น้ำหนักเฉลี่ยเมล็ด (กรัม/1,000เมล็ด) ^{2/}
Uninoculated control	2.54 cd ^{3/}	25.65 d ^{3/}
Inoculated control (<i>R. solani</i>)	1.95 g	19.91 e
PT1-3M + <i>R. solani</i>	2.44 de	18.50 f
PT7-1M + <i>R. solani</i>	2.81 a	24.93 d
PT9-1M + <i>R. solani</i>	2.64 bc	24.64 d
PT10-9M + <i>R. solani</i>	2.29 ef	25.33 d
PT20-10M + <i>R. solani</i>	2.75 ab	20.80 e
PT24-3M + <i>R. solani</i>	2.63 bc	18.48 f
PT25-6 M+ <i>R. solani</i>	2.35 e	24.75 d
PT49-9M + <i>R. solani</i>	2.45 de	29.19 c
PT56-4M + <i>R. solani</i>	2.75 ab	33.10 a
PT70-8M + <i>R. solani</i>	2.14 f	31.18 b

^{1/} ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือกจากการสุ่มกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 รวง

^{2/} ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดจากการสุ่มนับจำนวนเมล็ดข้าวเปลือก 1,000 เมล็ดในแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธี ละ 3 ซ้ำ (1,000เมล็ด/ซ้ำ)

ตารางที่ 8 (ต่อ)

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

การตรวจปริมาณประชากรในวัสดุปลูกพบว่าแบคทีเรียย่อยไคตินทุกไอโซเลท สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในช่วง 1.2×10^2 - 4.5×10^3 CFU/ml (ตารางที่ 10) และสามารถครอบครองรากข้าวได้ในช่วง 83.33-100.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) ในการตรวจนับปริมาณประชากรของแบคทีเรียย่อยไคตินและความสามารถในการครอบครองรากของแบคทีเรีน้นพบว่าแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm ในสภาพห้องปฏิบัติการกลับมีคุณสมบัติในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ลดลงเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในระดับโรงเรือนจึงต้องตรวจสอบแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะบนอาหาร NGA ที่ผสมด้วย rifampicin 50 ppm แทน

ตารางที่ 9 ปริมาณประชากรของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินและเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากหลังจากกรดด้วยแบคทีเรียย่อยไคตินสายพันธุ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin (50 ppm) เมื่อต้นข้าวมีอายุ 90 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml) ^{1/}	การครอบครองรากข้าว ^{2/} (%)
Uninoculated control	ND ^{3/}	ND ^{3/}
Inoculated control (<i>R. solani</i>)	ND	ND
PT1-3M + <i>R. solani</i>	4.2×10^3	83.33
PT7-1M + <i>R. solani</i>	3.6×10^3	100.0
PT9-1M + <i>R. solani</i>	1.3×10^2	100.0
PT10-9M + <i>R. solani</i>	1.2×10^2	100.0
PT20-10M + <i>R. solani</i>	1.4×10^2	83.33
PT24-3M + <i>R. solani</i>	2.3×10^2	93.75

ตารางที่ 9 (ต่อ)

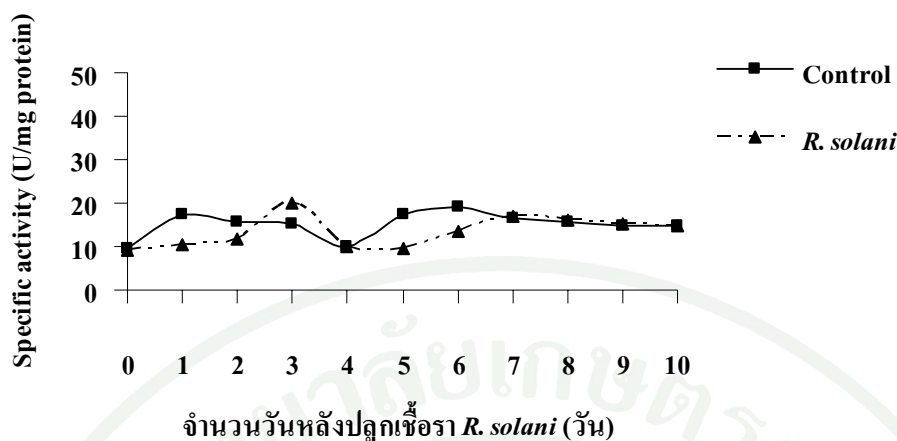
กรรมวิธี	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml) ^{1/}	การครอบครองรากข้าว ^{2/} (%)
PT25-6M + <i>R. solani</i>	1.3×10^2	86.25
PT49-9M + <i>R. solani</i>	1.4×10^2	100.0
PT56-4M + <i>R. solani</i>	4.5×10^3	100.0
PT70-8M + <i>R. solani</i>	3.2×10^3	83.33

^{1/} การตรวจนับปริมาณประชากรแบคทีเรียย่อยโคตินสายพันธุ์ด้านทาน rifampicin บนอาหาร NGA ผสม rifampicin 50 ppm เมื่อต้นข้าวอายุ 90 วัน

^{2/} การครอบครองราก (%) โดยนำรากข้าวอายุ 90 วัน ล้างฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 0.525% ตัดเป็นชิ้นละ 1 เซนติเมตร วางบนอาหาร NGA ผสม rifampicin 50 ppm

^{3/} ND = not determined

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียย่อยโคตินทุกไอโซเลทสามารถเจริญครอบครองรากได้ทุกระยะการเจริญของข้าวจนถึงเก็บเกี่ยว เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างใบและยอดของข้าวเมื่อปลูกเชื้อรา *R. solani* พบว่าสามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์โคตินเนสในวันที่ 3 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 23.7 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 7) ทั้งนี้เอนไซม์โคตินเนสจัดเป็น PR-protein ดังนั้นพืชจึงสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะไม่ปกติ เช่น มีการรุกรานจากเชื้อสาเหตุโรค (Ginnakis *et al.*, 1998) โดย PR-protein ที่เกิดจากการแสดงออกของ PR-gene นั้นจะ มีการสะสมอยู่หลายวันในพืชที่ได้รับการกระตุ้นและจะมีค่าสูงสุดประมาณวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 หลังจากเชื้อโรคเข้าทำลาย (Rattarasarn, 2003)



ภาพที่ 7 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเอสในใบและยอดข้าวเมื่อปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคตินสูงไอโซเลท PT7-1M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่า specific activity เพิ่มขึ้นในวันที่ 5 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity เท่ากับ 41.7 U/mg protein จากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ยังมีค่า specific activity ที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ก) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT9-1M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 5 และ 7 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 25.6 และ 28.7 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ข) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT10-9M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 5 และวันที่ 7 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 32.8 และ 32.7 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ค) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT20-10M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 38.5 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ง) และลดลงเรื่อยๆ จากนั้นจะถูกกระตุ้นอีกในวันที่ 7 ให้มีค่า specific activity เท่ากับ 35.2 U/mg protein ในขณะที่กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT56-4M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเพิ่มสูงในวันที่ 4 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 47.5 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 จ)

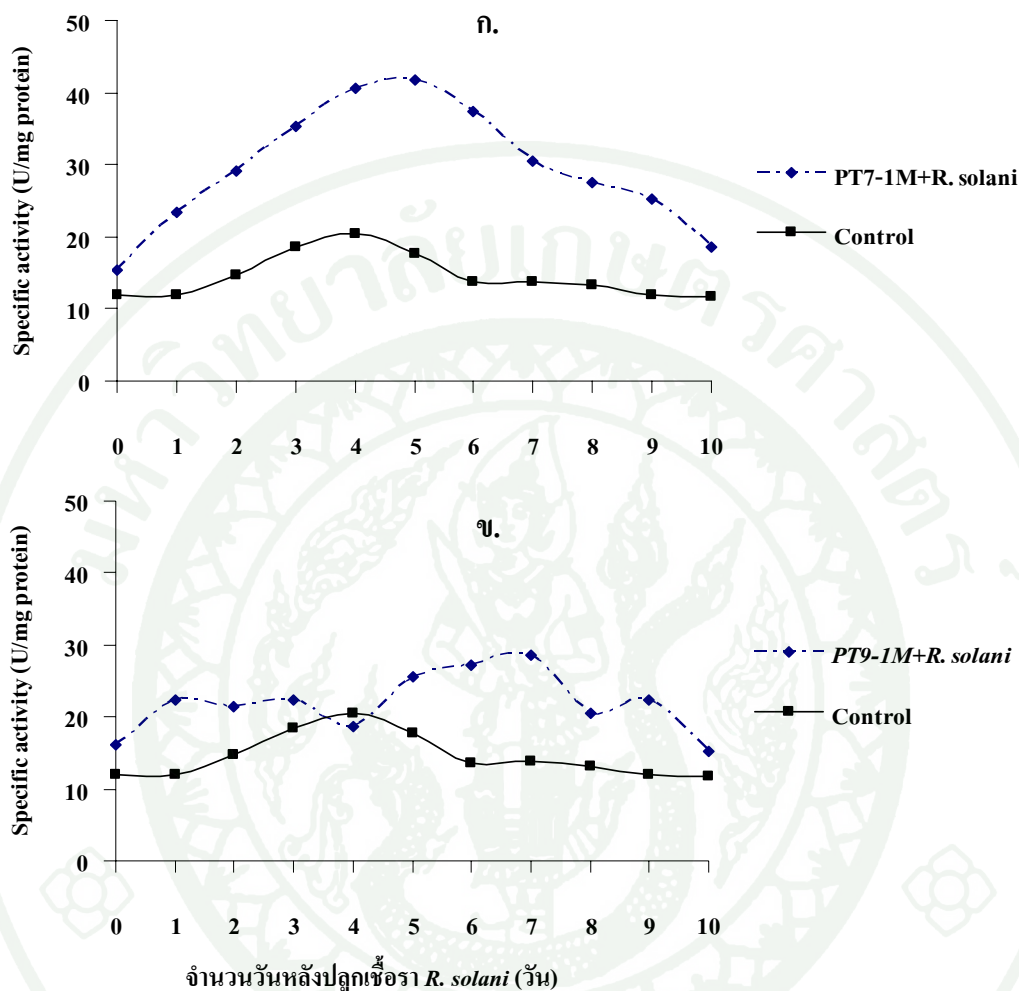
นอกจากนี้กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยไคตินต่ำได้แก่ ไอโซเลท PT1-3M พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 5 โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 15.9 U/mg protein ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 ก) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT24-5M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 6 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 22.7 U/mg protein (ภาพที่ 9 ข) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT25-6M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 5 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 20.7 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 ค) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT49-9M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 และ 4 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 19.6 และ 20.3 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 ง) กรรมวิธีที่รดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินไอโซเลท PT70-8M ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 24.5 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 จ)

การใช้แบคทีเรียย่อยไคตินร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงวันที่ 2-7 โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ระหว่าง 15.9-47.5 U/mg protein หลังจากวันที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงลดลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองข้างต้นพบว่าในช่วง 7 วันหลัง การปลูกเชื้อรา *R. solani* ร่วมกับการรดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียย่อยไคตินสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคกาบใบแห้งได้ แต่ไม่สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อโรคได้

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียย่อยไคตินในทุกไอโซเลทสามารถกระตุ้นให้ต้นข้าวมีความต้านทานต่อโรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและส่งเสริมให้ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตได้ดี ถึงแม้ว่าในบางไอโซเลทจะมีการเปลี่ยนกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินสได้น้อยแต่ข้าวยังสามารถเจริญ ผลผลิตข้าวอยู่ในปริมาณที่สูงได้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียย่อยไคตินบางไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้สูงด้วยเช่นกัน

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินส ซึ่งเป็น PR-protein ที่เชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์เชื้อรา (ขวัญนตร, 2550) ดังนั้นการ

กระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ไคตินเนสจึงมีบทบาทสำคัญส่วนหนึ่งเพื่อตอบสนองการป้องกันตัวเองของพืช และเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้



ภาพที่ 8 ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวเมื่อรดด้วย

แบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้สูง และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

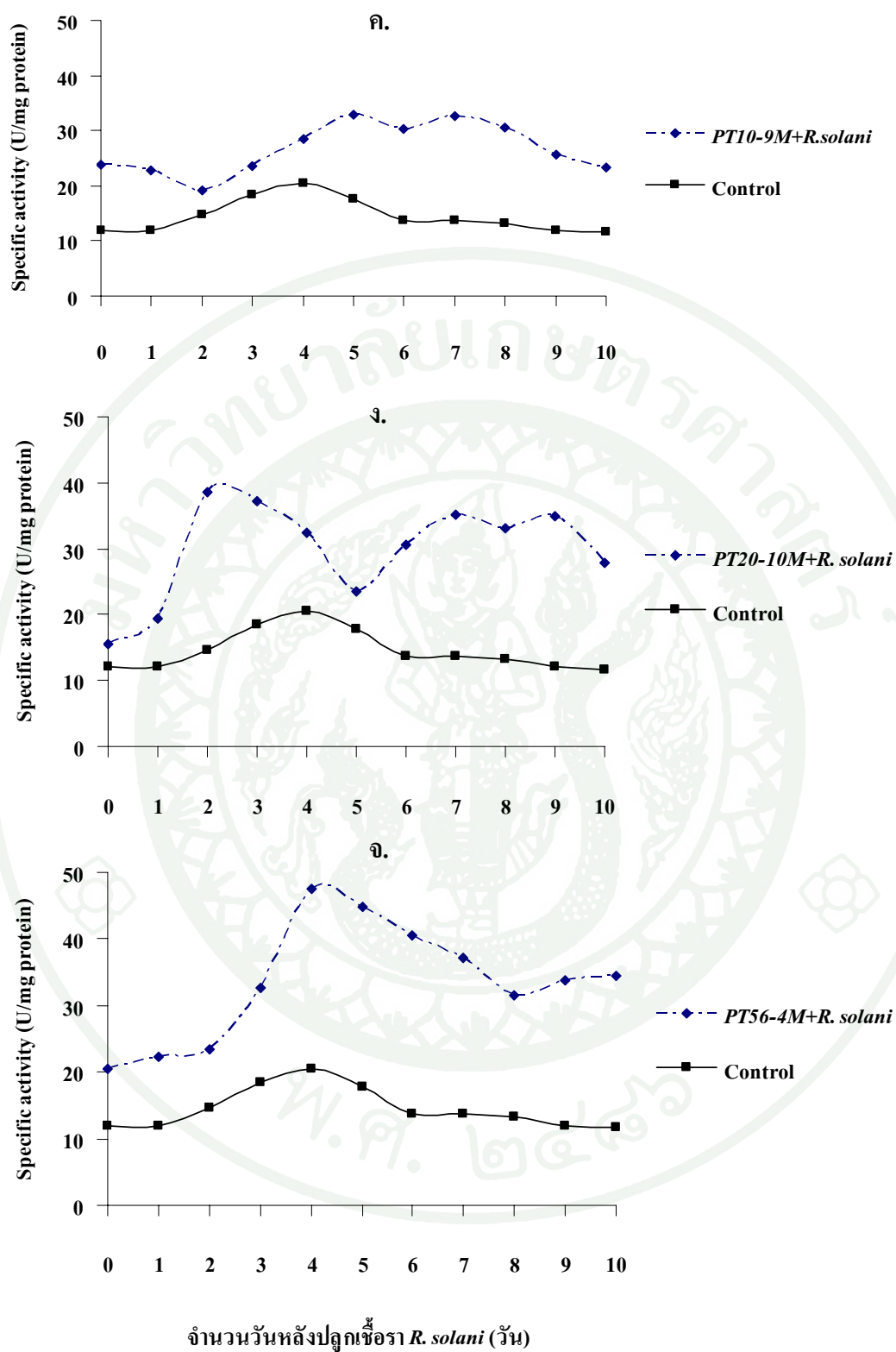
ก. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT7-1M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ข. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT9-1M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

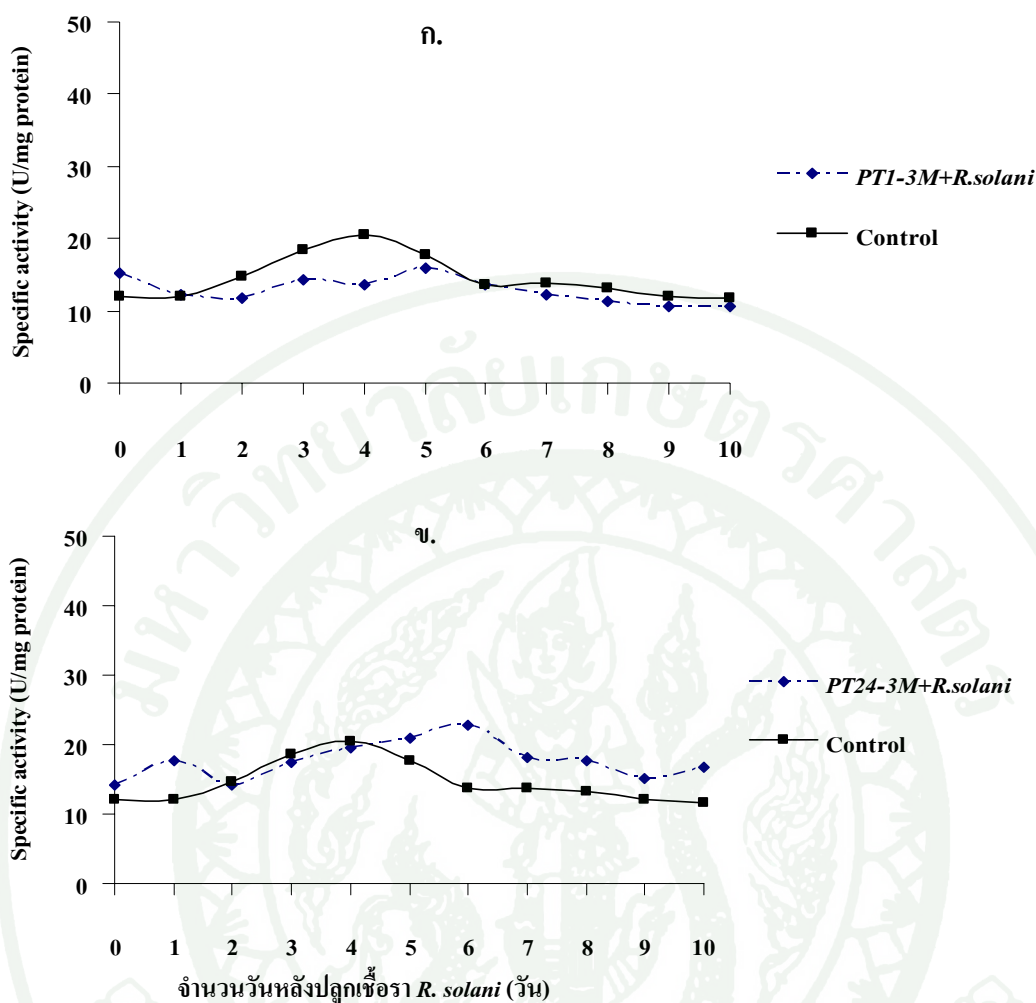
ค. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT10-9M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ง. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT20-10M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

จ. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT56-4M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

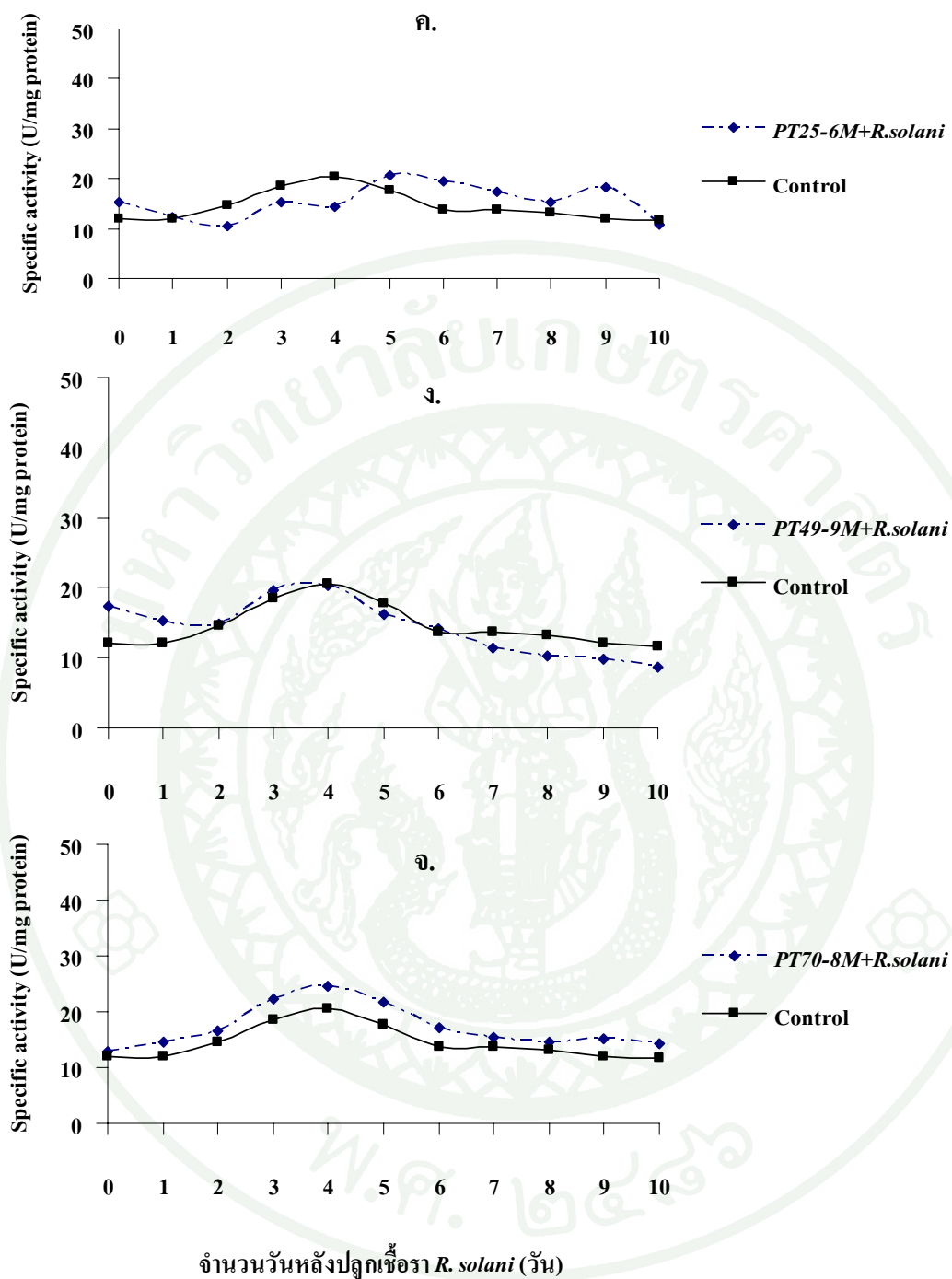


ภาพที่ 8 (ต่อ)



ภาพที่ 9 ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและยอดข้าวเมื่อรดด้วย
แบคทีเรียที่ย่อยไคตินได้ต่ำและปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

- ก. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT1-3M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ข. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT24-5M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ค. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT25-6M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- ง. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT49-9M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
- จ. กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลท PT70-8M เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม



ภาพที่ 9 (ต่อ)

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ในต้นพืชสามารถค้นพบได้ตลอดเวลา เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อม การดูแลรักษาต้นพืช ทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่พบว่าเอนไซม์ในต้นข้าวมีการเปลี่ยนแปลงมาก ดังนั้นการศึกษากการชักนำให้พืชต้านทานโรคจึงควรมีช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สามารถแยกแบคทีเรียย่อยโคตินที่เจริญครอบครองรากในสภาพธรรมชาติและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้ 2 ลักษณะ คือ แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโคตินได้สูงและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้จำนวน 5 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโคตินได้ต่ำแต่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *R. solani* จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบในระดับแปลงปลูกข้าว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์โคตินเอสในใบและยอดของกล้าข้าวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียย่อยโคตินได้สูง พบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โคตินเอสเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 4-7 โดยแบคทีเรียย่อยโคตินไอโซเลท PT56-4M มีค่า specific activity สูงที่สุด (49.0 U/mg protein) ในขณะที่แบคทีเรียย่อยโคตินได้ต่ำมีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคตินเอสในต้นข้าวเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงวันที่ 3-8 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ระหว่าง 14.7-19.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยโคตินต่อการลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวในแปลงปลูกข้าว พบว่าการชักนำให้ต้นข้าวต้านทานต่อโรคกาบใบแห้งด้วยการรดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียย่อยโคตินลงบริเวณกอข้าวร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว สามารถลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้โดยมี specific activity ของเอนไซม์โคตินเอสเพิ่มสูงขึ้น ช่วงวันที่ 2-7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของการเกิดโรคได้ในช่วง 7 วัน หลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้แบคทีเรียย่อยโคตินยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้โดยน้ำหนักผลผลิตต่อรวง และน้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดต่อ 1,000 เมล็ด เพิ่มขึ้นด้วย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ในต้นข้าวโดยพิจารณาเอนไซม์โคตินเอสเพียงชนิดเดียวนั้นแม้จะไม่สามารถอธิบายกลไกของแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่เกี่ยวกับการควบคุมโรคกาบใบแห้งได้ทั้งหมด แต่ก็สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับการส่งเสริมการเจริญของข้าวและลดความรุนแรงของโรคได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นร่วมด้วย นอกจากนี้ในการใช้แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่มีคุณสมบัติเด่นเพียงสายพันธุ์เดียวอาจไม่ใช่สายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคข้าวจึงควรมีการศึกษาคุณสมบัติเด่นของแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์สายพันธุ์อื่น แล้วศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการข้าว. 2550. สถิติข้อมูล. Available source: <http://www.ricethailand.go.th>, March 1, 2010

กรมวิชาการเกษตร. 2550. สถิติข้อมูล. Available source: <http://www.doa.go.th>, March 1, 2010

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2531. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. 34 หน้า.

ขวัญเนตร หินอ่อน. 2550. ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 81 หน้า.

จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2546. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Collectotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทนู และ สรिता ภาคพิเศษ. 2548. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus* sp. เพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวและลดโรคกาบใบแห้ง และโรคเมล็ดด่างของข้าว. หน้า 31. ใน บทคัดย่อ: ABSTRACT การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูเนียม, บุญมี วารินสะอาด, พิรุณ จันทนกุล และ มนูญ เอนกชัย. 2534. การป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิทยาการความก้าวหน้าเทคโนโลยีชีวภาพ: การกลไกกรรมและสิ่งแวดล้อม น. 12-14 .

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูเนียม, บุญมี วารินสะอาด และ มนูญ เอนกชัย. 2535. การควบคุมโรคข้าวด้วยวิธีคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis*. ว. วิชาการเกษตร. 10: 85-89.

นิชากร แซ่ตั้ง. 2551. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 37 หน้า.

ปากเพียร อรรถนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์ วิจิต, ศิริสันธนะ และ สมคิด คีตภาพร. 2544.

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว.

ว. วิชาการเกษตร. 19 (1): 4-12.

ปากเพียร อรรถนารถ, อรุณี สุรินทร์, พยงค์ ขาวสะอาด, วันชัย โรจนหัตถ์ดิน และ สมคิด

คีตภาพร. 2526. การประเมินความเสียหายของผลผลิตของข้าวที่ลดลงเนื่องจากโรคกาบ

ใบแห้ง. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2526 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการ

เกษตร.

ปากเพียร อรรถนารถ, อรุณี สุรินทร์, วันชัย โรจนหัตถ์ดิน, รัศมี จิตติเกียรติพงศ์, พยงค์ ขาวสะอาด,

สมคิด คีตภาพร และ บุญเลิศ คล้ายประยงค์. 2528. การประเมินความเสียหายของ

ผลผลิตของข้าวที่ลดลงเนื่องจากโรคกาบใบแห้ง. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2528

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรุงเทพฯ. 395 หน้า.

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2544. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรุงเทพฯ. 330 หน้า.

มานะ กาญจนมณีเสถียร, มลีนี จาริกภากร, วสันต์ เพชรรัตน์ และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2536.

ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อแอนทาโกนิสต์และเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสาร

สงขลานครินทร์. 15 (1): 101-104

รัศมี จิตติเกียรติพงศ์, นงรัตน์ นิลพานิชย์, อรุณี สุรินทร์ และ ปากเพียร อรรถนารถ. 2542.

การศึกษาจุลินทรีย์จากต้นข้าวที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุ

โรคใบไหม้ของข้าวและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว. ใน รายงานผลงานวิจัย ปี

2542 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วรรณวิไล อินทนู และ จิระเดช แจ่มสว่าง. 2543. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวของพืชในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนใบโดยชีววิธี. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 18 หน้า.

วารุณี มณีนาถ. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคตินเอสได้สูงและการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) FITZP. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 101 หน้า.

วาสนา ฉัตรดำรง. 2539. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 144 หน้า.

วิจิตร ใสทะสุกกุล, เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, ลัดดา นิลรัตน์, วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล, ดวงพร คันธโชติ, อรัญ หันพงศ์กิติกุล, มานะ กาญจนมณีเสถียร, สุวันา รัตนชัยวงศ์, ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสา, ขวัญจิต อังโพธิ์, เพ็ญแข วันชัยชนะวงศ์, สมคิด ดิสถาพร, นงรัตน์ นิลพานิชย์, พากเพียร อรัญนารถ, วิจิต ศิริสันธนะ, พาณี หนูนิ่ม, และ นลินี จาริกภากร. 2542. การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว. ใน รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

วิชัย โมลีรัตน์. 2537. บทปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิสิฐ จะวะสิต และ ลูกจันทร์ ภักษ์พันธุ์. 2533. โคโคแซนโพลิเมอร์ตัวใหม่จากของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-8 หน้า.

ศิริวรรณ คุณากร. 2521. โรคพืชและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมคิด ดิสถาพร. 2540. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร. 92 หน้า.

- สมบัติ ศรีชูวงศ์ และ นิตยา สุวรรณรัตน์. 2527. โรคของพืชเศรษฐกิจบนที่สูง. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, น. 23-24.
- สายพิน ไชยนันท์, บาจริย์ หล่อเหลียม, ฌัฏฐา สุปัญญากร และ สุพนิต ศิวเวทีกุล. 2551. การยับยั้งเชื้อราโรคพืชของจุลินทรีย์ดินที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 4 หน้า
- ศิริวัฒน์ ฐวังควัฒน์. 2536. การป้องกันกำจัดโรคกาบใบแห้งของข้าวหอมที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 55 หน้า
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์, จิระเดช แจ่มสว่าง และ ชรรณศักดิ์ สมมาตย์. 2541. เอกสารการสอนชุดวิชาการจัดการศัตรูพืช. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม และ จารุวัฒน์ เกาธรรมพิทักษ์. 2548. แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปุ๋ย ฮอร์โมนพืช และฆ่าเชื้อโรคพืช เพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุดมชัย จินะดิษฐ์. 2535. ผลกระทบจากเปลือกกึ่งกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสาร สสท. ฉบับเทคโนโลยี 19 (104): 50-54.
- Arwiyanto, T., M. Gota, S. Tsuyumu and Y. Takikawa. 1994. Biological control of bacterial wilt of tomato by avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolate from *Strelitzia reginae*. Ann. **Phytopath. Soc. Japan**. 60: 421-430.
- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied Environmental and Microbiology**. 62: 4081-4085.
- Agrios, G. 1997. **Plant Pathology**. Academic Press, New York

- Belmar, S.B., R.K. Jones and J.L. Starr. 1987. Influence of crop rotation on inoculum density of *Rhizoctonia solani* and sheath blight incidence in rice. **Phytopathology** 77: 1138-1143.
- Barrows-Broadus, J. and T.J. Kerr. 1981. Inhibition of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* with causal agent of pitch canker by the soil bacterium *Arthrobacter* sp. **Can. J. Microbiol.** 27: 20-27.
- Chaiharn, M., S. Chunhaleuchanon, A. Kozo and S. Lumyong. 2008. Screening of Rhizobacteria for their Plant Growth Promotion Activities. **KMITL Sci. Tech. J.** 18-23.
- Chet, I. and R. Baker. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil, **Phytopathology** 70: 994-998.
- Chet, J.Y., A. Elad, Y. Kalfon, Y. Hadar and J. Katan. 1983. Integrated control of soil borne and bulborne pathogens in iris. **Horticulture Abstracts** 53: 515.
- Chin, T. F. C., D. van den Broek, G. de Voer, K.M. G. M. van der Drift S., Tuinman, J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg and G. V. Bloemberg. 2001. Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 969-979.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen. **The Amer. Phytopathol. Minnisota.** 539 p.
- Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduction microorganisms for biological control of plant pathogens. **Phytopathology** 31: 53-80.
- Cody, R.M., N.D. Davis, J. Lin and D. Shaw. 1990. Screening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugar. **Biomass.** 21: 285-295.

Correa, T.U., N. Elango, I. Polacheck and E. Cabib. 1982. Endochitinase, a mannan associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol. Chem.** 257: 1392-1397.

Elad, Y., I. Chet and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.** 28: 719-725.

Fridlender, M., J. Inbar and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biol. Biochem.** 25: 1211-1221.

Ginnakis, C., C.S. Bucheli, K.G.M. Skene, S.P. Robinson and S.N. Scott. 1998. Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves : a possible defense against powdery mildew infection. **Aus. J. of Grape and Wine Res.** 4: 14 -22.

Groth, D. E. and J. A. Bond. 2008. Effects of Cultivars and Fungicides on Rice Sheath Blight, yield, and Quality. **Plant Dis.** 91 (12): 1647-1650.

Gupta, R., R. K. Saxena, P. Chaturvedi and J. S. Viridi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. **Appl. Bacteriol.** 78:378-383.

Hallmann, J., A. Quadts-Hallmann, W.F. Mahaffee and J.W. Kleopfer. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crop. **Can. J. Microbiol.** 43:895-914.

Harder, Y., I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** 69: 64-68.

He, H., L.A. Silo-Suh, J. Handelsman and J. Clardy. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. **Tetrahedron Lett.** 35: 2499-2502.

IRRI. 1978. Annual Report for 1977. 256 p.

- Loeffler, W., J.S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T.F. Hsieh and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. **Phytopathology** 115: 204–213.
- Lim, H., Y.Kim and S. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:510-516.
- Jager, E.S., F.C. Wehner and L. Korsten. 2001. Microbial Ecology of the mango phylloplane. **Springer**. Verlag, New York, Inc.
- Kamil Z, M. Rizk, M. Saleh and S. Moustafa, 2007. Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. **Global Journal of Molecular Sciences** 2 (2): 57-66.
- Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. **Bacteriol** 40: 449-474.
- Kleifield, O. and I. Chet. 1992. *Trichoderma harzianum*-interaction with plant and effect on growth response. **Plant Soil** 144: 267-272.
- Kishore G. K., P. Suresh and A.R. Podile. 2005. Biological control of late leaf Spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. 95: 1157-1165.
- Intana, W. 2003. **Selection and Development of *Trichoderma* spp. for high glucanase, antifungal metabolite producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by *Pythium* spp.** Ph.D Thesis. Kasetsart University, Bangkok.

- Matthieu, H.A., J. Joosten and J.G.M. De Pierrewit. 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-glucanases and chitinases. **Plant Physiol.** 89: 945-951.
- Mew, T.W. and A. M. Rosales. 1986. Bacterization of rice plant for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 76: 1260-1264.
- Mew, T. W. and A. M. Rosales. 1992. Control of *Rhizoctonia* sheath blight and other diseases of rice by seed bacterization. **Biological Control of Plant Diseases.** 113-123.
- Mew, T. W., B. Cottyn, R. Pamplona, H. Barrios, L. Xiangmin, C. Zhiyi, L. Fan, N. Nilpanit, P. Arunyanart, P. V. Kim and P. V. Du. 2004. Applying rice seed-associated antagonistic bacteria to manage rice sheath blight in developing countries. **Plant Dis.** 88:557-564.
- Monreal, J. and E.T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Can. J. Microbiol.** 15: 689-696.
- Nagarajkumar, M., R. Bhaskaran and R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen, **Microbiol. Res.** 159: 73-78.
- Nagarajkumar, M., J. Jayaraj, S. Muthukrishnan, R. Bhaskaran and R. Velazhahan. 2005. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research** 160: 291-298.
- Ohtakara, A., M. Matsutomi and Y. Uchida. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. **J. Ferment. Technol.** 57 (3): 169-177.

- Ordentlich, A., Y. Elad and I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology** 78: 85-88.
- Ou, S. H. 1987. **Rice Diseases**. Commonwealth Mycological Institute UK.
- Pengnoo, A., C. Kusonwiriawong, L. Nilratana and M. Kanjanamaneesathian. 2000. Greenhouse and field of the bacteria antagonists in pellet formulations to suppress blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. **Bio Control** 45: 245-246.
- Penyalver, R., A. García, A. Ferrer, E. Bertolini and M.M. López. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2673–2677.
- Prabavathy, V.R., N. N. Mathivanan and K. Murugesan. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. **Biological Control** 39: 313–319.
- Reissig, J.L., J.L. Strominger and L.F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar. **J. Biol. Chem.** 217: 959-966.
- Reyes-Ramirez, A., B.I. Escudero-Abarca, G. Aguilar-Uscanga, P.M. Hayward-Jones and J. E. Barbozacorona. 2004. Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. **J. of food science**. 69 (5): 130-134.
- Ridout, C.J., J.R. Coley-Smith and J.M. Lynch. 1988. Function of extracellular enzyme from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Microb Technol.** 10: 180-187.
- Roy, A.K. and U.N. Saikai. 1976. Chemical control of sheath blight of rice. **Indian Phytopathol.** 29: 354-356.

- Saha, S. and A. Dutta. 2007. Incidence of diseases in kharif rice in Murshidabad. **Journal of Interacademia**. 11(3): 377-378.
- Sarker, B., N.R. Chowdhury, G.B. Nair, M. Nishibuchi, T.Y. Yamasaki, S.K. Gupta, S.K. Bhattacharya and T. Ramamurthy. 2003. Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* of similar serovars isolated from sewage and clinical cases of diarrhoea in Kolkata, India. **World J Microbiol Biotechnol**. 771 p.
- Schaad, N.W. 1980. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. **American Phytopathol Society**. 72 p.
- Schippers, B., A.W. Bakker and P.A.H.M. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathol**. 25: 339-358
- Sherief, A.A., M.M.A. El-Sawah and M.A.A. El-Naby. 1991. Some poperties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. **Appli. Microbol. Bitechnol**. 35: 228-230.
- Someya N., H. Iyozumi, S. Ui, T. Komagata, K. Watanabe, K. Hirayae, K. Tsuchiya, T. Hibi and K. Akutsu. 1997. Potential of a chitinolytic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2, as a biological control agent for plant fungal diseases. 198–202.
- Someya N., N. Kataoka, T. Komagata, K. Hirayae, T. Hibi and K.Akutsu. 2000. Biological control of cyclamen soil-borne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. **Plant Dis** 84: 334–340
- Someya N, M. Nakajima, T. Hibi, I. Yamaguchi, K. Akutsu. 2002. Induced resistance to rice blast by antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2. **J. Gen. Plant Pathol**. 68: 177–182.

- Someya N, N. Kataoka, T. Komagata, K. Hirayae, T. Hibi and K. Akutsu. 2003. Biological control of rice blast by the epiphytic bacterium *Erwinia ananas* transformed with a chitinolytic enzyme gene from an antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2. **J. Gen. Plant Pathol.** 69: 276–282
- Suryadi, Y. and T.S. Kadir Sukamandi. 1989. Field evaluation of fungicides to control rice sheath blight. **International Rice Research Newsletter.** 14 (3): 12-14.
- Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1990. Applications of fluorescent pseudomonads to control root diseases of wheat and some mechanisms of suppression. In: D. Hornby, Editor, Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens, University of Arizona Press, Tucson. 109 - 122.
- Ueda, M. and M. Arai. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. **Biotechnol.** 56 (3): 460-464.
- Vyas, P.R. and M.V. Deshpande. 1989. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation . **J. Gen. Appl. Microbiol.** 35: 343-350.
- Yabuki, M., K. Mizushima, T. Amatatsu, A. Ando, T. Fujii, M. Shimada and M. Yamashita. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anarogenes* A52. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 32: 25-38.
- Young, M.E., R.L. Bell and P.A. Carroad. 1985. Kinetics of chitinase production II. Relationship between bacterial growth, chitin hydrolysis and enzyme synthesis. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 776-780.
- Zhang, Z. and G.Y. Yuen. 2000. The Role of Chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia*. Strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology** 90:384-389





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

สูตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้หลังจากเตรียมเสร็จให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

อาหารจำเพาะ (chitin agar selective medium) ดัดแปลงจาก Ueda and Arai (1992)

Colloidal chitin	30	กรัม
NH ₄ Cl	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	กรัม
CuSO ₄ ·nH ₂ O	0.001	กรัม
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.001	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

เทอาหารแบบ double layer plate agar (Carrood and Tom, 1978)

1.1 Basal medium ประกอบด้วยสูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่ได้ colloidal chitin เทอาหารลงในจานอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง

1.2 อาหารสำหรับทดสอบหน้า เป็นสูตรอาหารเดียวกับข้อ 1.1 แต่เติม colloidal chitin 30 กรัม ต่อลิตร ลงไปด้วย เขย่าอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเททับลงไปบน basal medium ที่เตรียมไว้แล้ว โดยเททับประมาณ 5 มิลลิลิตร

สำหรับการเตรียม colloidal chitin คัดแปลงวิธีของ Monreal and Resse (1969) โดยชั่ง chitin (poly-(1-4)- β -D-N-acetylglucosamine, crab shell, Sigma) จำนวน 2.5 กรัม และเติมกรด ฟอสฟอริก 85% ปริมาตร 250 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ และคนอยู่เสมอๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำเย็น แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender) ล้างตะกอนไคตินที่ เตรียมด้วย NaOH (1N) และตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้วใช้น้ำกลั่นล้างต่อไป จนกระทั่ง pH 7 ทิ้งให้แห้งก่อนนำมาใช้ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Nutrient glucose agar (NGA) (Schaad, 1980)

Beef extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Nutrient glucose agar (NGB)

Beef extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนข้าวเปลือก (นิชากร, 2551)

เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ในถุงพลาสติกที่บรรจุด้วยเมล็ดข้าวเปลือกต้ม (เมล็ดเริ่มปรี) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 7 วัน ให้เชื้อราเจริญสร้างเส้นใยจนเต็มถุงเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส





ภาคผนวก ข
สีและน้ำยาที่ใช้ซ่อมเซลล์เบคทีเรีย

Gram's stain (วิชัย, 2537)

Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	2	กรัม
--------------------------	---	------

Ethyl alcohol 95 %	20	มิลลิลิตร
--------------------	----	-----------

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
------------------	-----	------

น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

Safranin O	2.5	กรัม
------------	-----	------

Ethyl alcohol 95 %	100	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------

Gram's iodine solution

Iodine (crystal)	1	กรัม
------------------	---	------

Potassium iodide (KI)	2	กรัม
-----------------------	---	------

น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

Alcohol-acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95 %	250	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------

Acetone	250	มิลลิลิตร
---------	-----	-----------

Endospore stain

Malachite green

Malachite green	5	กรัม
-----------------	---	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

Safranin O

Safranin O	2.5	กรัม
------------	-----	------

Ethyl alcohol 95 %	100	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------



1. การเตรียม 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 (ขวัญเนตร, 2550)

เตรียมโดยผสมสาร A จำนวน 14.8 มิลลิลิตร กับสาร B จำนวน 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งมาเชื้อให้ได้ 200 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

สาร A

0.2 M Glacial acetic acid	11.55	กรัม
Distill water	1	ลิตร

สาร B

0.2 M Sodium acetate	27.2	กรัม
Distill water	1	ลิตร

การเตรียม 0.05 M Sodium acetate buffer pH 5.5 โดยทำการเจือจาง 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 ในน้ำกลั่นนึ่งมาเชื้อในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (ขวัญเนตร, 2550)

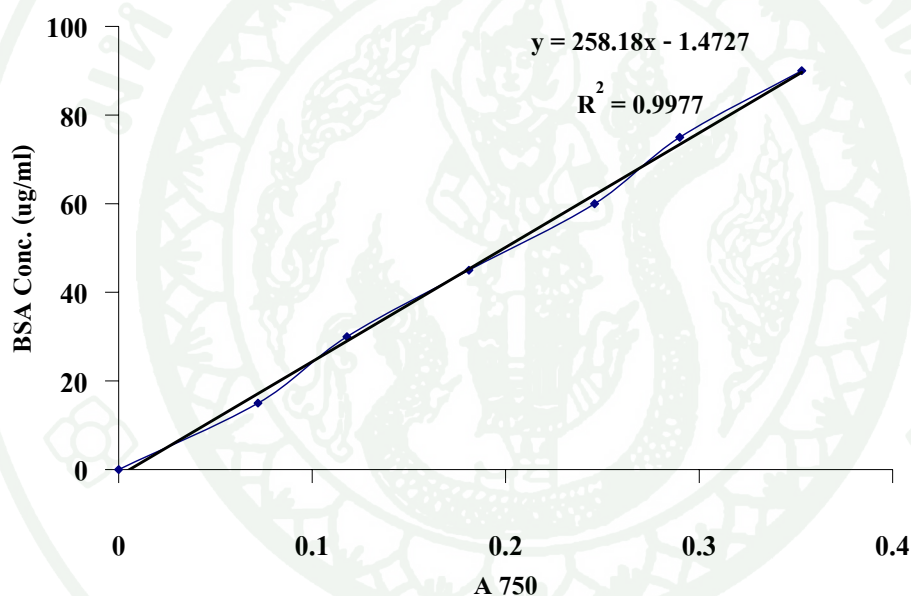
2.1 สารเคมีที่ใช้

สารละลาย Alkaline Copper

เตรียมโดยผสม 4 % (W/V) Na_2CO_3 , 0.2 M NaOH, 1 % (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 2% (W/V) Sodium Potassium tartrate ในอัตราส่วน 49:49:1:1 โดยเตรียมก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2.2 การเตรียม standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA) (ขวัญเนตร, 2550)

เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75, และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นบรรจุหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย Alkaline Copper จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย folin-ciocalteu phenol reagent (Lowry *et al.* 1951) เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (Absorbance 750 nm = A 750 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างโปรตีนและค่า A 750



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944) (ขวัญเนตร, 2550)

3.1 สารเคมีที่ใช้

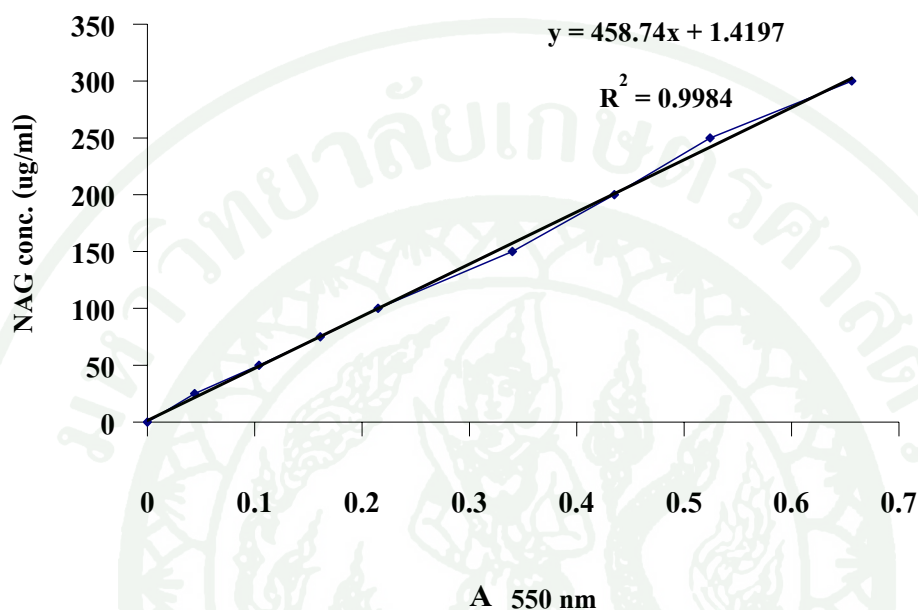
3.1.1 copper reagent เตรียมสารละลาย Cu reagent (Alkaline Copper Solution) โดยละลาย Na_2CO_3 24 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลายแล้วเติม Potassium Sodium Tartrate 12 กรัม คนให้ละลายจึงเติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 10% ลงไป 40 มิลลิลิตร (เวลาเติมน้อยๆ เติมน้ำไปช้าๆ และคนไปด้วย) จากนั้นจึงเติม NaHCO_3 16 กรัม คนให้ละลาย เติมสารละลาย Na_2SO_4 (Na_2SO_4 180 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 สัปดาห์ กรองเอาตะกอนออก

3.1.2 Nelson reagent เตรียมสารละลาย Nelson reagent (Nelson Solution) โดยละลาย ammonium molybdate 50 กรัมในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium arsenate (sodium arsenate 6 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 คืน กรองเอาตะกอนออก

3.2 การเตรียม standard curve ของ N-acetylglucosamine

3.2.1 เตรียมสารละลาย N-acetylglucosamine เข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำเย็นทันทีโดยแช่น้ำเย็นจัด เติม nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Absorbance 550 nm = A 550 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ N-acetylglucosamine และค่า A 550

3.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอย่างเหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetylglucosamine ข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานนั้น



ภาพผนวกที่ ค2 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)



ตารางผนวกที่ ง1 คุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยโคตินซึ่งแยกได้บริเวณผิวดรากข้าว
จากแหล่งปลูกข้าวตามธรรมชาติ

ไอโซเลต	ลักษณะโคติน ^{1/2/3/4/5/}	Gram reaction		การสร้าง endospore
		3% KOH	Gram stain	
PT1	W C F R U	+	+	ND
PT2	W C C S En	-	-	ND
PT3	W C C S En	-	-	ND
PT4	W C R R En	-	-	ND
PT5	C P C S En	-	-	ND
PT6	C P C S U	-	-	ND
PT7	C C F R En	+	+	+
PT8	C C F R En	+	+	ND
PT9	C C F R En	+	+	+
PT10	W C C R En	+	+	+
PT11	W C C S En	-	-	ND
PT12	C C F R En	+	+	ND
PT13	W C C S En	-	-	ND
PT14	W C C S En	-	-	ND
PT15	C C C S En	-	-	ND
PT16	C C C S En	-	-	ND
PT17	C C F R En	+	+	ND
PT18	C C C S U	-	-	ND
PT19	W C F R En	+	+	ND
PT20	W C F R En	+	+	ND
PT21	W R C R U	-	-	ND
PT22	O C F R En	+	+	ND
PT23	C C F R En	+	+	ND
PT24	W C F R En	+	+	ND
PT25	O C F R En	+	+	ND
PT26	O C C R En	+	+	ND
PT27	W C C R En	+	+	ND

ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะ โคโลนี ^{1/ 2/ 3/ 4/ 5/}	Gram reaction		การสร้าง endospore
		3% KOH	Gram strain	
PT28	W C C R E N	+	+	ND
PT29	W C C R U	+	+	ND
PT30	W R C S E n	-	-	ND
PT31	W C C R U	+	+	ND
PT32	W C R R U	+	+	ND
PT33	W C C R U	+	+	ND
PT34	W C R R U	+-	+-	ND
PT35	C R C S E n	+	+	ND
PT36	W C C R U	+	+	ND
PT37	W C C R U	+	+	ND
PT38	C C C R U	+	+	ND
PT39	C C C R U	+	+	ND
PT40	C C C R E n	+	+	ND
PT41	W C R R U	+	+	ND
PT42	Y P C S E n	-	-	ND
PT43	W C R R U	+	+	ND
PT44	W C R R U	+	+	ND
PT45	W C R R U	+	+	ND
PT46	W C F R U	+	+	ND
PT47	C C C R U	+	+	ND
PT48	C C R R U	+	+	ND
PT49	C C F R U	+	+	ND
PT50	C P C S E n	-	-	ND
PT51	C C F R U	+	+	ND
PT52	W P C S E n	-	-	ND
PT53	C C C R E n	+	+	ND
PT54	W I R R E n	-	-	ND
PT55	W I F R E n	-	-	ND
PT56	C C C R U	+	+	+
PT57	W P C S E n	-	-	ND

ตารางผนวกที่ ๑ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี ^{1/2/3/4/5/}	Gram reaction		การสร้าง endospore
		3% KOH	Gram stain	
PT58	W P C S En	-	-	ND
PT59	C C C S U	+	+	ND
PT60	W C C S U	+	+	ND
PT61	C C F R U	+	+	ND
PT62	C C F R U	+	+	ND
PT63	C C F R U	+	+	ND
PT64	W R C S En	-	-	ND
PT65	C C F R U	+	+	ND
PT66	C C F R U	+	+	ND
PT67	W P C S En	-	-	ND
PT68	C C F R L	+	+	ND
PT69	C C C S U	+	+	ND
PT70	C C C S U	+	+	ND
PT71	W P R S En	-	-	ND
PT72	W P C S En	-	-	ND
PT73	W P C S En	-	-	ND
PT74	W C F R U	+	+	ND
PT75	W C F R U	+	+	ND

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

^{1/} สีของโคโลนี

Cream (C) : สีครีม

Orange (O) : สีส้ม

White (W) : สีขาว

Yellow (Y) : สีเหลือง

^{2/} รูปร่างของโคโลนี (form)

Punciform (P) : โคโลนีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร

Circular (C) : โคโลนีรูปร่างกลม

Filamentous (F) : โคโลนีเป็นเส้นสาย ลักษณะคล้ายเส้นใย รูปร่างไม่แน่นอน

Irrigular (I) : โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน

Rhizoid (R) : โคโลนีเป็นเส้นหยากกว่า filamentous แผ่ขยายคล้ายราก

Spindle (S) : โคโลนีปุ่มตรงกลาง

^{3/} ความนูนของโคโลนี (elevation)

Flat (F) : โคโลนีแบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร

Raised (R) : โคโลนีเจริญสูงจากผิวหน้าของอาหาร แต่ส่วนบนของโคโลนีจะเรียบ

Convex(C) : โคโลนีกลมและนูน โคนสูงจากผิวหน้าอาหาร

Pulvinate (P) : โคโลนีกลมนูน โคนสูงจากผิวหน้าอาหารมากกว่า convex

Umbonate (Un) : โคโลนีโคงนูนมีปุ่มตรงกลาง

Umbilicate (UI) : โคโลนีปุ่มตรงกลาง

^{4/} ลักษณะผิวโคโลนี (surface)

Smooth (S) : ผิวโคโลนีเรียบ

Routh (R) : ผิวโคโลนีขรุขระ

Concentrically (Cc) : มีลักษณะเป็นวงแหวน ซ้อนกันหลายชั้น

Contoured (Ct) : ผิวโคโลนีเกลี้ยงแต่เป็นคลื่น ลักษณะของคลื่นไม่แน่นอน

Rugose (Ru) : ผิวโคโลนีเป็นรอยข่น

Granular(G) : ผิวโคโลนีเป็นเม็ด ๆ

^{5/} ริมหรือขอบโคโลนี (margin)

Entire (E) : ขอบเรียบ

Undulate (U) : ขอบไม่เรียบ โคงเว้าเพียงเล็กน้อย

ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

- Lobate (L) : ขอบเป็นคลื่นที่เว้ามาก ลักษณะเป็นข้อ
- Erose (E) : ขอบหยักเป็นฟันสว่าเสมอ
- Filamentous (F) : ขอบเป็นเส้นสาย แบบเส้นใยของรา
- Curled (C) : ขอบโค้ง เป็นเส้นซ้อน ๆ กันและหยักไปมา



ตารางผนวกที่ ง2 แสดงประสิทธิภาพในการย่อย colloidal chitin บนอาหารคัดเลือกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใส ^{1/} (ซม)	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคลไลน์ ^{2/} (ซม)	สัดส่วนการย่อย colloidal chitin (cz/cs)
PT1	1.5	1.1	1.36
PT7	1.9	0.9	2.10
PT8	1.9	1.0	1.90
PT9	2.3	0.8	2.87
PT10	2.7	1.0	2.70
PT12	-	1.5	-
PT17	2.2	1.5	1.47
PT19	0.6	0.4	1.50
PT20	2.5	1.2	2.08
PT22	2.7	1.1	1.55
PT23	0.6	0.3	2.00
PT24	3.1	1.8	1.70
PT25	2.2	1.2	1.83
PT26	1.4	0.7	2.00
PT27	0.7	0.3	2.33
PT28	2.8	1.1	2.54
PT29	3.2	2.4	1.33
PT31	3.0	1.3	2.31
PT32	3.0	2.0	1.50
PT33	2.4	1.2	2.00
PT34	3.5	2.3	1.52
PT36	0.6	0.3	2.00
PT37	2.5	1.3	1.92
PT38	3.0	2.0	1.50
PT39	1.8	1.4	1.29
PT40	2.0	1.5	1.33
PT41	2.2	1.6	1.35
PT43	1.7	1.5	1.13
PT44	2.3	1.5	1.53

ตารางผนวกที่ ง2 (ต่อ)

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณใส ^{1/} (ซม)	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี ^{2/} (ซม)	สัดส่วนการย่อย colloidal chitin (cz/cs)
PT45	2.2	1.6	1.38
PT46	-	2.0	-
PT47	2.5	1.2	2.08
PT48	1.9	1.3	1.46
PT49	3.0	1.9	1.58
PT51	1.5	1.0	1.50
PT53	1.5	1.0	1.50
PT56	2.4	1.0	2.40
PT59	-	1.3	-
PT60	1.4	1.2	1.17
PT61	1.6	1.3	1.36
PT62	1.5	1.1	1.36
PT63	1.5	1.0	1.50
PT65	2.0	0.7	2.86
PT66	1.8	1.2	1.50
PT68	2.5	1.4	1.79
PT69	1.3	1.0	1.30
PT70	1.6	1.4	1.14
PT74	-	2.0	-
PT75	-	2.5	-

^{1/} เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส = CZ

^{2/} เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี = CS

ตารางผนวกที่ ง3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินซึ่งแยกได้จากฝักรากข้าวในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

ไอโซเลท	รัศมีของเส้นใยเชื้อรา <i>R. solani</i>	การยับยั้งการเจริญ ^{1/} (%)	รูปแบบการยับยั้ง ^{2/}
PT1	2.5	44.2	cz
PT7	1.9	58.9	cz
PT8	2.7	40.9	cz
PT9	1.9	58.9	cz
PT10	1.7	62.2	cz
PT12	4.5	0.0	cp
PT17	3.0	33.3	cz
PT19	3.4	25.1	cz
PT20	1.7	62.2	cz
PT22	3.7	17.3	cz
PT23	1.6	64.4	cz
PT24	2.7	39.1	cz
PT25	2.5	44.9	cz
PT26	2.3	50.0	cz
PT27	1.9	58.4	cz
PT28	1.6	63.6	cz
PT29	3.9	14.4	cz
PT31	1.9	57.8	cz
PT32	4.1	8.0	cp
PT33	2.1	53.1	cz
PT34	3.3	26.2	cz
PT36	2.0	55.1	cz
PT37	3.8	16.4	cz
PT38	3.7	17.6	cz
PT39	4.5	0.0	cp
PT40	3.4	25.3	cz
PT41	4.1	8.9	cp
PT43	4.5	0.0	cp

ตารางผนวกที่ 33 (ต่อ)

ไอโซเลท	รัศมีของเส้นใย เชื้อรา <i>R. solani</i>	การยับยั้งการเจริญ ^{1/} (%)	รูปแบบการยับยั้ง ^{2/}
PT44	3.4	25.3	cz
PT45	4.2	5.8	cp
PT46	4.2	6.7	cp
PT47	2.2	52.0	cz
PT48	3.3	26.9	cz
PT49	2.3	50.0	cz
PT51	3.9	13.3	cz
PT53	3.6	21.1	cz
PT56	1.6	64.9	cz
PT59	4.5	0.0	cp
PT60	4.5	0.0	cp
PT61	2.5	45.6	cz
PT62	3.6	20.4	cz
PT63	3.9	12.7	cz
PT65	1.7	62.2	cz
PT66	3.6	20.4	cz
PT68	3.5	22.0	cz
PT69	3.5	23.3	cz
PT70	2.1	54.2	cz
PT74	4.5	0.0	cp
PT75	4.5	0.0	cp
Control	2.1	54.2	cp

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

R1 = ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีการเจริญของเส้นใย *R. solani* ในกรรมวิธีทดสอบ

^{2/} รูปแบบการยับยั้ง cz = เชื้อทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในจานเลี้ยงเชื้อได้และสร้างบริเวณใส (clear zone)

cp = เชื้อทดสอบไม่สร้างบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในจานเลี้ยงเชื้อ

ตารางผนวกที่ 4 แสดงประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ย่อยไคตินสายพันธุ์ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm ในการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

กรรมวิธี	การยับยั้งการเจริญของ		กรรมวิธี	การยับยั้งการเจริญของ	
	เส้นใย <i>Rhizoctonia solani</i>	(%)		เส้นใย <i>Rhizoctonia solani</i>	(%)
PT1/1	17.8		PT9/1	65.6	
PT1/2	11.1		PT9/2	51.1	
PT1/3	57.8		PT9/3	60.7	
PT1/4	21.1		PT9/4	64.4	
PT1/5	22.2		PT9/5	55.1	
PT1/6	32.2		PT9/6	41.6	
PT1/7	0.0		PT9/7	64.4	
PT1/8	55.6		PT9/8	49.8	
PT1/9	4.2		PT9/9	63.6	
PT1/10	0.0		PT9/10	64.4	
PT1 wild type	44.2		PT9 wild type	58.9	
PT7/1	64.9		PT10/1	10.9	
PT7/2	56.7		PT10/2	52.0	
PT7/3	64.9		PT10/3	0.0	
PT7/4	55.6		PT10/4	0.0	
PT7/5	64.4		PT10/5	57.6	
PT7/6	63.6		PT10/6	25.8	
PT7/7	63.3		PT10/7	62.2	
PT7/8	50.7		PT10/8	33.3	
PT7/9	62.2		PT10/9	63.3	
PT7/10	64.4		PT10/10	55.6	
PT7 wild type	58.9		PT10 wild type	63.1	
PT20/1	62.2		PT49/1	46.2	
PT20/2	52.7		PT49/2	33.8	
PT20/3	60.7		PT49/3	44.4	
PT20/4	56.7		PT49/4	32.7	

ตารางผนวกที่ ๓4 (ต่อ)

กรรมวิธี	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย <i>Rhizoctonia solani</i> (%)	กรรมวิธี	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย <i>Rhizoctonia solani</i> (%)
PT20/5	44.4	PT49/5	51.1
PT20/6	45.6	PT49/6	36.0
PT20/7	52.0	PT49/7	46.7
PT20/8	50.0	PT49/8	38.2
PT20/9	63.1	PT49/9	54.9
PT20/10	64.0	PT49/10	13.3
PT20 wild type	62.2	PT49 wild type	50.0
PT24/1	22.2	PT56/1	55.6
PT24/2	0.0	PT56/2	59.8
PT24/3	42.2	PT56/3	55.6
PT24/4	33.3	PT56/4	65.3
PT24/5	40.0	PT56/5	47.1
PT24/6	35.8	PT56/6	60.9
PT24/7	0.0	PT56/7	61.8
PT24/8	33.3	PT56/8	56.9
PT24/9	17.8	PT56/9	36.4
PT24/10	15.6	PT56/10	61.6
PT24 wild type	39.1	PT56 wild type	64.9
PT25/1	10.9	PT70/1	15.6
PT25/2	6.7	PT70/2	55.6
PT25/3	0.0	PT70/3	51.1
PT25/4	10.9	PT70/4	61.6
PT25/5	42.0	PT70/5	44.4
PT25/6	44.9	PT70/6	36.4
PT25/7	43.3	PT70/7	41.8
PT25/8	9.6	PT70/8	60.0
PT25/9	33.8	PT70/9	0.0
PT25/10	0.0	PT70/10	0.0
PT25 wild type	44.9	PT70 wildtype	54.2



ภาคผนวก จ
การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

Program : Biolog MicroLog3 4.20
 Read From File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Save To File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Unrestricted Access? : Yes
 Read Time : พ.ค. 05 2010 11:21
 Parent File : Original Data Record
 Plate Number : 1
 Incubation Time : 4-6
 Sample Number :
 Strain Type : GP-ROD SB
 Strain Number :
 Strain Name : PT7/1
 Other : 20 min
 Data Input Mode : File
 590/750 Filters Used : 6 / 5
 Threshold Mode : Automatic: Color: 32/32
 Number +/- Reactions : 3 / 0 / 93
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:\Biolog420\Databases\GP602.KID

Plate Type: GP2

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
 {X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-11	-19	7	-41	-14	-48	-17	22	-10	-4	-1
B	< 41>	-1	0	-5	-3	8	-9	4	-10	-2	10	7
C	6	-1	-9	-16	-10	-4	-14	-6	3	11	23	19
D	7	14	1	-8	-11	4	< 61>	-15	-7	5	9	11
E	16	13	-2	0	23	21	2	3	23	-14	19	30
F	-6	-24	8	-23	-20	-44	-6	-4	-1	-9	-1	-8
G	-15	16	14	4	-10	-3	-9	-17	13	1	-25	< 43>
H	-28	-6	-4	3	10	-6	14	14	5	13	25	21

=> Too Few Positive Matches <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup B	---	0.47	4.81	GP-ROD SB
2) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup A	---	0.09	5.36	GP-ROD SB
3) <i>Bacillus fastidiosus</i>	---	0.05	5.58	GP-ROD SB
4) <i>Paenibacillus larvae</i> ss larvae	---	0.02	5.93	GP-ROD SB
5) <i>Brevibacillus brevis</i>	---	0.02	5.95	GP-ROD SB
6) <i>Bacillus subtilis</i>	---	0.01	5.97	GP-ROD SB
7) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup D	---	0.01	6.15	GP-ROD SB
8) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	---	0.01	6.32	GP-ROD SB
9) <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (55 C)	---	0.00	6.69	GP-ROD SB
10) <i>Bacillus laevolacticus</i>	---	0.00	8.22	GP-ROD SB
Other)				

การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

Program : Biolog MicroLog3 4.20
 Read From File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Save To File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Unrestricted Access? : Yes
 Read Time : พ.ค. 03 2010 16:06
 Parent File : Original Data Record
 Plate Number : 1
 Incubation Time : 4-6
 Sample Number : Plate Type: GP2
 Strain Type : GP-ROD SB
 Strain Number :
 Strain Name : PT 9 / 1
 Other : 5hr
 Data Input Mode : File
 590/750 Filters Used : 6 / 5
 Threshold Mode : Automatic: Color: 51/84
 Number +/- Reactions : 18 / 15 / 63
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:\Biolog420\Databases\GP602.KID

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
 {X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	6	< 113>	< 180>	5	-4	15	< 254>	< 284>	46	3	-17
B	< 219>	{ 61}	-1	{ 59}	{ 73}	-1	22	28	2	-5	< 132>	-2
C	15	8	< 99>	{ 66}	3	19	21	7	11	-3	{ 67}	2
D	{ 55}	-1	40	45	13	-4	< 169>	-14	30	-8	5	19
E	20	< 135>	< 86>	-35	< 110>	-46	15	27	< 117>	-21	-45	< 95>
F	8	5	32	26	46	-62	25	< 123>	< 102>	-119	{ 62}	28
G	9	17	43	{ 83}	32	16	33	19	42	41	{ 76}	{ 77}
H	< 230>	{ 55}	{ 75}	{ 82}	{ 72}	36	< 97>	{ 51}	32	16	38	< 91>

=> No ID <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=> 1) <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	---	0.44	9.07	GP-ROD SB
2) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup A	---	0.00	10.95	GP-ROD SB
3) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup D	---	0.00	11.23	GP-ROD SB
4) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup B	---	0.00	11.69	GP-ROD SB
5) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	---	0.00	13.23	GP-ROD SB
6) <i>Bacillus mycoides</i>	---	0.00	14.55	GP-ROD SB
7) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup C	---	0.00	15.88	GP-ROD SB
8) <i>Bacillus fastidiosus</i>	---	0.00	16.00	GP-ROD SB
9) <i>Paenibacillus larvae</i> ss larvae	---	0.00	16.00	GP-ROD SB
10) <i>Bacillus licheniformis</i>	---	0.00	16.01	GP-ROD SB
Other)				

การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

Program : Biolog MicroLog3 4.20
 Read From File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Save To File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Unrestricted Access? : Yes
 Read Time : พ.ค. 03 2010 13:55
 Parent File : Original Data Record
 Plate Number : 1
 Incubation Time : 4-6
 Sample Number :
 Strain Type : GP-ROD SB Plate Type: GP2
 Strain Number :
 Strain Name : PT10/9
 Other : 120 min
 Data Input Mode : File
 590/750 Filters Used : 6 / 5
 Threshold Mode : Automatic: Color: 60/65
 Number +/- Reactions : 14 / 1 / 81
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:\Biolog420\Databases\GP602.KID

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
 {X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-5	38	< 84>	45	13	25	< 152>	< 215>	39	34	42
B	< 137>	13	32	< 78>	< 87>	10	40	25	54	40	< 82>	34
C	11	3	33	26	50	< 76>	24	35	23	12	< 68>	31
D	22	6	52	58	41	14	< 107>	38	44	{ 64}	34	< 76>
E	6	< 69>	52	21	< 110>	25	-2	37	46	7	36	32
F	11	28	27	3	21	-7	30	7	< 87>	9	32	20
G	-5	27	41	37	57	46	26	22	47	28	53	37
H	33	4	37	35	49	8	33	15	20	18	22	53

=> No ID <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=> 1) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	---	0.40	9.88	GP-ROD SB
2) <i>Bacillus megaterium</i>	---	0.00	11.82	GP-ROD SB
3) <i>Bacillus fastidiosus</i>	---	0.00	12.00	GP-ROD SB
4) <i>Bacillus halodurans</i>	---	0.00	13.00	GP-ROD SB
5) <i>Bacillus subtilis</i>	---	0.00	13.34	GP-ROD SB
6) <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (55 C)	---	0.00	13.94	GP-ROD SB
7) <i>Bacillus licheniformis</i>	---	0.00	14.28	GP-ROD SB
8) <i>Bacillus coagulans</i>	---	0.00	14.58	GP-ROD SB
9) <i>Paenibacillus macerans</i>	---	0.00	14.91	GP-ROD SB
10) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup A	---	0.00	15.42	GP-ROD SB
Other)				

การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

Program : Biolog MicroLog3 4.20
 Read From File : C:\Biolog\jeab.D4C
 Edit Status : OK
 Unrestricted Access? : Yes
 Read Time : ๑๓.๐3 2010 10:48
 Parent File : Original Data Record
 Plate Number : 1
 Incubation Time : 16-24
 Sample Number : 2 Plate Type: GP2
 Strain Type : GP-ROD SB
 Strain Number :
 Strain Name : PT 20110
 Other :
 Data Input Mode : File
 590/750 Filters Used : 6 / 5
 Threshold Mode : Automatic: Color: 99/190
 Number +/- Reactions : 33 / 25 / 38
 Database To Search : Microlog/User
 Data Base(s) Searched : C:\Biolog\Databases\GP602.KID /

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
 {X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	< 693>	< 853>	< 865>	< 219>	32	73+	{ 129}	97	{ 169}	62	{ 115}
B	{ 159}	7	< 463>	< 405>	< 445>	37	{ 147}	54	< 231>	77+	< 590>	56
C	24	89	< 508>	< 689>	84	< 477>	83	53	33	29	{ 178}	< 240>
D	< 311>	68	< 452>	< 294>	< 271>	32	< 275>	< 370>	{ 134}	< 203>	27	< 499>
E	< 208>	< 602>	< 537>	48	{ 162}	{ 113}	32	43	98	5	84	{ 175}
F	63	{ 102}	{ 119}	-38	< 237>	< 195>	{ 172}	51	< 253>	{ 101}	< 233>	{ 112}
G	82	< 218>	{ 153}	{ 121}	{ 105}	{ 157}	{ 154}	{ 128}	{ 174}	55	44	17+
H	< 263>	< 237>	{ 162}	< 299>	< 230>	80	{ 119}	42	76	48	91	{ 130}

=> Species ID: Bacillus licheniformis <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=> 1) Bacillus licheniformis	94	0.60	5.62	GP-ROD SB
2) Bacillus amyloliquefaciens	6	0.04	6.53	GP-ROD SB
3) Bacillus megaterium	0	0.00	9.79	GP-ROD SB
4) Bacillus subtilis	0	0.00	10.47	GP-ROD SB
5) Bacillus circulans	0	0.00	11.14	GP-ROD SB
6) Paenibacillus pabuli	0	0.00	11.45	GP-ROD SB
7) Virgibacillus pantothenicus	0	0.00	12.08	GP-ROD SB
8) Bacillus pumilus	0	0.00	12.22	GP-ROD SB
9) Bacillus psychrosaccharolyticus	0	0.00	12.69	GP-ROD SB
10) Bacillus halodurans	0	0.00	13.10	GP-ROD SB
Other)				

การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system

Program : Biolog MicroLog3 4.20
 Read From File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Save To File : D:\labwork\bo-090353.D4C
 Unrestricted Access? : Yes
 Read Time : พ.ค. 03 2010 21:16
 Parent File : Original Data Record
 Plate Number : 1
 Incubation Time : 4-6
 Sample Number :
 Strain Type : GP-ROD SB Plate Type: GP2
 Strain Number :
 Strain Name : PT56/4
 Other : 2hr
 Data Input Mode : File
 590/750 Filters Used : 6 / 5
 Threshold Mode : Automatic; Color: 60/85
 Number +/b/- Reactions : 17 / 9 / 70
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:\Biolog420\Databases\GP602.KID

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
 {X}: borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-6	5	< 104>	38	-1	12	41	{ 78}	57	38	-57
B	< 132>	-5	35	< 118>	< 142>	4	35	23	{ 67}	53	< 141>	-66
C	8	1	46	29	< 99>	< 115>	16	24	11	10	{ 71}	53
D	26	1	{ 67}	< 98>	29	9	{ 76}	33	46	{ 67}	9	< 95>
E	0	< 118>	{ 62}	10	< 100>	13	-6	18	53	1	27	40
F	2	17	21	-10	51	60	50	-5	< 172>	54	50	{ 70}
G	-4	29	{ 73}	29	< 114>	< 95>	4	45	< 85>	45	43	< 127>
H	30	4	39	44	39	5	36	3	10	8	20	< 110>

=> No ID <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1) <i>Bacillus megaterium</i>	---	0.61	6.03	GP-ROD SB
2) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	---	0.00	8.87	GP-ROD SB
3) <i>Bacillus licheniformis</i>	---	0.00	9.81	GP-ROD SB
4) <i>Bacillus maroccanus</i>	---	0.00	11.12	GP-ROD SB
5) <i>Bacillus pumilus</i>	---	0.00	11.50	GP-ROD SB
6) <i>Bacillus subtilis</i>	---	0.00	12.24	GP-ROD SB
7) <i>Bacillus racemilacticus</i>	---	0.00	13.21	GP-ROD SB
8) <i>Bacillus anthracis</i> subgroup C	---	0.00	13.37	GP-ROD SB
9) <i>Bacillus halodurans</i>	---	0.00	13.73	GP-ROD SB
10) <i>Bacillus fastidiosus</i>	---	0.00	14.00	GP-ROD SB
Other)				

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเพชรพิกุล วาญมูล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	23 มิถุนายน 2526
สถานที่เกิด	เขตดอนเมือง จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช (พ.ศ. 2548)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการ ย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม 73140 (พ.ศ. 2548-2552)
ประสบการณ์ทำงาน	ผู้ช่วยสอนรายวิชาโรคพืชเบื้องต้น (พ.ศ. 2550- 2551)
ประชุมวิชาการ/ผลงาน	ประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 เรื่อง อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินต่อการเจริญของ เชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว การออกและการเจริญครอบครองรากของกล้าข้าว ประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 เรื่อง ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไคตินในการชักนำ การสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในต้นข้าว