บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมเชื้อไรโซเบียม และเชื้อกลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

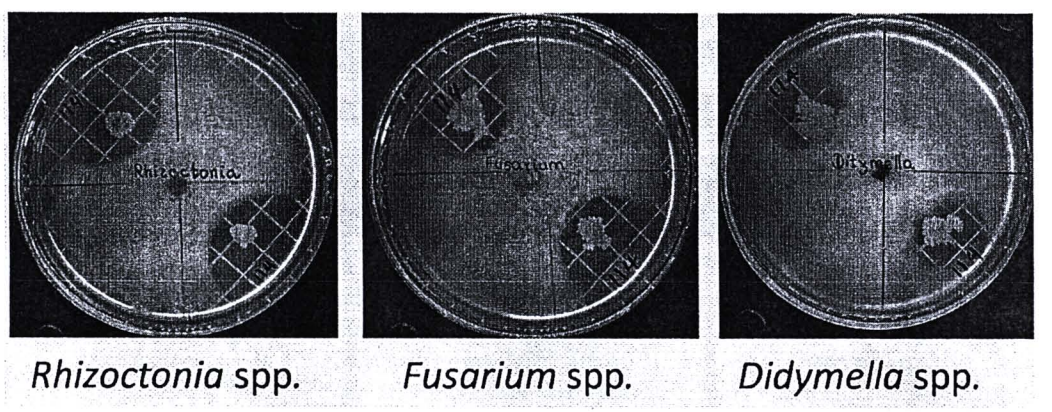
ทำการรวบรวมเชื้อไรโซเบียมจากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 277 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกมาจากปมพืชอาศัย (host) ในแต่ละชนิด รวมทั้งเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากการคัดแยกเองจากการศึกษาครั้งนี้ภายในห้องปฏิบัติการจากปมพืชตระกูลถั่วจำนวน 350 ไอโซเลท ดังแสดงจำนวนของเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เชื้อไรโซเบี่ยมที่รวบรวมได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด

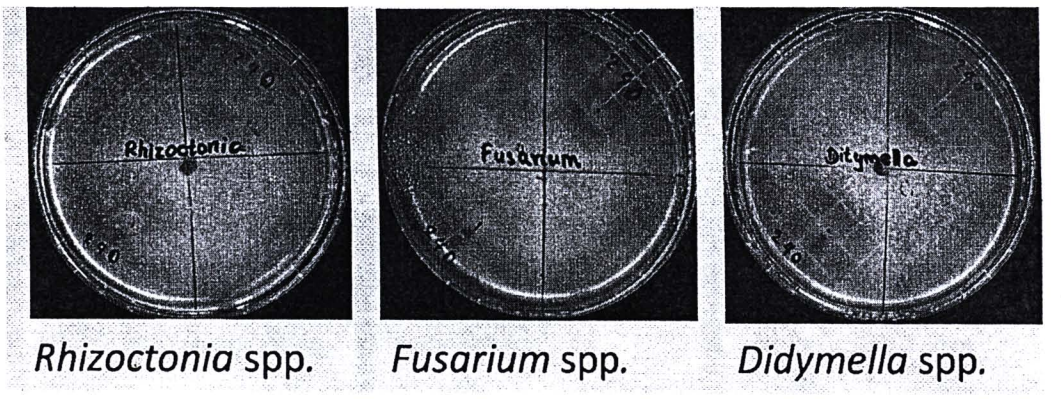
ลำดับ	แหล่งที่มาจากพืชอาศัย	เชื้อโตเร็ว	เชื้อโตช้า
1-10	กระถินณรงค์ *(Acacia auriculiformis Cunn.)*	10	0
11-20	สาธร *(Millettia leucantha Kurz)*	10	0
21-40	ไมยราพไร้หนาม *(Mimosa invisa)*	19	1
41-60	กราวเครือ *(Pueraria mirifica)*	17	3
61-80	ถั่วเขียวป่า *(Phaseolus lathyroides Linn.)*	20	0
81-100	ถั่วฝักยาว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

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

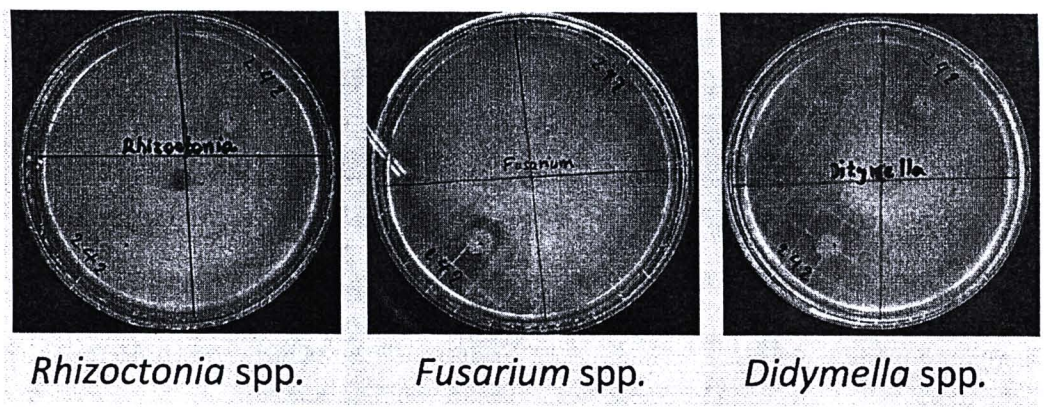
หลังจากนั้นทำการทดสอบความสามารถของเชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าจำนวน 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Didymella* spp. และ *Aspergillus niger* ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 114 ที่ได้จากกรมวิชาการเกษตรโดยคัดเลือกจากพืชอาศัย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



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



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



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

สำนักงานห้องสมุดงานวิจัย

จากนั้นได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการความคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าได้ โดยการการทดสอบการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

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

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

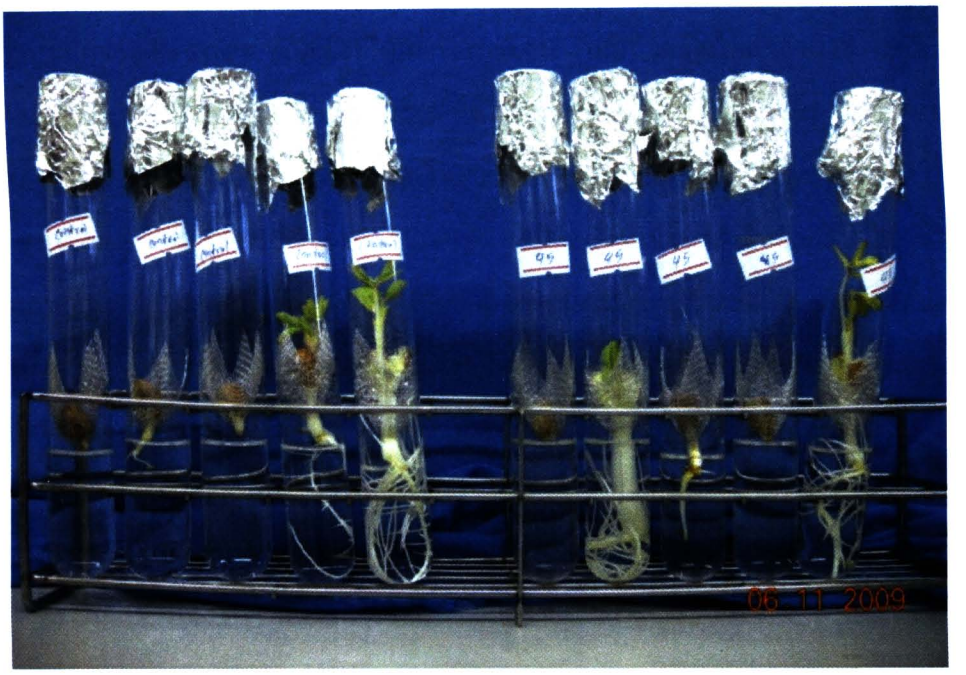
เทคโนโลยีชีวภาพ มาทดสอบเพิ่มเติม เพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าโดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในถั่วลิสง และเป็นโรคที่สามารถติดไปกับเมล็ดถั่วได้ ซึ่งเป็นปัญหาเชื้อราก่อโรครากเน่าที่สำคัญในการเพาะปลูกถั่วลิสง ดังนั้นจึงได้นำเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม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

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

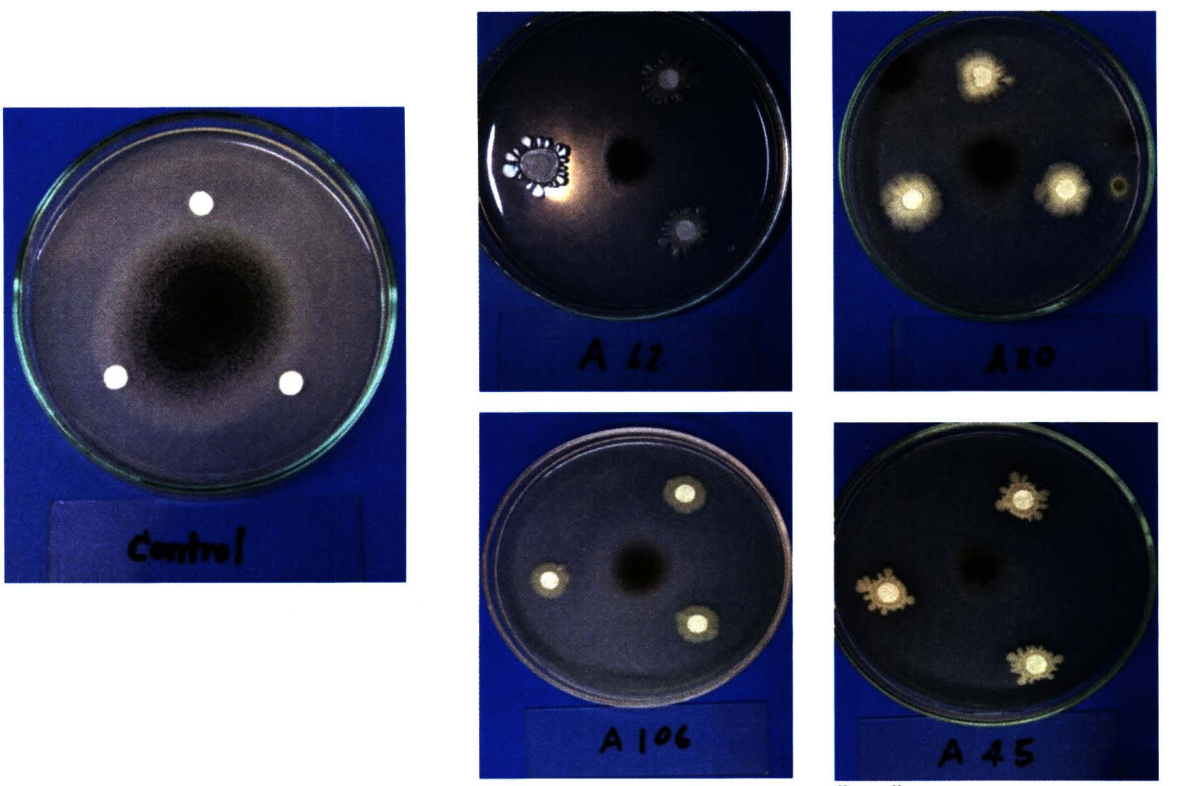
เชื้อแบคทีเรีย (PGPB)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger*	การเกาะติดกับรากถั่วลิสง (log CFU/g roots ± SE)
A106	44.53%^{bc}	10.12 ± 0.28^{b}
A20	42.52%^{bc}	10.16 ± 0.43^{b}
A25	41.58%^{bc}	8.93 ± 0.15^{d}
A43	36.52%^{bc}	9.71 ± 0.53b^{c}
A44	17.98%^{e}	8.26 ± 0.18^{e}
A45	51.42%^{b}	10.84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

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

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



รูปที่ 5 การทดสอบการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์กับรากถั่วลิสง



รูปที่ 6 การยับยั้งเชื้อราของเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับ Control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

2. การระบุชนิดของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

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

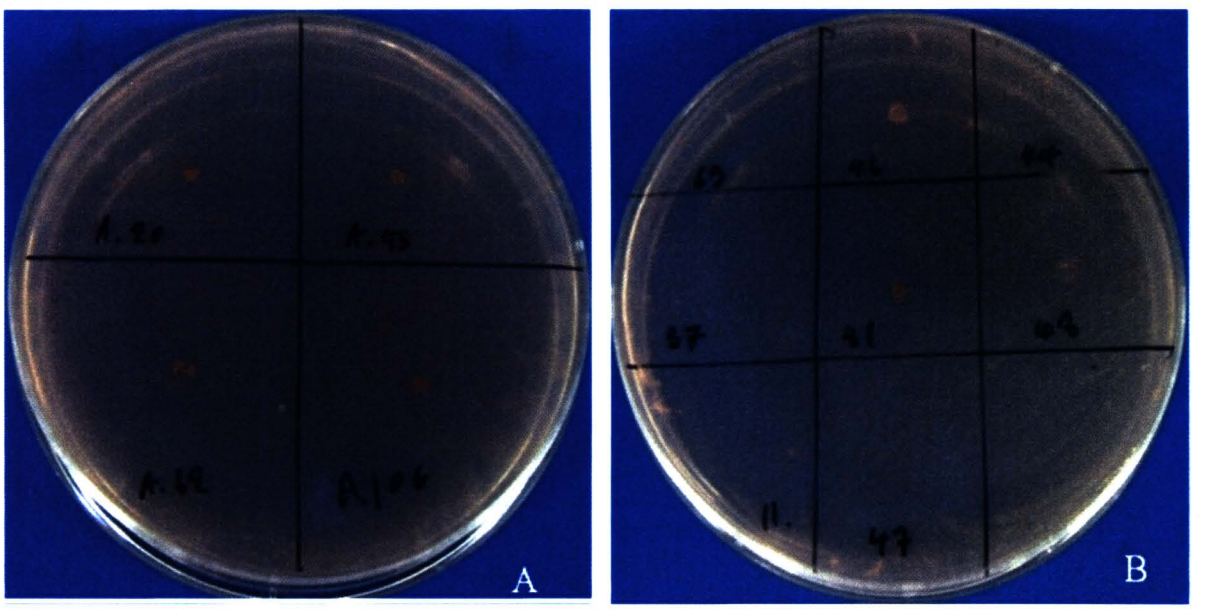
ตารางที่ 3 ระบุชนิดของเชื้อ PGPR โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

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

3. การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้กับเชื้อไรโซเบียม

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

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



รูปที่ 7 การทดสอบการอยู่ร่วมกันได้ของเชื้อ PGPR และ เชื้อไรโซเบียม TAL173

A : เชื้อ PGPR ที่คัดเลือก

B : เชื้อ PGPR อื่นๆ

4. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า

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

เกาะกับรากพืชได้ดี และป้องกันการเข้ายึดเกาะ (colonization) ของเชื้อราก่อโรคที่บริเวณรากพืช ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ในการผลิตไบโอฟิล์ม การสร้างสาร IAA และการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายการเจริญของเชื้อราก่อโรค

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

การตรวจวัดปริมาณไบโอฟิล์มจะวัดจากค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 595 nm

หน่วยการวัดปริมาณ IAA, ppm ต่อ 1×10^8 cfu

\+ มีกิจกรรมของเอนไซม์

\- ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์

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

โปรตีนบนผนังเซลล์ของเชื้อราและส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในขณะที่เชื้อไอโซเลท A106 อาจมีกลไกอื่นในการเข้ายับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

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

5. การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

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

ตารางที่ 5 การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่จะก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

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

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

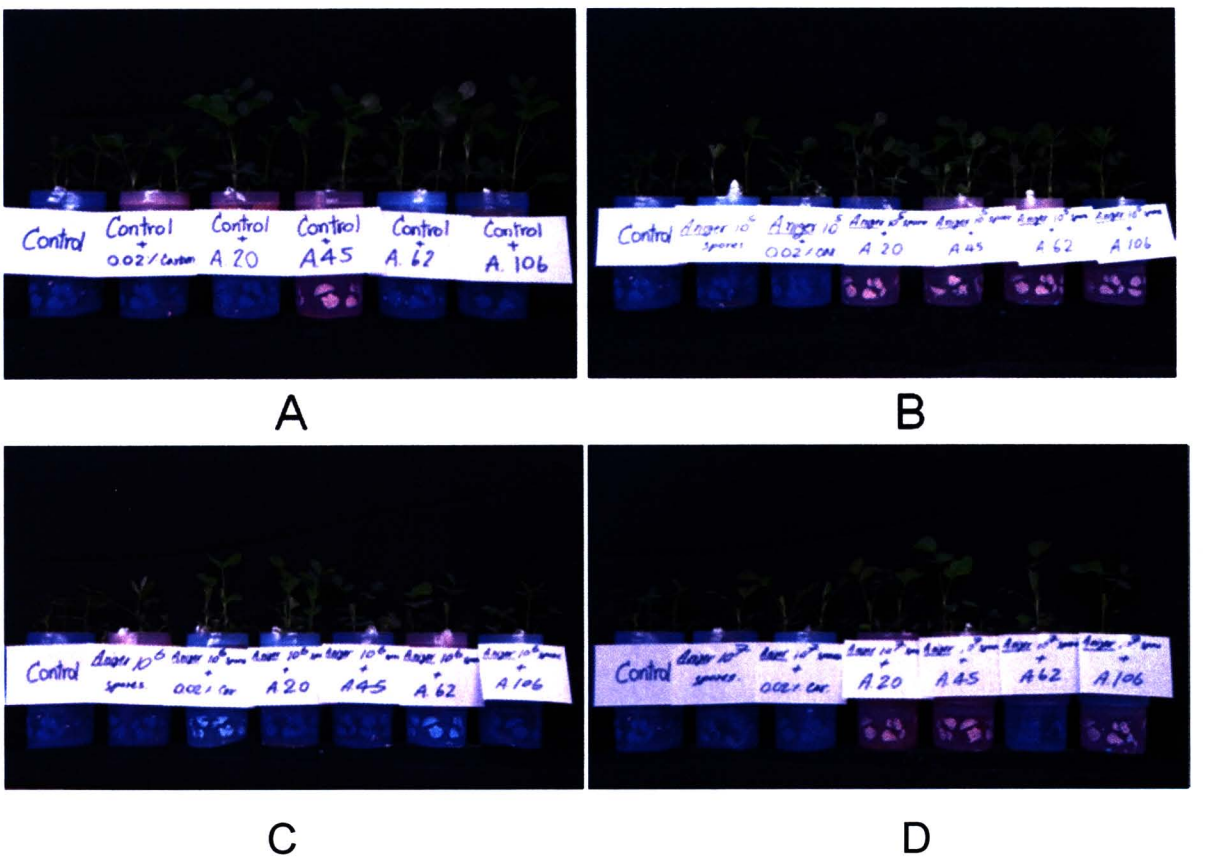
6. การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อในรูปแบบผสมระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และการส่งเสริมการเจริญของพืช

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

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

ตารางที่ 6 การทดสอบการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อราสาเหตุ *Aspergillus niger* ในความเข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรครากเน่าในหนึ่งสัปดาห์

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



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

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

ตารางที่ 7 ผลของการใช้เชื้อ PGPR ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการใช้หัวเชื้อไรโซเบียม TAL173 ต่อการเจริญของถั่วลิสง

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