



รายงานการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้ง  
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

๒๐๐๓๔๗๒๒๖



242901

รหัสโครงการ SUT3-304-51-12-62



รายงานการวิจัย



การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้ง  
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

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

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. พรรณดดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2554

## กิตติกรรมประกาศ

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

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

**Abstract****242901**

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

## สารบัญ

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

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 เชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้จากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด.....	14
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า <i>A. niger</i> และ ความสามารถในการเกาะติดกับรากของถั่วลิสงของเชื้อแบคทีเรีย (PGPB) ที่มี ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่า <i>A. niger</i> .....	18
ตารางที่ 3 ระบุชนิดของเชื้อ PGPR โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA...	21
ตารางที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ในการ ผลิตไบโอฟิล์ม การสร้างสาร IAA และการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการ ทำลายการเจริญของเชื้อราก่อโรค.....	23
ตารางที่ 5 การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่จะก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช.....	25
ตารางที่ 6 การทดสอบการควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อราสาเหตุ <i>Aspergillus niger</i> ในความ เข้มข้นของสปอร์ในปริมาณต่าง ๆ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของโรค รากเน่าในหนึ่งสัปดาห์.....	27
ตารางที่ 7 ผลของการใช้เชื้อ PGPR ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการใช้หัวเชื้อไร โซเบียม TAL173 ต่อการเจริญของถั่วลิสง.....	29