



## ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การระบาดของแหล่งพันธุ์ต้านทาน และชีววิธีการควบคุม *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม

Distribution, Source of Resistance and Biological Control of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* Caused Stalk Rot of Hybrid Corn

นามผู้วิจัย นางสาวพรภิมล จันทร์อ่อน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

( รองศาสตราจารย์สุฤติ ประเทืองวงศ์, Ph.D. )

กรรมการ

( อาจารย์ประชุม จุฑาวรรณนะ, วท.ม. )

กรรมการ

( ศาสตราจารย์อภิพรณ พุกภักดี, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, วท.ม. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การระบาด แหล่งพันธุ์ต้านทาน และชีววิถีการควบคุม *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรค  
ลำต้นเน่าของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม

Distribution, Source of Resistance and Biological Control of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*  
Caused Stalk Rot of Hybrid Corn

โดย

นางสาวพรกมล จันทร์อ่อน

เสนอ

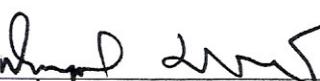
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2551

พรภิมล จันทร์อ่อน 2551: การระบาดของแหล่งพันธุ์ด้านทาน และชีววิถีการควบคุม *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D. 120 หน้า

ทำการสำรวจการระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพดที่เกิดจาก *E. chrysanthemi* pv. *zeae* (Ech) ระหว่างปี 2548-2549 พบโรคนี้มากที่สุดเรียงตามลำดับ 40, 25, 20, 20, 15 และ 10% ที่กาญจนบุรี ราชบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี เชื้อ Ech สาเหตุโรคจำนวน 3 จาก 85 สายพันธุ์ มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 สูงและจัดเป็นเชื้อสายพันธุ์แท้หลังยืนยันด้วยการจำแนกยีน 16s rDNA เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์รุนแรงคือ Ech11 ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) ไปศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อ 3 วิธี บนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ภายใต้สภาพที่แตกต่างกัน ได้แก่ ความชื้น การใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และระยะเวลาเจริญเติบโตของพืช พบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุด และโรคมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วโดยเกิดจุดช้ำน้ำน้ำ เซลล์ยุบตัว และแผลเน่าเยิ้ม ภายใน 2-3 วัน หลังปลูกเชื้อ ( $P < 0.05$ ) คือวิธีการใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคโลนิเชื้อสาเหตุและแทงเข้าลำต้นข้าวโพดอายุ 14 วัน ซึ่งเจริญอยู่ในกระถางที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน (46-0-0) 1 กรัม/ดิน 3 กิโลกรัม ที่วางแช่ในถาดที่มีน้ำขัง และคลุมพลาสติกไว้ให้มีความชื้นสูงนาน 48 ชั่วโมงก่อนปลูกเชื้อ และเมื่อนำวิธีปลูกเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงนี้ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมรวม 10 พันธุ์ สามารถจำแนกระดับความต้านทานโรคได้ 3 กลุ่ม คือ (I) ข้าวโพดที่แสดงลักษณะความต้านทานโรคระดับสูง ได้แก่ ไพโอเนีย30A33, ไพโอเนีย30Y87, KSC503, และบ้านสวน ซึ่งเกิดอาการลำต้นบริเวณยอดและลำต้นที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อ (II) ต้านทานโรคระดับปานกลาง ได้แก่ ชูการ์74, ชูการ์75, ไฮบริกซ์3, และไฮบริกซ์10 และ (III) ข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ ไพโอเนีย3012 และ อินทรี 2 ซึ่งเกิดอาการเน่าที่ข้อและใบยุบเน่าและ ภายใน 2-3 วันหลังปลูกเชื้อ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบและรากข้าวโพดต้นสมบูรณ์มาประเมินความเป็นปฏิปักษ์เพื่อควบคุมเชื้อ Ech11 พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ที่สุ่มมาทดสอบจำนวน 5 จาก 512 สายพันธุ์ คือ KCR21, PCL17, KCR20, LCR9, และ KCL10 สามารถควบคุมเชื้อโรคได้ดี ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองด้วยกลไกที่เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญแข่งขันจากการวิเคราะห์บนอาหารแข็ง การทดลองภายใต้สภาพไร่ที่มีการวางแผนแบบ RCBD ยังคงให้ผลดีในการลดการเกิดโรคลำต้นเน่า โดยเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 ให้ผลดีที่สุดในการลดการเกิดโรคสูง 75% ในขณะที่การใช้สารเคมี copper hydroxide ลดการเกิดโรคได้เพียง 54% ส่วนเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่เหลือก็ให้ผลดีในการลดการเกิดโรคเช่นเดียวกัน คือ PCL17, KCR20, LCR9, และ KCL10 ลดการเกิดโรคได้ 71, 67, 56, และ 46% ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ที่ให้ผลดีที่สุด 2 สายพันธุ์ไปจำแนกชนิดโดยวิธีมาตรฐานทางชีวเคมีของ 9<sup>th</sup> ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเชื้อสายพันธุ์ PCL17 และ KCR21 มีแนวโน้มเป็น *Bacillus subtilis* และ *B. megaterium* ตามลำดับ

พรภิมล จันทร์อ่อน  
ลายมือชื่อนิติ

  
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

29 / พ.ค. / 2551

Pornpimon Chan-on 2008: Distribution, Source of Resistance and Biological Control of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* Caused Stalk Rot of Hybrid Corn. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 120 pages.

Surveys were conducted during 2005-2006 to identify the distribution of bacterial stalk rot of corn caused by *Erwinia chrysanthemi* (Ech). All samples collected were tested positive for bacterial infection which Kanchanaburi was the most prevalence, followed by Ratchaburi, Nakhonratchasima, Phetchabun, Saraburi, and Lopburi with 40, 25, 20, 20, 15 and 10% disease incidence respectively. Three out of 85 Ech strains were most virulent on sweet corn cv. Insee2 and confirmed their typical species with 16S rDNA identification. The three methods of inoculation technique were studies using pathogenic strain Ech11 ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) and cv. Insee2 interaction with varying humidity, nitrogen fertilizer, and plant growth stage. Inoculation method of 14-day old stalk plants with 48-h bacterial colony dipping tooth pick, predisposing by nitrogen fertilizer to soil (46-0-0) at 1g/3 kg plot soil/ plant and the flooded seedling chamber covered with transparent plastic bag for 48 h before pathogen inoculation, resulted in significantly higher level of disease severity ( $P \leq 0.05$ ), expressing rapid and faster rate of disease development of visible symptoms initiated water-soaked, cell collapse and slimy rot lesions within 2 to 3-day incubation. This improved method was used to evaluate the 10 hybrid corn cultivars that could be identified their resistant level into 3 groups including (I) high resistance cultivars, Pionior30A33, Pionior30Y87, KSC503, and Ban-Souan which was lowest severity of water-soaked lesions at stalk and shoot in 6 days after inoculation (DAI), (II) moderate resistance cultivars, Sugar74, Sugar75, Hybrid3, and Hybrid10 with moderate severity of water-soaked spot and stem rot in 3 DAI, and (III) susceptible cultivars, Pionior3012 and Insee2 with highest severity of soft rot at the nodes, leaf collapse and rotten within 1-2 days after inoculation. A number of bacterial epiphytes and rhizospheres obtained from healthy corn leaves and roots was evaluated for their antagonistic activity against Ech11 pathogen. Five-out of 512 randomly selected strains were found to be antagonism *in vitro* as well as in greenhouse including strains KCR20, KCL10, PCL17, LCR9, and KCR21 with their antibiosis and competition upon solid agar assay. Significant difference in the reduction of stalk rot under field conditions of RCBD experiment was found which KCR21 exhibited the most effective control by 75% disease reduction, whereas copper hydroxide decreased disease incidence by 54%, followed by strains PCL17, KCR20, LCR9, and KCL10 by 71, 67, 56, and 46% respectively. The most- two promising antagonist strains, PCL17 and KCR21 were identified as *Bacillus subtilis* and *B. megaterium* respectively using biochemical standard method of 9<sup>th</sup> ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Pornpimon Chan-on  
Student's signature

  
Thesis Advisor's signature

29 / 05 / 2008

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สุกฤดี ประเทืองวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ประชุม จุฑาวรรธนะ กรรมการสาขาวิชาเอก ศาสตราจารย์ดร. อภิพรรณ พุกภักดี กรรมการสาขาวิชารอง และผศ. ดร. ปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันดร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่เมตตาและกรุณาให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทาง ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด และพีจีรันท์ แหยมสูงเนิน ที่อำนวยความสะดวกช่วยเหลือให้งานวิจัยในระดับแปลงทดลองสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบคุณ ดร. สุพจน์ กาเซ็ม ที่ให้กำลังใจทั้งด้านการเรียนและงานวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่บุคลากรภาควิชาโรคพืช ที่ ๑ น้อย ๆ ชาวโรคพืชทุกคนที่มอบความเป็นมิตรและกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ ๆ และน้อง ที่ให้ความรักและการสนับสนุนช่วยเหลือทั้งกำลังใจ กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใดขอขอบแต่คุณพ่อคุณแม่ผู้ให้ชีวิตและอยู่เบื้องหลังความสำเร็จ ตลอดจนครู อาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ อบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

พรกมล จันทร์อ่อน

เมษายน 2551

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	38
สรุป	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบระยะเวลาเจริญของข้าวโพดหวาน การให้ความชื้นสูง และการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในสภาพเรือนทดลอง	26
2	ผลการสำรวจและระดับการระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย จากการสุ่มตัวอย่างข้าวโพดหวานต่างสายพันธุ์ในพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด	40
3	จำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่า ที่เก็บรวบรวมและแยกจากตัวอย่างข้าวโพดหวานในพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด	41
4	ปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zaea</i> สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ หลังฉีดเชื้อและความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวโพดหวานทดสอบ	48
5	ผลผลิต PCR ของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zaea</i> สายพันธุ์เปรียบเทียบและสายพันธุ์ไทยเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ <i>pel gene</i> ของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> และตรวจบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ช่องที่ M : DNA marker ช่องที่ 1:Ech3937 ช่อง 2: Ech11 ช่อง 3: Ech14 ช่อง 4: Ech18 ช่อง 5: Ech 24 ช่อง 6: Ech44 ช่อง 7: Ech45 ช่อง 8: Ech55 ช่อง 9: Ech60 ช่อง 10:Ech67 และ ช่อง11:Ech71 ตามลำดับ	51
6	ระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิคการปลูกเชื้อแบบต่าง ๆ ภายใต้สภาพเรือนทดลอง	53
7	อัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 หลังจากปลูกเชื้อที่อายุ 7 วันภายใต้สภาพเรือนทดลอง	57
8	การประเมินเพื่อคัดเลือกข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม ด้านทานต่อเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zaea</i> ในสภาพเรือนทดลอง	58
9	สายพันธุ์และแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ	61

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างใบ ดิน บริเวณรากและรากข้าว โปดหวานที่เก็บจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ บนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง	63
11	เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าว โปดหวาน ที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i> สายพันธุ์ Ech11 ด้วยวิธี dual culture และ cross-streak plate	71
12	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าว โปดหวานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i> สายพันธุ์ Ech11 สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ด้วยวิธี dual culture และ paper disc diffusion	73
13	ผลของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าว โปดที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ที่มีต่อการงอกของเมล็ดข้าว โปดหวานจากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ	77
14	ประสิทธิภาพของ PGPR ที่ส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โปดหวาน ภายใต้ห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการคลุกเมล็ด	84
15	ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพเรือนทดลอง	87
16	ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการลดการเกิดและความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพไร่	90
17	ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการส่งเสริมและเพิ่มปริมาณผลผลิตข้าว โปดหวานในสภาพไร่	91
18	คุณสมบัติทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แกรมบวก	94

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zea</i> ในสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหาร NGA โดยวิธี dual culture (ก) cross-streak plate (ข) และ paper disc diffusion (ค)	31
2	ลักษณะอาการบริเวณลำต้นน้ำ (ก) แสดงอาการเน่าเกือบทั้งต้น (ข) และน้ำน้ำอย่างรุนแรงจนต้นหักพับ (ค) เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในเน่าและเป็นสีน้ำตาลและกลิ่นเหม็น (ง)	42
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zea</i> สาเหตุโรคลำต้นเน่าที่เจริญบนอาหาร NGA ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา หนูน วาว ขอบเรียบ (ก) และลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่ดาวตรงกลางโคโลนีหนูนกลม สีเหลืองเข้มล้อมรอบด้วยสีขาว (ข) และการทดสอบแกรมด้วยวิธี Gram stain พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นแกรมลบติดสีแดงของ safranin-o (ค)	43
4	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบ ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> ) หลังการฉีด suspension ของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zea</i> สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย	46
5	ลักษณะ clear zone บนอาหารทดสอบที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zea</i> สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียโดยผลิต cellulase (ก) และ pectinase (ข)	46
6	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zea</i> สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ Ech3937	50
7	ลักษณะอาการโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ที่ระดับความรุนแรงของโรค หลังจากปลูกเชื้อด้วยวิธีที่ 3 ภายใต้สภาพเรือนทดลอง (ก) ไม่แสดงอาการโรค (ข) แสดงอาการน้ำเน่าบริเวณต้นและยอด (ค) แสดงอาการน้ำเน่าและเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ (ง) แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบน้ำอย่างรุนแรงและต้นหักล้ม	54

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณรากและรากข้าวโพดหวาน	66
9	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คุณภาพในการเจริญแข่งขันและการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zaea</i> สายพันธุ์ Ech11 ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion (ก = สายพันธุ์ PCL17 ข = สายพันธุ์ KCL10 ค = สายพันธุ์ KCR21 ง = สายพันธุ์ KCR20 จ = สายพันธุ์ LCR9 และ ฉ = Control)	75
10	ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวโพดหวาน ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้สายพันธุ์ KCR20 PCL17 KCR21 เทียบกับน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (control)	85
11	ระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียบนต้นข้าวโพดหวานที่ผ่านการคลุกเมล็ดก่อนปลูกร่วมกับการพ่น 3 ครั้ง ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 (ก) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แสดงอาการโรครุนแรง (ค) และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดหวาน (ขนาดและความสมบูรณ์ฝัก) จากต้นข้าวโพดหวาน ที่มีการใช้แบคทีเรีย KCR21 (ข) และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (ง)	92
12	ลักษณะรูปร่างของเซลล์ในการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PCL17 (ก) และแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21(ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	95

การระบาดของแหล่งพันธุ์ต้านทานและชีววิธีการควบคุม *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*  
สาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม

Distribution, Source of Resistance and Biological Control of *Erwinia chrysanthemi*  
pv. *zeae* Caused Stalk Rot of Hybrid Corn

คำนำ

ข้าวโพดหวาน (sweet corn) จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ใช้ในการบริโภคทั้งในลักษณะฝักสด และใช้เป็นวัตถุดิบแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ส่วนลำต้นของข้าวโพดหวานสามารถนำมาใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ ได้แก่ ต้นสด ต้นแห้งหรือใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการทำข้าวโพดหมัก (ราเชนทร์, 2539) ข้าวโพดหวานสามารถปลูกได้ในหลายพื้นที่ เนื่องจากสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ แต่จะให้ผลผลิตดีที่สุดในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนและ/หรือระบบชลประทานที่มีน้ำเพียงพอ สำหรับประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดหวานกระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ของประเทศ แต่ปริมาณผลผลิตข้าวโพดภายในประเทศไม่เพียงพอต่อความต้องการ การเพิ่มผลผลิต ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของนักวิชาการเกษตร โดยการพัฒนาข้าวโพดพันธุ์ใหม่จากเดิมพันธุ์ที่ส่งเสริมให้ใช้พันธุ์ลูกผสมเปิดเป็นพันธุ์ปลูก ต่อมามีการพัฒนาพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตทั้งด้านปริมาณและคุณภาพดีกว่า ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมที่มีการนำสายพันธุ์พ่อแม่จากต่างประเทศมาปรับปรุงหรือผสมกับพันธุ์ท้องถิ่น ซึ่งสายพันธุ์ลูกผสมเหล่านี้มักอ่อนแอต่อโรคและแมลงศัตรูพืช จึงส่งผลให้สถานการณ์โรคระบาดของข้าวโพดมีการเปลี่ยนแปลง โรคที่ไม่สำคัญในอดีตกลับทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่นโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ที่เกิดจาก *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สุคฤดี และคณะ(2547), Jeamvijit *et al.* (2005) พบการระบาดของโรคในแปลงปลูกข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีรายงานในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ลพบุรี เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี โดยการระบาดของโรครดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะระบาดเพิ่มและขยายวงกว้างมากขึ้น ทั้งนี้การแพร่ระบาดของโรคพืชชนิดต่าง ๆ เป็นกลไกที่ยุงยากซับซ้อน และมีปัจจัยที่ผันแปรเข้ามาเกี่ยวข้องคือ ชนิดและพันธุ์พืชที่อ่อนแอ สายพันธุ์เชื้อโรคที่รุนแรง และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (สุคฤดี, 2548) เมื่อสภาพแวดล้อมดังกล่าวเปลี่ยนแปลงบทบาทของสาเหตุโรคแต่ละชนิดก็จะเปลี่ยนแปลงไป เช่น การชักนำให้เชื้อสาเหตุโรบบางชนิดกลายพันธุ์และอาจเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่รุนแรงเข้าทำลายพืชทำให้สถานการณ์การระบาดของโรคในข้าวโพด การใช้พันธุ์ต้านทาน โรคแบบเดิมมักไม่ได้ผลเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคมิ

วิวัฒนาการในการปรับตัวและเข้าทำลายพืช นอกจากนี้ในปัจจุบันการใช้สารเคมีอย่างผิดวิธี ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และตกค้างในผลผลิตเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ตลอดจนปัญหา เชื้อโรคเกิดการดื้อต่อสารเคมี (Moorman and Lease, 1992) ก่อให้เกิดเชื้อสายพันธุ์กลายและ/หรือ ผ่าเหล่าที่มีความรุนแรงกว่าเดิม การใช้สารเคมีในปริมาณมากเกินไปยังส่งผลกระทบต่อ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะแมลงและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ทำให้เกิดการระบาดของโรค มากขึ้น (Rodriguez and Curl, 1980) การควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control) จึงเป็น แนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ โดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าร่วมในระบบการ ผลิตและชักนำให้ข้าวโพดเกิดความต้านทานโรค (สุคฤดี, 2548; Prathuangwong, 2004) ทั้ง คุณสมบัติในการแก่งแย่งอาหารได้ดี มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วครอบคลุมผิวใบได้ก่อนเชื้อโรค การผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง ตลอดจนการเป็นปรสิตต่อเชื้อโรคโดยตรง ซึ่งเป้าหมายดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพดโดยชีววิธีเพื่อทดแทนการใช้ สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมการเกษตร

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการแพร่ระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย และ การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อก่อโรคบนพื้นฐานความสามารถในการเข้าทำลายพืช อาศัย เพื่อพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน และแนวทางการควบคุมโรคที่เหมาะสมด้วยวิธีการ ทางชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อปัจจัยต่าง ๆ ได้อย่างยั่งยืน

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแพร่ระบาดและประเมินความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* pv. *zoeae* ในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม
2. เพื่อคัดเลือกและประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* pv. *zoeae* ของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมในสภาพห้องปฏิบัติการ เรือนปลูกพืชทดลองและสภาพไร่

## การตรวจเอกสาร

### 1. ความสำคัญของข้าวโพดหวาน

ข้าวโพดหวานเป็นพืชเศรษฐกิจที่น่าจับตามองของประเทศ เนื่องจากในช่วง 5 ปี ที่ผ่านมา การส่งออกผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2548-2549 มีการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น ซึ่งภาพรวมการผลิตคาดว่าจะมีผลผลิตทั้งหมด 4.187 ล้านตันจากพื้นที่ปลูก 6.942 ล้านไร่ (พัชรา, 2548) ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม โดยปัจจุบันมีปริมาณการใช้พันธุ์ลูกผสมร้อยละ 90.48 (เกรียงศักดิ์, 2544) ซึ่งพื้นที่ปลูกอยู่ในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง นอกจากนี้การส่งออกข้าวโพดหวานดิบหรือทำให้สุกในรูปแบบแช่แข็งมีการขยายตัว ซึ่งเป็นผลมาจากข้าวโพดหวานของไทยสามารถแข่งขันได้ดีทั้งในด้านราคาและคุณภาพ โดยสถานการณ์การผลิตข้าวโพดหวานของไทยในปัจจุบันมีการส่งออกเป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากฮังการี และสหรัฐอเมริกา ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวโพดหวานมีแนวโน้มขยายตัวมากขึ้น เพื่อรองรับกับความต้องการของตลาดข้าวโพดหวาน แต่ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบที่สำคัญ 2 ประการ เมื่อเทียบกับผู้ผลิตและส่งออกรายใหญ่ คือ ฮังการี และสหรัฐอเมริกา คือ ประเทศผู้ผลิตเหล่านั้นมีฤดูกาลผลิตสั้นประมาณ 60 วันในช่วง 1 ปี เนื่องจากข้าวโพดหวานเป็นพืชที่ต้องการแสงมาก ในประเทศเมืองหนาวจึงปลูกได้เฉพาะในช่วงฤดูร้อนเท่านั้น ส่วนข้อได้เปรียบที่สำคัญอีกประการ คือ ค่าใช้จ่ายทางด้านขนส่งทางเรือต่ำกว่ามาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตลาดในเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลีใต้หวัน ที่มีความต้องการนำเข้าสินค้าข้าวโพดหวานเป็นปริมาณมาก

### 2. การสำรวจโรคข้าวโพดหวานที่สำคัญ

การสำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเกิดโรค นับเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถลดความเสี่ยงและความเสียหายต่อผลผลิตในระบบการปลูกพืช เพื่อจัดเป็นฐานข้อมูลในการประเมินและพยากรณ์โรคตามพื้นที่นั้น ๆ เนื่องจากสภาพภูมิอากาศและสภาพพื้นที่ปลูกมีปัจจัยหลายอย่างที่เกื้อหนุนให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค หากมีการสำรวจและติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่อง ก็สามารถแก้ปัญหาและลดความเสียหายได้ ที่ผ่านมามีการรายงานการสำรวจรวบรวมข้อมูลการระบาดของโรคข้าวโพดในแหล่งปลูกที่สำคัญ ประชุมและคณะ (2544) ได้สำรวจโรคของข้าวโพดในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาค

กลางใน 11 จังหวัดในปี 2541-2543 พบการระบาดของโรคที่เกิดกับส่วนใบ ฝัก และลำต้น ข้าวโพดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ปี 2547 จำนวน 4 จังหวัด ที่อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม อำเภอวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท และอำเภอพบพระ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และสำรวจโรคของข้าวโพดหวานจากแหล่งปลูกในภาคกลาง และภาคตะวันตก ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี พ.ศ. 2548 จำนวน 4 จังหวัด ที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย อำเภอพบพระ จังหวัดตาก และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (พีระวรรณ และคณะ, 2550) พบโรคที่สำคัญได้แก่ โรคราน้ำค้าง (*Peronosclerospora sorghi*) โรคราสนิม (*Puccinia polysora*) โรคใบไหม้แผลเล็ก (*Bipolaris maydis*) และโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zoeae*) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียแปลงปลูกในข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวในพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ลพบุรี เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี (สุดฤดี และคณะ, 2547) เช่นกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการประเมินการแพร่ระบาดในแต่ละพื้นที่

### 3. โรคที่สำคัญของข้าวโพดหวาน

โรคเป็นปัจจัยสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อปริมาณผลผลิต เนื่องจากความต้องการข้าวโพดหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทำให้มีการขยายพื้นที่ปลูก เดิมเกษตรกรใช้พันธุ์ข้าวโพดผสมเปิดต่อมามีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมที่มักอ่อนแอต่อโรคและแมลงในท้องถิ่น ส่งผลให้สถานการณ์การระบาดของโรคเปลี่ยนแปลงไป รวมถึงความผันแปรของสภาพแวดล้อมที่เกื้อหนุนให้เกิดโรครุนแรงขึ้น โดยโรคที่เกิดกับข้าวโพดหวานสามารถเกิดได้ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส พบทั้งที่ส่วนใบ ฝัก และลำต้น ชนิดและความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปตามพื้นที่ปลูกได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง (ประชุม และคณะ, 2544) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งแต่เดิมไม่มีความสำคัญหรือไม่เคยพบการระบาดในประเทศไทยมาก่อน ได้แก่ โรคใบขีดข้าวโพดและโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ซึ่งเชื่อกันว่าสร้างความเสียหายกับข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (สุดฤดี และคณะ, 2547) ซึ่งโรคที่สำคัญของข้าวโพด ได้แก่

#### 3.1 โรคใบด่างไวรัส

เชื้อสาเหตุ Maize Dwarf Mosaic Virus

ลักษณะอาการของโรค ใบเหลืองซีดทั่วทั้งใบหรือเป็นขีดสั้น ๆ ยอดอ่อนมีสีเหลืองซีด ต้นแคระแกรน ถ้าอาการรุนแรงจะทำให้ต้นแห้งตาย ถ้าเชื้อเข้าทำลายต้นข้าวโพดที่โตแล้ว ฝักจะไม่สมบูรณ์ ซึ่งลักษณะอาการคล้ายโรคราน้ำค้าง แต่ใบข้าวโพดที่เป็นราน้ำค้างจะพบผงสีขาวของสปอร์ได้ใบในเวลาเช้า

### 3.2 โรคราน้ำค้าง

เชื้อสาเหตุ *Peronosclerospora sorghi*

ลักษณะอาการของโรค ใบข้าวโพดจะเป็นทางยาวสีเหลือง สีเขียวอ่อน และสีเขียวแก่สลับกัน บริเวณใต้ใบเป็นทางยาวสีเหลือง หรือเขียวอ่อนจะมีผงคล้ายแป้งเกาะติดอยู่ ซึ่งมักพบในตอนเช้าที่มีอากาศเย็นและมีน้ำค้างมาก ถ้าเป็นกับต้นเล็ก ต้นจะแคระแกรน ถ้าเป็นกับต้นข้าวโพดต้นโตต้นข้าวโพดอาจจะติดฝักแต่ฝักจะยาวคล้ายวงช้าง ไม่มีเมล็ด บางครั้งอาจจะพบว่ายอดข้าวโพด จะมีปล้องสั้น ๆ และมีใบแตกเป็นฝอยขนาดเล็ก ทำให้เห็นเป็นพุ่ม ดอกตัวผู้จะแตกเป็นแขนงเล็กเป็นช่อ

### 3.3 โรคใบไหม้แผลใหญ่

เชื้อสาเหตุ *Exserohilium turcicum*

ลักษณะอาการโรค แผลขนาดเล็กสีคล้ายฟางข้าว ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ยาวตามใบ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะพบอาการแผลบนใบข้าวโพดหลายแผลต่อกันขยายทำให้ใบแห้งตาย หากพบที่กาบฝักจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์

### 3.4 โรคราสนิม

เชื้อสาเหตุ *Puccinia polysora*

ลักษณะอาการของโรค เกิดขึ้นได้ทุกระยะการเจริญของต้นข้าวโพด เป็นจุดเล็ก ๆ สีน้ำตาลแดง ต่อมาแผลจะแตกออกเป็นสีสนิมเหล็ก หากรุนแรงจะทำให้ใบแห้งตาย

### 3.5 โรคใบไหม้แผลเล็ก

### เชื้อสาเหตุ *Bipolaris maydis*

ลักษณะอาการของโรค ใบจะเป็นจุดเล็ก ๆ สีเขียวอ่อนจ้ำน้ำต่อมาจะขยายออกตามความยาวใบตรงกลางแผลสีเทาขอบแผลสีน้ำตาลแดง หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบไหม้แห้ง

### 3.6 โรคใบขีด

#### เชื้อสาเหตุ *Acidovorax avenae*

ลักษณะอาการของโรค พบอาการใบเป็นแผลขีดขนาดไปกับเส้นใบ รูปร่างไม่แน่นอน สีขีดถึงเหลืองและแห้งกลายเป็นสีน้ำตาล

### 3.7 โรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

#### เชื้อสาเหตุ *Erwinia chrysanthemi* pv. *zoeae*

ลักษณะอาการของโรค พบอาการใบไหม้จากปลายใบมาที่โคนใบ ยอดข้าวโพดมีสีขีดเขียว เเฉ ต่อมาลุกลามเป็นยอดเน่า บริเวณข้อเหนือดินเป็นรอยน้ำสีน้ำตาล เมื่อผ่าดูพบท่อลำเลียงเป็นสีน้ำตาลเนื้อเยื่อภายในถูกย่อยสลาย มีเมือกไหลเยิ้มกลื่นเหนียวในที่สุดต้นหักล้มพับหากช่วงติดฝักจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์และลีบ

## 4. โรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

โรคลำต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพด (bacterial stalk rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zoeae* จัดเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่มีแนวโน้มที่จะเป็นโรคระบาดและสร้างความเสียหายต่อการปลูกข้าวโพดของประเทศ โดยเฉพาะกลุ่มข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมและข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งพบการระบาดปี 2547 พบการระบาดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางระหว่างเดือนเมษายน- กรกฎาคม ในจังหวัด นครราชสีมา ลพบุรี เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี (สุดฤดี และคณะ, 2547) ในปี 2547-2548 พบโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียข้าวโพด ในพื้นที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน (พีระวรรณ และคณะ, 2550) ซึ่งพีระวรรณ และคณะ (2541) และ ประชุม และคณะ (2544) พบการระบาดของโรคลำต้น

เนาของข้าวโพดหวานในพื้นที่ปลูกในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางจำนวน 11 จังหวัด ในปี 2541-2543 ปัญหาโรคดังกล่าวทำให้ผลผลิตของข้าวโพดหวานลดลง ซึ่งเป็นผลจากจำนวนต้นข้าวโพดในแปลงถูกทำลาย

#### 4.1 ลักษณะอาการของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

อาการเริ่มแรกของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจะแสดงอาการใบไหม้จากปลายใบเข้ามาที่โคนใบส่วนยอดของลำต้นมีลักษณะสีซีดเขียวเจาต่อมาใบจะไหม้ลุกลามเป็นยอดเน่า อาการรุนแรงมากเมื่อข้าวโพดหวานอยู่ในช่วงระยะออกดอกจนถึงติดฝัก ลำต้นจะน้ำน้ำ มักพบตรงบริเวณข้อที่อยู่เหนือดิน ลักษณะเป็นรอยน้ำสีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลเข้ม ท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลายเมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในจะถูกย่อยสลาย มีเมือกไหลซึม มีกลิ่นเหม็น ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกเชื้อสาเหตุโรค หากเกิดรุนแรงลำต้นจะอ่อนนุ่มหักพับ (ไพโรจน์, 2525) นอกจากนี้ยังพบอาการบริเวณยอดแห้งตายเรียกอาการนี้ว่า top rot ฝักจะเล็ก ฝักเน่า บางครั้งยืนต้นตาย และยังพบอาการโรคบริเวณเปลือกหุ้มฝัก ก้านฝัก (Hingorani *et al.*, 1959) ถ้าแสดงอาการหลังติดฝัก ฝักที่ได้เมล็ดจะไม่สมบูรณ์ผลผลิตเสียหายมาก (ชุติมันต์, 2545) หากในระบบปลูกมีการให้น้ำแบบพ่นฝอยจะทำให้เกิดการระบาดของโรคทำให้เกิดอาการยอดเน่า ใบบนจะมีอาการเหี่ยวและเกิดการเน่าและ อาการจะลุกลามจากยอดลงมา จนกระทั่งเกิดต้นหักล้ม ซึ่งอาการเน่าและดังกล่าวเกิดจากเชื้อแบคทีเรียผลิต cell wall degrading enzyme ได้แก่ เอ็นไซม์ pectate lyase polygalacturonase cellulose และ protease ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค (Barras *et al.*, 1994)

#### 4.2 ลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zear* ชื่อเดิม *E. carotovora* var. *zear* Sabet. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (rod shap) มีขนาดระหว่าง 0.6-0.9 × 0.8-1.7 ไมครอน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟกเจลลาหลายรอบตัว (peritrichous flagella) ไม่สร้างแคปซูล ไม่ติดสีย้อมที่เป็นกรด การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) สร้างโคโลนีสีขาวอมเทา นูน วาว เรียบ ขอบ สม่ำเสมอ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร potato glucose agar (PDA) ที่ pH 6.5 นาน 3-6 วัน โคโลนีจะมีลักษณะคล้ายไข่ดาว โดยตรงกลางโคโลนีมีลักษณะกลม นูน สีเหลืองเข้มล้อมรอบด้วยโคโลนีสีขาว (Christensen and Wilcoxson, 1966) และบนอาหาร yeast extract dextrose calcium carbonate (YDC) จะมีเมื่อดีสีน้ำ

เงินเข้ม ไม่ละลายน้ำในโคโลนี เมื่อเลี้ยงที่สภาพอุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน (Bradbury, 1977)

#### 4.3 การเข้าทำลายและการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

เชื้อสาเหตุโรครดดังกล่าวจะเข้าทำลายและทำความเสียหายกับต้นข้าวโพด โดยจะเริ่มพบเมื่อข้าวโพดอายุ 3 สัปดาห์ หากโรคเข้าทำลายในระยะก่อนออกดอกจนถึงระยะออกดอก (Pre-silking until flowering stage) ต้นจะตายอย่างรวดเร็ว และจะระบาดอย่างรุนแรงในสภาพอากาศร้อน และมีความชื้นสูงติดต่อกัน (Lal and Singh, 1984) หรือในสภาพที่ข้าวโพดมีความอ่อนแอ ซึ่งรวมถึงการได้รับความชื้นสูงหรือได้รับธาตุอาหารไม่สมดุล รวมทั้งเกิดจากการเข้าทำลายจากแมลง ไร้เดือนฝอย หรือความเสียหายจากบาดแผลช่วงที่อากาศมีความแปรปรวน หรืออากาศชื้น ก่อนจะได้รับผลกระทบและก่อนออกใหม่จะเป็นช่วงที่ข้าวโพดอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคมาก อย่างไรก็ตามถ้าปรับโปแตสเซียมและฟอสฟอรัสให้สมดุลกันก็จะลดการเกิดโรครดนี้ได้ แต่ถ้าไนโตรเจนสูงและไม่สามารถเปลี่ยนรูปและนำไปใช้ประโยชน์ได้จะทำให้ความรุนแรงของโรครดสูงขึ้น หากราก ลำต้น และใบ ที่ได้รับความเสียหายจากแมลง ไร้เดือนฝอย หรืออุปกรณ์ทางการเกษตร จะนำไปสู่การเกิดโรครดในข้าวโพดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายหรือแมลงก็จะส่งเสริมให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น เช่น การเข้าทำลายของไร้เดือนฝอย (*Pratylenchus* spp.) เป็นไร้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรครากแผลจะทำให้เกิดโรคลำต้นเน่าได้ (สืบศักดิ์, 2538)

เชื้อนี้สามารถอาศัยและมีชีวิตอยู่ในดินสภาพไร้ที่ระดับความลึกตั้งแต่ผิวดินลึก 10-20 และ 30 เซนติเมตร ได้นาน 6 สัปดาห์ (วนิดา และคณะ, 2531) และมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันซึ่งการอยู่รอดของเชื้อในดิน ขึ้นอยู่กับสภาพดิน ความชื้น อุณหภูมิ และกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน ความเป็นกรด-ด่างของดิน (Voronkevich, 1960) ดังที่ Rangaragan and Chakarvarti (1970) พบว่าในสภาพไร้ที่อุณหภูมิ 34-37 องศาเซลเซียส เชื้อสาเหตุสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 7 เดือน นอกจากนี้ยังแพร่ระบาดได้โดย น้ำฝน และแมลง ทำให้การระบาดของเชื้อพร้อมที่จะเข้าทำลายพืชในฤดูปลูกต่อไปและโรคมักระบาดรุนแรงในบริเวณที่มีการระบายน้ำไม่ดี การปลูกพืชหนาแน่น ทำให้อากาศรอบอ่าวขาดการระบายอากาศและอุณหภูมิสูง โดยเชื้อที่อาศัยอยู่ในเศษซากของข้าวโพดที่ตกอยู่ในดินจะเข้าทำลายข้าวโพดทางช่องเปิดธรรมชาติ (stomata hydathods) หรือเข้าทำลายทางบาดแผลที่เกิดขึ้นบนใบหรือลำต้นจากแมลงหรือรอยฉีกขาด ซึ่งโรครดนี้ไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ด แต่จะรุนแรงในช่วงที่มีฝนตกชุก และในที่ที่อากาศถ่ายเทไม่สะดวก การเข้าทำลายโดยทั่วไปจะพบในแปลงข้าวโพดที่มีการให้น้ำแบบร่องและแบบพ่นฝอย นอกจากนี้ยังพบว่าวัชพืชบางชนิด

สามารถเป็นพืชอาศัยข้ามฤดู (alternate host) ของเชื้อสาเหตุโดย วนิดา และคณะ (2536) ได้ รายงานว่าเหี่ยวโปร่งกาย (Rottboellia exaltata L.F.) เป็นพืชอาศัยของโรคนี สามารถอยู่ข้ามฤดูจนครบรอบการปลูกข้าวโพดฤดูใหม่

สำหรับการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ยังไม่มีวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ต้องอาศัยหลายวิธีการร่วมกัน และควรหลีกเลี่ยงการปลูกข้าวโพดหวาน และข้าวโพดสายพันธุ์แท้ที่เคยมีโรคระบาด และควรปลูกข้าวโพดบริเวณที่มีการระบายน้ำได้ดีน้ำไม่ท่วมขัง หลีกเลี่ยงการปลูกพืชหนาแน่นและการใส่ปุ๋ยในโตรเจนปริมาณสูง เพิ่มอินทรีย์วัตถุสูงกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อปรับให้มีการแข่งขันของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ โรคปลูกพืชหมุนเวียนในแหล่งที่เคยมีการระบาด

## 5. การคัดพันธุ์ข้าวโพดหวานต้านทานโรค

โดยธรรมชาติข้าวโพดหวานจะอ่อนแอต่อโรคและแมลงมากกว่าข้าวโพดไร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงแรก ๆ ของการเจริญเติบโต (ทวิศักดิ์, 2540) ซึ่งมีผลทำให้โรคต่าง ๆ เช่น โรคราน้ำค้าง โรคใบไหม้แผลเล็ก และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย สามารถทำลายได้ง่าย โรคบางชนิดสามารถควบคุมได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ หรือคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ต้านทานโรค แต่โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมีวิธีการควบคุมโดยสารเคมีมักไม่ได้ผล ทั้งนี้การที่จะได้พันธุ์พืชต้านทานโรคใดโรคหนึ่งหรือหลายโรคในต้นเดียวกันอาจใช้หลายวิธีร่วมกัน ในการคัดเลือกต้นพืชที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่อพืชนั้นอยู่ในสภาพที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายตามธรรมชาติ/หรือการปลูกเชื้อ โดยวัตถุประสงค์หลักในการคัดเลือกสายพันธุ์พืชต้านทาน เพื่อให้ได้พ่อแม่ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคและใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม สำหรับการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทาน ซึ่งนักโรคพืชสามารถนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบระดับความต้านทานโรค โดยวิธีการปลูกเชื้อแล้วทำการประเมินการเกิดโรคที่ผันแปร ซึ่งสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยและให้ผลผลิตสูง ส่วนพันธุ์ที่อ่อนแอจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงและให้ผลผลิตต่ำ

ทั้งนี้การศึกษาวิจัยในประเทศไทยสามารถนำผลสำเร็จของการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค ราน้ำค้างจากข้าวโพดไร่มาปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานได้ โดยนำลักษณะความแข็งแรงและความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ของข้าวโพดไร่ มาปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวาน (ชวีช และคณะ, 2531) ตัวอย่าง เช่น การสร้างพันธุ์ TSSC#1DMR ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง แต่

ข้าวโพดหวานพันธุ์นี้มีคุณภาพไม่ดีนัก ส่วนพันธุ์ ATS-1 มีความต้านทานต่อหนอนเจาะฝัก (ทวีศักดิ์, 2540)

Abedon and Tracy (1998) ทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคแบบวงจร (recurrent selection) ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานให้ต้านทานต่อโรคราสนิม โดยใช้ข้าวโพดหวาน 3 ประชากร ภายใต้สภาพที่ปลูกเชื้อโรคราสนิม ในปี 1989, 1990, 1993, 1994 และ 1995 และภายใต้สภาพที่ไม่ได้ปลูกเชื้อโรคราสนิมในปี 1994 และ 1995 พบว่า เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่ถูกเข้าทำลายลดลง มีแนวโน้มลดลง แต่ลักษณะโดยทั่วไปทั้ง 3 ประชากรมีแนวโน้มดีขึ้น วันออกดอกเร็วขึ้น การคัดเลือกในลักษณะรูปทรงต้น น้ำหนักฝัก และวันออกดอกตัวผู้และวันออกไหมสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อให้ข้าวโพดมีความต้านทานต่อโรคราสนิมได้

คทาร์ตัน (2546) ได้คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้ต้านทานโรค โดยใช้พันธุ์ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ลูกผสมและสายพันธุ์อินเบรค 25 สายพันธุ์ พบว่า ความต้านทานโรคของสายพันธุ์อินเบรค S4 ของข้าวโพดหวานมีค่าเฉลี่ยคะแนนความเป็นโรคอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 ความต้านทานโรคของสายพันธุ์อินเบรค S4 และ S3 ของข้าวโพดหวานพิเศษ พบว่า มีค่าเฉลี่ยของคะแนนความเป็นโรคอยู่ในช่วง 2.3 ถึง 4.0 สายพันธุ์อินเบรคข้าวโพดหวาน และข้าวโพดหวานพิเศษ แสดงความต้านทานโรคใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่า สายพันธุ์อินเบรคข้าวโพดหวานจะมีเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานนำเข้าจากต่างประเทศ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปรับตัวได้ไม่ดีนักในสภาพการเพาะปลูกของประเทศไทยและอ่อนแอต่อโรค

พิเชษฐ์ และคณะ (2538) ได้สร้างประชากรข้าวโพดหวานเพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการคัดพันธุ์ข้าวโพดหวาน เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

Treat and Tracy (1993) ใช้เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดไร่เพื่อปรับปรุงความแข็งแรงของลำต้นและระบบรากของข้าวโพดหวาน พบว่า ลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวโพดไร่กับข้าวโพดหวานมีลักษณะลำต้นและระบบรากที่แข็งแรงกว่าลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวโพดหวานกับข้าวโพดหวาน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดไร่ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวาน

## 6. การควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หนึ่งชนิดหรือมากกว่า ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลผลิตจากพันธุกรรม (gene or gene product) แต่ไม่รวมถึงการกระทำโดยตรงจากมนุษย์ (Cook and Baker, 1983; Cook, 1985; Handelsman and Parke, 1989; Nelson, 1989) ที่มีอยู่ทั่วไปบริเวณผิวพืช (epiphytic) ส่วนเหนือดิน (Munk vald and Marois, 1993) และดินบริเวณรอบราก (Larkin *et al.*, 1989) โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับรากจะมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ร่วมด้วย (Kloepper, 1992) ซึ่ง Schroth and Hancock (1982) ให้คำจำกัดความว่า rhizobacteria นั้นเป็นแบคทีเรียบริเวณเขตรากที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่เป็นอันตรายต่อระบบรากพืช Tran *et al.* (1994) รายงานว่า แบคทีเรียที่อาศัยบนผิวยาง (rhizoplane) เป็นพวกที่มีความหลากหลาย (diversity) น้อยกว่าแบคทีเรียในดินบริเวณเขตราก (rhizosphere soil) ซึ่งแบคทีเรียในดินที่สามารถปรับตัวเข้าไปอาศัยอยู่บนผิวยางได้น้อยมากเมื่อเทียบกับประชากรทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความเฉพาะเจาะจง Kloepper (1992) ต่อแหล่งที่อาศัยได้ขยายความหมายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับรากพืช (root colonizing bacteria) ว่ามีทั้งพวกที่อาศัยอยู่บนผิวยางและพวกที่แทรกตัวเข้าไปอาศัยอยู่ในราก (endorhizosphere) ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรค ได้แก่ *Agrobacterium Alcaligenes Enterobacter Streptomyces* และ *Bacillus* สามารถควบคุมโรคได้กับพืชหลายชนิด โดยเชื้อกลุ่ม *Bacillus* เจริญได้รวดเร็วและทนต่อสภาพแวดล้อม เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์และสร้างสารปฏิชีวนะได้ สุพจน์ และสุตฤดี (2550) ได้ทำการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *Paenibacillus pabuli* SW01/4 ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยนำมาใช้ควบคุมโรคที่สำคัญของข้าวโพดหวาน ได้แก่ โรคใบไหม้แผลเล็ก โรคเหี่ยวข้าวโพด และโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย (สุตฤดี และคณะ, 2548) นอกจากนี้ Betagnolli *et al.* (1996) ได้นำเชื้อ *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ Th008 ที่สามารถผลิตสาร extracellular enzyme ออกมาทำลายเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ และพบว่า *Bacillus megaterium* สามารถเข้าครอบครองพื้นที่บริเวณรากได้อย่างรวดเร็วและควบคุมเชื้อโรคต่าง ๆ บริเวณรากได้ด้วย (Sinclair, 1993) เชื้อบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ Pyoluteorin โดยปลดปล่อยสารออกมานอกเซลล์แต่จะไม่คงทนเมื่ออยู่ในดินโดยสารบางชนิดจะหมดคุณสมบัติเมื่อยัดติดกับอนุภาคดินเหนียวจึงอาจจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งโรคพืชเมื่ออยู่ในธรรมชาติลดน้อยลงได้ (นิพนธ์, 2533) โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากบริเวณรากของพืชและเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในหลาย ๆ ด้าน เช่น *Pseudomonas* sp. สามารถก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์บางชนิดก็เป็นเชื้อสาเหตุโรคของพืช แต่ในขณะเดียวกันก็มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. บางสายพันธุ์มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ซึ่งรูปแบบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas* sp. มีหลายกลไก บางชนิดช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อมโดยการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคต่าง ๆ ที่ทำอันตรายกับพืช แต่บางชนิดก็สร้างสารประกอบออกมาส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง เช่น *P. fluorescens* สามารถสร้างสารประกอบออกมาส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง และ radish นอกจากนี้ยังมีพืชเศรษฐกิจอีกมากมายหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด ผักกาดหอม เป็นต้น ที่พบว่ามีเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สามารถสร้างสารประกอบออกมาส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Bolton et al., 1990)

คุณสมบัติการเจริญแก่งแย่งอาหารและแข่งขันด้านที่อยู่อาศัยเป็นลักษณะสำคัญของจุลินทรีย์อีกกลไกหนึ่ง โดยจะมีผลไปลดปริมาณสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อโรคอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารหรือมีความสามารถในการเจริญอย่างรวดเร็ว สำหรับชนิดอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดิน และพืชอาศัย ซึ่งได้แก่ ธาตุเหล็ก คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน และ micronutrient มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas fluorescens* มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญบริเวณรากพืชได้รวดเร็ว ในการแก่งแย่งตำแหน่งของการยึดเกาะ (site of infection) อันเป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคบริเวณรากพืช นอกจากนี้แบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชด้วย (อุรัจฉา, 2534)

ในการศึกษาเกี่ยวกับชนิดแบคทีเรียพืชราก (rhizobacteria) พบว่า ส่วนใหญ่เป็นพวกช้อมติดสีแกรมลบและพวกที่มีมากที่สุดพวก *Pseudomonas fluorescens* มีบ้างที่เป็นพวกกลุ่ม Seratia สำหรับพวกที่ช้อมติดสีแกรมบวกก็มักพบ Bacillus และพวกที่มีลักษณะคล้ายกับ Althobacter (Kloepper, 1992) สำหรับกลไกที่แบคทีเรียเหล่านั้นเข้าไปอาศัยอยู่กับรากพืชนั้นยังไม่แน่ชัด แต่ก็พบว่า *P. fluorescens* ใช้ลักษณะหลายๆ ประการนับตั้งแต่การมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว การเคลื่อนที่โดยใช้ flagella หรือการเคลื่อนที่เข้าหารากโดยวิธี chemotaxis เป็นต้น (Kloepper, 1992)

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ที่แยกได้จาก rhizosphere ของมะเขือเทศในการควบคุมเชื้อ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคน้ำและของมะเขือเทศ จำนวน 14 สายพันธุ์ จาก 71 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งเชื้อการเจริญของ *E. chrysanthemi* ในระดับห้องปฏิบัติการและพบว่า มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 สายพันธุ์ ที่สามารถลดการเกิดโรคได้ 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบในระดับเรือนทดลอง (Yesim and Gulcan, 2003)

## 7. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรค

การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาประยุกต์ใช้สามารถนำเชื้อบริสุทธิ์ใส่ให้กับพืชได้โดยตรง (direct application) หรืออาจใช้ทางอ้อม (indirect application) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในรูปของเหลวเซลล์แขวนลอย (cell suspension หรือเซลล์ผสมน้ำ) ใส่ให้กับพืชโดยตรงเพื่อควบคุมโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืชปฏิบัติดังนี้

### 7.1 การคลุกเมล็ด (Seed treatment)

สามารถทำได้หลายรูปแบบคือ การคลุกด้วยของเหลวเซลล์แขวนลอย หรือสารเหลวที่กรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว (cell-free filtrate) วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุด เหมาะสำหรับการใช้ควบคุมโรคในระบบราก และลำต้นส่วนใต้ดิน รวมทั้งยังควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และส่งเสริมหรือกระตุ้นเพิ่มพูนความแข็งแรงของต้นกล้าได้ดี

### 7.2 การใส่หรือเติมลงในดิน (Soil treatment)

เป็นวิธีการที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีโอกาสสัมผัสกับประชากรของเชื้อโรคพืชในดินอย่างทั่วถึง และเชื้อปฏิปักษ์มีปริมาณมากพอที่จะเจริญแข่งขันหรือผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ประชากรเชื้อโรคลดลงอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้ปริมาณเชื้อปฏิปักษ์เป็นจำนวนมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน การใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงดินสามารถปฏิบัติได้หลายรูปแบบ คือ การใช้เฉพาะเชื้อบริสุทธิ์ (ของเหลวเซลล์แขวนลอย) ราดดิน การใส่ร่วมกับวัสดุหรือสารพาที่ได้จากธรรมชาติ (Natural substrates) และการใส่ร่วมกับวัสดุสารพาที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic substrates)

### 7.3 การพ่นบนพืช (Aerial spray)

เป็นวิธีการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนต้นพืช เพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับใบและลำต้นส่วนเหนือดินซึ่งมีปัจจัยหลายประการเข้ามาเกี่ยวข้องและส่งผลกระทบต่อความสำเร็จของการใช้ เช่น ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่จะเจริญครอบครองบนผิวพืช โดยใช้อาหารและความชื้นบนผิวพืช ซึ่งมีรายงานความสำเร็จของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคที่ผิวใบอยู่มากพอสมควร รวมทั้งการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลือง และถั่วเหลืองฝักสดที่มีการผลิตเป็นการค้าเพื่อการส่งออก ตลอดจนพืชชนิดต่าง ๆ (Prathuangwong *et al.*, 2005)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การสำรวจ การแพร่ระบาดและรวบรวมตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่เป็นโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

เก็บรวบรวมตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการลำต้นเน่า จากพื้นที่ผลิตข้าวโพดหวานที่สำคัญในเขตจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลพบุรี และสระบุรี โดยกำหนดพื้นที่สำรวจแบบกระจายทั่วแปลง ภายในพื้นที่สำรวจขนาด 1 ไร่/พื้นที่ โดยทำการสุ่มพื้นที่สำรวจจำนวน 10 จุด ตามแนวเส้นทะแยงมุม สังเกตอาการต้นข้าวโพดหวานที่คาดว่าจะสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบอาการกับคู่มืออ้างอิงของต่างประเทศ (White, 1999) เปรียบเทียบระดับการเกิดและความรุนแรงของโรคในแปลงปลูกแต่ละพื้นที่และเก็บตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการดังกล่าวใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อมัดปากถุง เขียนข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ และสถานที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐาน เก็บใส่ภาชนะที่มีความเย็นเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่าง สำหรับนำไปแยกเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคต่อไป

### 2. การแยกและการรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียข้าวโพดหวาน

#### 2.1 การแยกเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

นำตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรค ที่มีลักษณะอาการแผลน้ำเน่าเป็นสีน้ำตาลบริเวณลำต้นที่เก็บรวบรวมตามวิธีการในข้อ 1 มาล้างผิวค่านอกด้วยน้ำสะอาด เลือกบริเวณแผลที่เกิดขึ้นมาตัดเป็นท่อนบริเวณรอยต่อระหว่างบริเวณที่เป็นโรคกับส่วนปกติ โดยใช้มีดที่ปลอดเชื้อตัดให้เป็นท่อนขนาด 5 เซนติเมตร ใช้คีมคีบ (forceps) คีบท่อนตัวอย่างข้าวโพดหวานจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วใช้มีดปลอดเชื้อผ่าท่อนข้าวโพดหวานตามแนวยาว ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะบริเวณเนื้อเยื่อที่แสดงอาการเน่า นำมา cross streak บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน จนมีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียที่คาดว่าจะสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหาร NGA โดยที่ลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา หนูน วาว ขอบเรียบ แล้วจึงย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เมื่อเชื้ออายุ 3-6 วัน จะมีลักษณะโคโลนีคล้ายไข่ดาว จึงนำมา cross streak บนอาหาร NGA ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง (sub culture) จนแน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น จึงเก็บ

เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในหลอดอาหารเลี้ยง NGA จนอายุ 24 ชั่วโมง ปิดทับโคโลนีด้วย mineral oil ที่นิ่งมาแล้ว ย้ายหลอดเชื้อไปเก็บในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

## 2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

### 2.2.1 การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitivity response: HR) บนใบยาสูบ

เตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่า โดยเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient glucose broth (NGB) ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง และบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ปรับความขุ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $10^8$  cfu/ml) จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาดเล็ก โดยไม่ใส่เข็มฉีดยา (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อดูด suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ปล่อยออกจากหลอดแล้วฉีดเข้าสู่เนื้อใบของต้นยาสูบ (*Nicotina tabacum*) อายุ 45 วัน อย่างช้า ๆ บริเวณใต้ใบยาสูบจะมีลักษณะชุ่มน้ำ หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ ตรวจสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน โดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชจะเกิดอาการตายของเซลล์ (necrotic) บนใบยาสูบ ทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรค (Schaad, 1988)

### 2.2.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคนต้นข้าวโพดหวาน

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่แยกจากข้อที่ 2.1 มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหาร NGA ที่อายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ที่อายุ 30 วัน โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียสาเหตุโรคนต้นข้าวโพดหวานระดับเหนือดิน 3 เซนติเมตร และปิดปากแผลด้วยวาสลิน (Jeamvijit *et al.*, 2005) เก็บรักษาต้นข้าวโพดหวานไว้ที่สภาพอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และให้ความชื้นสูงติดต่อกัน 48 ชั่วโมง สังเกตอาการและบันทึกผลเมื่อต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการโรคจึงแยกเชื้อจากต้นข้าวโพดหวาน (reisolation) มาปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดหวานชุดใหม่ (reinoculation) ตามวิธีการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) นำเชื้อที่แยกได้มา streak บนอาหาร NGA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ

สำหรับใช้ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป และเพื่อคงความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลอง จึงต้องทำการปลูกเชื้อบนต้นข้าวโพดหวานเป็นระยะอย่างสม่ำเสมอ

### 2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิต extracellular enzyme

ทดสอบประสิทธิภาพการผลิต cellulases และ pectinase ของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NGB บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ตกตะกอนแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่ได้ไปทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดบนอาหารทดสอบคือ อาหาร PDA medium (0.1 เปอร์เซ็นต์ carboxymethyl cellulose sodium phosphate pH 7.0 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose) และอาหาร pectinase medium (1 เปอร์เซ็นต์ polygalacturonic acid (PGA) 1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract, 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl pH 8.5 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel) ตามลำดับ ตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง โดยการทดสอบเอนไซม์ cellulases เติ corgo red ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเท corgo red ทิ้ง จากนั้นเท 1 M NaCl ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้สักครู่แล้วเทออก จากนั้นดูลักษณะการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

## 3. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและการจัดจำแนก

### 3.1 การทดสอบคุณสมบัติในการติดสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมาทดสอบแกรมอย่างหยาบ ด้วยสารละลายด่างโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (3% KOH) โดยการหยดสารละลายด่างโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด ใช้ loop แตะเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหารแข็ง NGA ที่อายุ 24-48 ชั่วโมง กวนให้เข้ากันแล้วสังเกตความหนืดของเซลล์แบคทีเรีย ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่มีความหนืดแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ถ้าหนืดแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และยืนยันผล โดยการย้อมสีเซลล์ (Gram's stain reaction) ตามวิธีการของ Schaad (1988) ด้วยการตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแบบแกรม โดยล้างกระจกสไลด์ให้สะอาด นำไปจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อและทำลายคราบไขมัน จากนั้นใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมากระจาย (smear) ลงแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยการลนเปลวไฟห่าง ๆ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยด

crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย smear เชื้อ ปล่อยให้แห้ง 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า หยดตามด้วยสารละลายไอโอดีน ปล่อยให้แห้ง 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งแล้วล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที ตามด้วยน้ำเปล่า ซับให้แห้ง หยดตามด้วยสาร safranin-o นาน 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า ซับให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกผลการติดสีแกรมลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ โดยหากเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบจะติดสีแดงของ safranin-o แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์ของแบคทีเรียทดสอบจะติดสีน้ำเงินของ crystal violet

### 3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

สำหรับลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจะใช้ข้อมูลพื้นฐานจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA ที่อายุ 24-48 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ การใช้ซอกซิเจน oxygen relationship ความสามารถในการเคลื่อนที่ motility การย่อยเจลาติน gelatin hydrolysis การเกิดปฏิกิริยา catalase production levan formation starch hydrolysis growth on potato citrate utilization oxidase test lipolytic activity รวมทั้งคุณสมบัติการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ cellobiose glucose mannitol sorbitol และ dulcitol (Gerhardt, 1981) ตามวิธีการดังต่อไปนี้

#### 3.2.1 oxygen relationship

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำ stab inoculate ในอาหารหลอมเหลวที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อละ 1 หลอด เอามือหมุนหลอดให้เชื้อผสมกับอาหารอย่าให้เกิดฟองอากาศ เมื่ออาหารแข็งนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วัน ถ้าเชื้อเจริญเฉพาะผิวหน้าชั้นบนแสดงว่าเป็น aerobe ถ้าเจริญที่ก้นหลอดเป็นพวก anaerobe ถ้าเจริญจากผิวหน้าลงมากกลางหลอดเป็น facultative anaerobe และถ้าเจริญใต้ผิวอาหารลงมาเล็กน้อยจัดเป็น microaerophilic

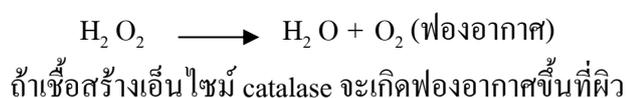
#### 3.2.2 gelatin hydrolysis

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำ stab inoculate ในอาหารเชื้อละ 1 หลอด ทำ control เปรียบเทียบ 1 หลอด โดยแทงด้วยเข็มเจาะที่ไม่มีเชื้อ นำหลอดทดลองบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 2-3 วัน นำมาตรวจผลโดยนำไปแช่ในน้ำแข็งหรือตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตการย่อย gelatin เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย gelatin ได้นั้นจะทำให้ gelatin ไม่แข็งตัวหลังจากนำไปแช่เย็นสังเกตลักษณะรูปร่างของ gelatin

### 3.2.3 catalase production

เชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง streak บนอาหารเอียง NGA เชื้อละ 1 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้มาเติมด้วย 3 เปอร์เซ็นต์  $H_2O_2$  ให้ท่วมอาหารแล้วสังเกตการสร้างฟองอากาศดังสมการ



### 3.2.4 levan formation

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล sucrose โดยการนำเชื้อมา streak บนอาหาร NGA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส คอยสังเกตลักษณะโคโลนีทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ถ้าเชื้อสร้างสาร levan (poly-fructose) ซึ่งเป็นสาร extracellular appssule ของเชื้อ โคโลนีจะมีเมือกเยิ้ม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร เมื่อมีอายุ 2 วัน และ 5-7 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 3 วัน โคโลนีจะมีความหนูน

### 3.2.5 starch hydrolysis

ปลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบน starch agar โดย streak เป็นเส้นตรงบนอาหาร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารทดสอบ Gram' Iodine เทให้ท่วมอาหารในจาน แล้วสังเกตการเกิดสี ถ้าเกิดบริเวณใส ๆ รอบรอยที่มีเชื้อเจริญอยู่แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ ถ้าไม่ย่อยแป้งในอาหารจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็นสีน้ำเงินปนม่วงเกิดขึ้น

### 3.2.6 growth on potato

ย้ายเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ไปเลี้ยงบนชิ้นมันฝรั่งดิบที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน คอยสังเกตการเจริญบนมันฝรั่ง ถ้าเชื้อเจริญบนมันฝรั่งได้จะมีการเจริญของแบคทีเรียเป็นเมือกเฝิมจำนวนมากบนผิวมันฝรั่ง

### 3.2.7 citrate utilization

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak ลงบนอาหารเลี้ยง citrate agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-7 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่สามารถใช้ citrate เป็น carbon source ก็เจริญเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำเงิน

### 3.2.8 oxidase test

เป็นการทดสอบการผลิต cytochrome oxidase ของแบคทีเรีย ใช้ไม้จิ้มฟันหนึ่งข่า เชื้อแต่ละเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร NGA ถูบนกระดาษกรองที่อ้อมด้วยสารทดสอบ 1 เปอร์เซ็นต์ tetra methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride สังเกตการเกิดสีบนกระดาษกรอง ถ้าหากไม่มีสีเกิดขึ้นหรือใช้เวลาในการเกิดสีนานกว่า 1 นาที ถือว่าไม่มีการสร้างเอ็นไซม์นี้

### 3.2.9 lipolytic activity

นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak เป็นเส้นตรงบนอาหารอาจทำ 3-4 เชื้อ/จาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้การทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวมีการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เชื้อ *E. chrysanthemi* 3937 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Shizuoka University ประเทศญี่ปุ่น นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบไปเปรียบเทียบกับข้อมูลการจำแนกแบคทีเรีย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. และคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทาง สรีรวิทยาและชีวเคมีที่สอดคล้องกับ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* เพื่อไปยืนยันผลในระดับสูงต่อไป

### 3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงบริเวณ *pel* gene ของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค มาตรวจสอบด้วยไพรมอร์จำเพาะ โดยการสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียตามวิธี Chen and Kuo (1993) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NGA จนได้โคโลนีเดี่ยวแล้วมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 120/นาที่ ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยแบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งไปเติม lysis buffer (40 mM Tris-acetate pH 7.8 20 mM sodium acetate 1 mM EDTA 1 เปอร์เซ็นต์ SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ เดิม 5 M NaCl ปริมาตร 66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที ใส่น้ำใส่หลอดใหม่ จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วย chloroform ปริมาตรเท่ากับน้ำใส ผสมเข้ากันโดยการพลิกคว่ำเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ของเหลวชั้นแยกชั้น จากนั้น ใส่น้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตรสกัดซ้ำด้วย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที ใส่น้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตรเติม isopropanol ที่เข้มข้นปริมาตรเท่ากับน้ำใสผสมให้เข้ากันจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง นำมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของยีนเป้าหมาย ด้วยไพรมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะเจาะจงบริเวณ *pel* gene ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* แล้วเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ตรวจสอบ PCR product เปรียบเทียบกับผลการทดลองของต่างประเทศ การศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรมอร์ Ech *pel* F: 5'GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT 3' และ Ech *pel* R: 5'CTG TGG CCG ATC AGG ATG GTT TTG TCG TGC' (Matsumoto, 2003) ทั้งนี้ไพรมอร์ที่ใช้เป็นบริเวณ conserve region ในส่วนของ *pel* gene ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการศึกษาดูการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *E. chrysanthemi* ทั้งนี้ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบทุกสายพันธุ์ 100 นาโนกรัม ผสมกับ 1X PCR buffer dNTP เอนไซม์ *Taq* polymerase และไพรมอร์ ผสมสารให้เข้ากัน โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	45 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	55	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาทุกไซ้ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาทุกไซ้โพลีเมอเรส มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้ UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

#### 4. การศึกษาเทคนิควิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค

##### 4.1 การคัดเลือกตัวแทนสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ผ่านการทดสอบและการจำแนกชนิดตามวิธีการในข้อ 3 มาเปรียบเทียบยืนยันระดับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคนบนข้าวโพดหวาน โดยนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหาร NGB ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียม suspension ของเชื้อสาเหตุโรคด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* บนข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 อายุ 14 วัน จำนวน 10 ต้น/สายพันธุ์เชื้อโรค แล้วคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดอาการโรครวดเร็วและรุนแรงที่สุดไปใช้ในการทดสอบต่อไป

#### 4.2 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้ข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 อายุ 14 วัน เป็นพันธุ์และระยะทดสอบเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 3 วิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำ มีข้าวโพดหวานทดสอบ 3 ต้น โดยทำการปลูกข้าวโพดหวานในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว และปลูกเชื่อดังกรรมวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นิด suspension เชื้อสาเหตุโรคเข้าลำต้นด้วยเข็มฉีดยา (Patakya and Ikin, 2003) ขนาด 1.0 มิลลิลิตร และจุด suspension เชื้อปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. (ความเข้มข้นประมาณ  $10^8$  cfu/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นิดเข้าลำต้นลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะสูงจากพื้นดิน 3 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 2 ราคดินด้วย suspension เชื้อสาเหตุโรคร่วมกับการทำแผลที่ราก โดยตัดรากด้วยมีดปลอดเชื้อให้มีระยะห่างจากโคนต้น 1.5 เซนติเมตร จากนั้นราคด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 3 จิ้มด้วยไม้จิ้มฟันที่มีเชื้อสาเหตุโรคและปิดปากแผลด้วยวาสลีน (Jeamvijit *et al*, 2005) โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่นำมาเชื่อมมาแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง จิ้มเข้าลำต้นลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะสูงจากพื้นดิน 3 เซนติเมตร

ในทุกกรรมวิธีใช้ถุงพลาสติกคลุมเพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง ประเมินอัตราการเกิดโรค (disease incidence) และความรุนแรงของโรค (disease severity) จากจำนวนต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคต่อจำนวนต้นข้าวโพดหวานทั้งหมดและระยะเวลาการเกิดโรคหลังทำการปลูกเชื้อ

#### 4.3 การศึกษาระยะการเจริญเติบโตและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

ศึกษาระยะการเจริญเติบโตและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบระยะการเจริญของข้าวโพดหวาน 3 ระยะ คือ อายุ 14 21 และ 28 วัน ภายใต้สภาพ

การให้ความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) ติดต่อกัน 48 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อ และการใส่ปุ๋ย ไนโตรเจน (46-0-0) อัตรา 1 กรัม/กระถางที่บรรจุดินปลอดเชื้อ 3 กิโลกรัม/ต้น ก่อนปลูกเชื้อ 3 วัน มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ข้าวโพดหวานจำนวน 10 ต้น โดยใช้ข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 เป็นพันธุ์ทดสอบ ปลูกข้าวโพดหวานในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว โดยปลูกกระถางละ 3 เมล็ด เมื่อเมล็ดงอกจะถอนออกเหลือกระถางละ 1 ต้น เมื่อข้าวโพดหวานอายุ 14 21 และ 28 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลองดังกล่าว กรรมวิธีแสดงใน (ตารางที่ 1) สำหรับกรรมวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจะใช้วิธี tooth pick method (Jeamvijit *et al.*, 2005) โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งฆ่าเชื้อและโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วนำไปจิ้มโดยตรงเข้าลำต้นข้าวโพดหวานทดสอบและมีการให้ความชื้นสูง ซึ่งประเมินการเกิดโรคโดยพิจารณาจากอัตราการเกิดโรค (disease incidence) และระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ติดต่อกัน 7 วัน หลังปลูกเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับ 1 = แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบน้ำอย่างรุนแรงภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อ ระดับ 2 = แสดงอาการน้ำเน่าและเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ และระดับ 3 = แสดงอาการน้ำเน่าบริเวณต้นและยอดที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อตามลำดับ

**ตารางที่ 1** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของข้าวโพดหวาน การให้ความชื้นสูง และการใส่ปุ๋ยในโตรเจนในสภาพเรือนทดลอง

ลำดับที่	กรรมวิธี
1	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 14 วัน ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH)
2	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 21 วัน ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH)
3	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 28 วัน ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH)
4	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 14 วัน
5	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 21 วัน
6	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + การใส่ปุ๋ยในโตรเจนที่อายุ 28 วัน
7	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) ที่อายุ 14 วัน
8	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) ที่อายุ 21 วัน
9	ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย + ภายได้สภาพความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) ที่อายุ 28 วัน
10	ไม่ทำการปลูกเชื้อ

#### 4.4 จำแนกระดับความต้านทาน โรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียในข้าวโพดหวานต่างพันธุ์

เปรียบเทียบระดับความต้านทาน โรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียในข้าวโพดหวานต่างสายพันธุ์ต่อเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยข้าวโพดหวานจำนวน 10 ต้น โดยใช้ข้าวโพดจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ อินทรี 2 ชูการ์ 74 ชูการ์ 75 ไฮบริคซ์ 3 ไฮบริคซ์ 10 บ้านสวน ไพโอเนีย 3012 ไพโอเนีย 30Y87 ไพโอเนีย 30A33 และ KSC 503 มาปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว เมื่อข้าวโพดหวานเจริญถึงอายุ 7 14 และ 21 วัน จึงทดสอบระดับความต้านทานโดยใช้วิธีที่ดีที่สุด คือ วิธีใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งมาเขี่ยตะไคร่โคลนของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร NGA ที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จิ้มเขี่ยกล้าต้นลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะสูงจากพื้นดิน 3 เซนติเมตร ภายใต้อากาศความชื้นสูงติดต่อกันนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบอาการหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน ประเมินการเกิดโรคโดยพิจารณาอัตราการเกิดโรค (disease incidence) และระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ตามข้อ 4.3 แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติและจัดแบ่งกลุ่มข้าวโพดหวานตามระดับความต้านทาน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดหวานต้านทานต่อโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียต่อไป

#### 5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และการทดสอบคุณสมบัติในการควบคุมโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรีย

##### 5.1 การเก็บตัวอย่างใบ ดินบริเวณรากและรากข้าวโพดหวาน

เก็บตัวอย่างใบ ดินบริเวณรอบราก (rhizosphere) และรากต้นข้าวโพดหวานที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรคจากพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวาน ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี และนครราชสีมา เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรีย โดยการสุ่มเก็บเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 1 นำตัวอย่างดังกล่าวมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ตามวิธีการดังนี้

## 5.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณราก

นำตัวอย่างดินบริเวณรากต้นข้าวโพดหวานที่ไม่เป็นโรคมารับทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี soil dilution plate โดยการนำตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 90 มิลลิลิตร แซ่ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียออกมาอยู่ในน้ำผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ปล่อยให้ดินตกตะกอนและเก็บเฉพาะส่วนของน้ำมาทำการเจือจางความเข้มข้นจนถึงระดับที่  $10^{-4}$  เท่า ด้วยวิธี 10-fold dilution ใช้ micropipette ดูด suspension ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดและกระจาย (spread) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ NGA ที่ ผสม cyclohexamide 0.1 เปอร์เซ็นต์ (เพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อรา) King's medium B และ Thornton's medium (Johnson and Curl, 1972) เพื่อใช้แยกเชื้อแบคทีเรียทั่วไปทั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads fluorescent* และ *Bacillus* spp. ตามลำดับอย่างละ 2-3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญทั้งหมด มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak ลงบนอาหาร NGA ซ้ำ 2-3 ครั้ง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อในหลอดอาหารแข็ง เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

## 5.3 การแยกเชื้อจากผิวใบและฝักราก

แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบข้าวโพดหวานที่สมบูรณ์ ด้วยวิธี leaf wash technique (กัลญา, 2538; Chase *et al.*, 1992) โดยนำตัวอย่างใบ 5 กรัม แซ่ลงในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร หยดสารลดแรงตึงผิว (Tension-T7) ลงไป 1-2 หยด แซ่ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียออกมาอยู่ในน้ำและใช้เป็น stock suspension ทำการเจือจางความเข้มข้นของ suspension ด้วยวิธี 10 fold dilution จากนั้นใช้ micropipette ดูด suspension ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  เท่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็ง NGA King's medium B และ Thornton's medium อย่างละ 2-3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง จนเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารและทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 5.2 ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรียฝักราก ทำโดยฆ่าเชื้อฝักรากด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาที เช่นเดียวกับขั้นตอนการแยกเชื้อผิวใบ เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* ในห้องปฏิบัติการ

เตรียมเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากวิธีการในข้อที่ 1 และข้อ 5 มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* โดยการ cross streak บนอาหารแข็ง NGA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำมาคัดเลือกและตรวจสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

### 6.1 การทดสอบด้วยวิธี dual culture และ cross-streak plate

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* ด้วยวิธีตัดแปลงจาก dual culture โดยการใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรีย epiphytes หรือ saprophytes นำไป streak ลงบนอาหารแข็ง NGA ให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใน 1 จานเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วย 4 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ control ที่ใช้เฉพาะเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* ไป streak ขนานกันทั้ง 2 เส้น แทนการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ภาพที่ 1)

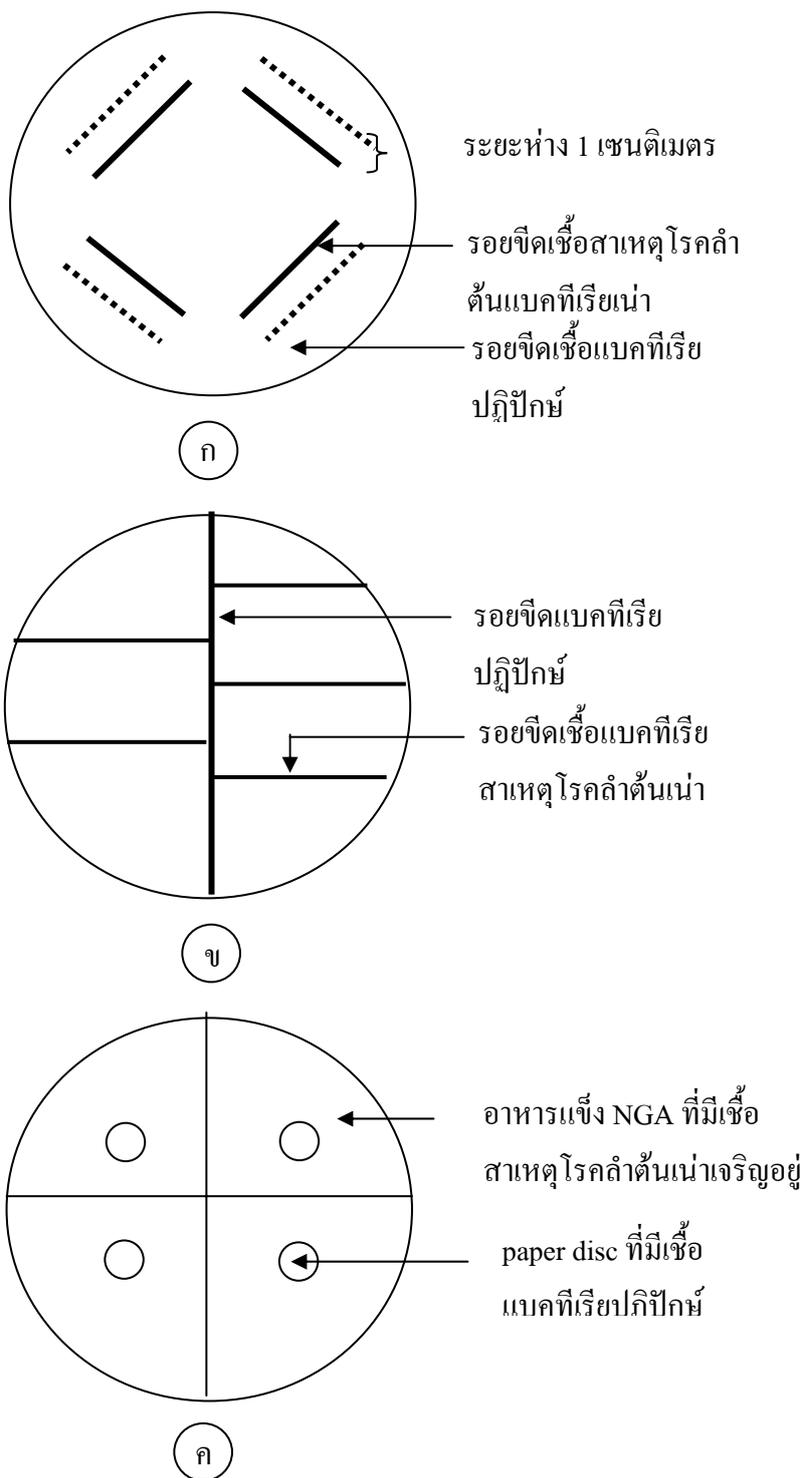
ส่วนวิธี cross-streak plate ทำโดยใช้ loop ปัดเชื้อและโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มา streak เป็นแนวตรงบนกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* อายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak บนจานอาหาร NGA ในแนวตั้งฉากกับรอย streak ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ภาพที่ 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในจานเลี้ยงเชื้อ

### 6.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่าง *E. chrysanthemi* pv. *zeae* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลว NGB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อให้

มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. (ประมาณ  $10^8$  cfu/ml) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ micropipette คูด suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้เย็นให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง ใช้ micropipette คูด suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองกลมเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยวางกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ข้างต้นจานละ 4 จาน (ภาพที่1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งดีและ/หรือกว้างที่สุดไปประเมินต่อในระดับเรือนทดลองและระดับไร่ตามสมควร

บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) = ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด - ความกว้างของโคโลนี



**ภาพที่ 1** ภาพจำลองการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zae* ในสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหาร NGA โดยวิธี dual culture (ก) cross-streak plate (ข) และ paper disc diffusion (ค)

## 7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดหวาน ในระดับห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นาน 3 นาที ผึ่งให้แห้งคลุกเมล็ดด้วย suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตร/เมล็ด 100 กรัม (seed bacterization) ผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้ว นำไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ดจานละ 10 เมล็ด อย่างละ 3 ซ้ำ ต่อ 1 สายพันธุ์ เชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อลงบนกระดาษกรองทุกวันในปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ความชื้น บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาวราก (root length) และความสูงของต้น (shoot height) ที่ระยะเวลา 7 วัน หลังงอกเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ที่แช่เมล็ดข้าวโพดหวานในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทน suspension แบคทีเรีย

## 8. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทานโรคกล้าต้นนำแบคทีเรียในสภาพเรือนทดลอง

### 8.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae*

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อสาเหตุโรค ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ บนอาหารแข็ง NGA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละชนิด แยกเลี้ยงในอาหารเหลว NGB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบ/นาที นาน 24-48 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) สำหรับคลุกเมล็ดและพ่นต้นข้าวโพดหวานตามลำดับ โดย suspension เชื้อแต่ละชนิดจะมีการเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ของสารลดแรงตึงผิว (Tension-T7) ก่อนใช้ ส่วนเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สำหรับปลูกเชื้อใช้วิธีการเลี้ยงบนอาหาร NGA อย่างเดียว

### 8.2 การเตรียมเมล็ดข้าวโพดหวาน

ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที  
ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ผึ่งไว้ให้แห้งบนกระดาษซับก่อนใช้ทดลอง

### 8.3 การปลูกพืชทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งการ  
ทดลองออกเป็น 18 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ 1 ซ้ำ ใช้ข้าวโพดหวาน 10 เมล็ด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCL10

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCR20

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCR21

กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ PCL17

กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ LCR9

กรรมวิธีที่ 6 ไม่คลุกเมล็ดแต่พ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCL10

กรรมวิธีที่ 7 ไม่คลุกเมล็ดแต่พ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCR20

กรรมวิธีที่ 8 ไม่คลุกเมล็ดแต่พ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ KCR21

กรรมวิธีที่ 9 ไม่คลุกเมล็ดแต่พ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ PCL17

กรรมวิธีที่ 10 ไม่คลุกเมล็ดแต่พ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์ LCR9

กรรมวิธีที่ 11 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วย suspension แบบที่เรียกปฏิบัติสายพันธุ์

KCL10

กรรมวิธีที่ 12 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์

KCR20

กรรมวิธีที่ 13 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์

KCR21

กรรมวิธีที่ 14 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์

PCL17

กรรมวิธีที่ 15 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ LCR9

กรรมวิธีที่ 16 ควบคุมโดยใช้สารเคมี copper hydroxide คลุกเมล็ดและพ่นใบ

กรรมวิธีที่ 17 ใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื่อมคลุกและพ่นใบแทน suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัย และปลูกเชื้อโรคพืช

กรรมวิธีที่ 18 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ โดยไม่มีการปลูกเชื้อ

จากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดหวานที่ผ่านการคลุกเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีมาปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว ที่ผสมดินปลอดเชื้อกระถางละ 3 กิโลกรัม เก็บต้นข้าวโพดหวานในสภาพเรือนทดลองแล้วพ่น suspension เชื้อชนิดเดิมซ้ำเมื่อข้าวโพดหวานอายุ 14 วัน เก็บรักษาต้นข้าวโพดหวานต่อในสภาพเรือนทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบบที่เรีย (Ech11) โดยการใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคลโลนีเชื้อสาเหตุที่เตรียมด้วยวิธีการในข้อที่ 4.2 วางเข้าสู่ลำต้นลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะสูงจากพื้นดิน 3 เซนติเมตร และปิดปากแผลด้วยวาสลินเก็บรักษาในสภาพความชื้นสูงติดต่อกัน 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคกับกรรมวิธีการคลุกเมล็ดและการพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (กรรมวิธีที่ 17 และ 18) และการควบคุมด้วยสารเคมี copper hydroxide (กรรมวิธีที่ 16) โดยประเมินการเกิดและความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ตามวิธีการในข้อ 4.3

## 9. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการกระตุ้นความต้านทานโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพดหวานในสภาพแปลงไร่

### 9.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจากสภาพเรือนทดลอง คือ KCR21 และ PCL17 ในอาหาร NGB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ micropipette ดูด suspension เชื้อดังกล่าวลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 250 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) เติมสารลดแรงตึงผิว (Tension-T7) ในอัตรา 0.1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร ลงใน suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

### 9.2 การเตรียมเมล็ดข้าวโพดหวาน

ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ผึ่งไว้ให้แห้งบนกระดาษซับก่อนใช้ทดสอบ

### 9.3 การปลูกข้าวโพดหวานทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ RCBD โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 11 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเมล็ดด้วย suspension แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KPS46

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเมล็ดด้วย suspension แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KCR21

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเมล็ดด้วย suspension แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PCL17

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกด้วย suspension แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KPS46

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ KCR21

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ PCL17

กรรมวิธีที่ 7 คลุกเมล็ด + พ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ KPS46

กรรมวิธีที่ 8 คลุกเมล็ด + พ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ KCR21

กรรมวิธีที่ 9 คลุกเมล็ด + พ่นด้วย suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัยสายพันธุ์ PCL17

กรรมวิธีที่ 10 ควบคุมโดยใช้สารเคมี copper hydroxide

กรรมวิธีที่ 11 ควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทน suspension แบบที่เรียปฏิบัติภัย

## 10. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา บางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติภัยและการจัดจำแนกชนิด

### 10.1 การศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีบนอาหาร NGA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติภัยที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการเจริญส่งเสริมการเจริญเติบโตและยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ดีที่สุดในสภาพห้องปฏิบัติการ สภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ บนอาหาร NGA บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ศึกษารูปร่าง ขนาด และสีโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร NGA

### 10.2 การศึกษาคุณสมบัติในการติดสีแกรม รูปร่าง และขนาดของเซลล์

ตรวจสอบคุณสมบัติในการติดสีแกรม รูปร่าง และขนาดของเซลล์อีกครั้ง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติภัยแต่ละสายพันธุ์บนอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติภัยแต่ละสายพันธุ์ กระจายลงแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อและทำลายคราบมันแล้วยัด (fixed) เซลล์ด้วยการลนเปลวไฟห่าง ๆ 1-2 ครั้ง จากนั้นนำไปย้อมสี

แบบแกรม (Gram's stain) ด้วยสาร crystal violet และ safranin-o ตามวิธีการของ Schaad (1988) โดยที่เซลล์แบคทีเรียที่ติดสีม่วงของ crystal violet จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ safranin-o จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

### 10.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนอาหาร NGA ให้มีอายุประมาณ 24-36 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การใช้ออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยา catalase indole production nitrate reduce to nitrite urea hydrolysis starch hydrolysis levan information lipolytic activity test (Tween 80) citrate utilization และ gelatin liquefaction (Gerhardt, 1981) และทดสอบคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ glucose sucrose lactose cellobiose mannitol sorbitol และ dulcitol รวมทั้งคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบ (เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบในข้อ 2.2.1) เพื่อนำข้อมูลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบมาเปรียบเทียบกับข้อมูลหนังสือ Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> edition (Holt *et al.*, 1994) เพื่อจำแนกชนิดเบื้องต้น

## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. การระบาดของโรคลำต้นแบคทีเรียข้าวโพดในแหล่งปลูก

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคลำต้นเน่าในแหล่งปลูกข้าวโพดหวาน 6 จังหวัด ในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี และนครราชสีมา สามารถรวบรวมต้นข้าวโพดหวานที่แสดงลักษณะอาการโรคลำต้นเน่ารวม 85 ตัวอย่าง พบว่า ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีมีจำนวนต้นข้าวโพดหวานที่แสดงลักษณะอาการเน่ามากที่สุด 36 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นร้อยละการระบาดเท่ากับ 40% ของพื้นที่สำรวจ รองลงมาคือราชบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี จำนวน 19 13 8 7 2 ตัวอย่าง คิดเป็นการระบาดเท่ากับ 25 20 20 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่สำรวจ ตามลำดับ ทั้งนี้การประเมินระดับการระบาดของโรคพิจารณาจากจำนวนต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการ โรคต่อจำนวนต้นที่ปกติในพื้นที่กลุ่ม 1 ตารางเมตร จาก 10 จุด ของแปลงขนาด 1 ไร่ แนวทะแยงมุม โดยแต่ละพื้นที่ต้นข้าวโพดหวานจะแสดงอาการและความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ ฤดูที่ปลูกและสภาพแวดล้อม และเมื่อพิจารณาจากลักษณะอาการเน่าที่แสดงบนต้นข้าวโพดหวาน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 บริเวณต้นแสดงอาการแผลชำน้ำ กลุ่มที่ 2 บริเวณต้นแสดงอาการเน่าเกือบทั้งลำต้น และกลุ่มที่ 3 ต้นแสดงอาการเน่าและหักล้ม นอกจากนี้ลักษณะและความรุนแรงของโรคยังมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งพื้นที่ปลูกและพันธุ์ข้าวโพดหวาน โดยพบว่า ข้าวโพดหวานพันธุ์ ATS 5 ที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี มีความรุนแรงของโรคสูง ในกลุ่มอาการที่ 3 สำหรับพันธุ์ชูการ์ 75 ไฮบริดส์ 3 และอินทรี 2 จะแสดงอาการใกล้เคียงกัน ในกลุ่มอาการที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 2)

#### 2. สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

เมื่อนำตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจากพื้นที่ปลูกทั้ง 6 จังหวัด มาทำการแยกเชื้อบนอาหาร NGA พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะและสีสรรของโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร จึงได้ทำการคัดเลือกเฉพาะ โคโลนีที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจากตัวแทนตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการเน่าทั้ง 85 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) รวม 85 สายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีลักษณะโคโลนี

สีขาวอมเทา นูน วาว ขอบเรียบ บนอาหาร NGA และเมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ก็พบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเป็นรูปไข่ดาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* (ภาพที่ 3) จึงเก็บรวบรวมเชื้อดังกล่าวไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการ cross streak บนอาหาร NGA ประมาณ 2-3 ครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยว ทำการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ glycerol และเก็บรักษาไว้ภายใต้สภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 ผลการสำรวจและระดับการระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย จากการสุ่มตัวอย่าง  
ข้าวโพดหวานต่างสายพันธุ์ในพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด

แหล่งสำรวจ	พันธุ์	จำนวนตัวอย่าง	ลักษณะอาการ <sup>1/</sup>	ระดับการระบาด (%) <sup>2/</sup>
กาญจนบุรี	ไฮบริกซ์3	12	B	40
	ซูการ์75	10	A	
	ATS5	14	C	
ราชบุรี	ไฮบริกซ์3	5	B	25
	ซูการ์75	6	B	
	ATS5	8	C	
นครราชสีมา	อินทรี2	8	B	20
	ซูการ์75	5	A	
เพชรบูรณ์	ไฮบริกซ์3	8	A	20
สระบุรี	ไฮบริกซ์3	3	A	15
	ซูการ์74	4	B	
ลพบุรี	ซูการ์74	2	A	10
รวม		85		

<sup>1/</sup>อาการโรคลำต้นเน่าและเก็บตัวอย่างพิจารณาจากลักษณะอาการที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ (A) บริเวณต้นแสดงอาการแผลช้ำน้ำน้ำ (B) บริเวณต้นแสดงอาการเน่าเกือบทั้งลำต้น (C) ต้นแสดงอาการเน่าและหักล้ม

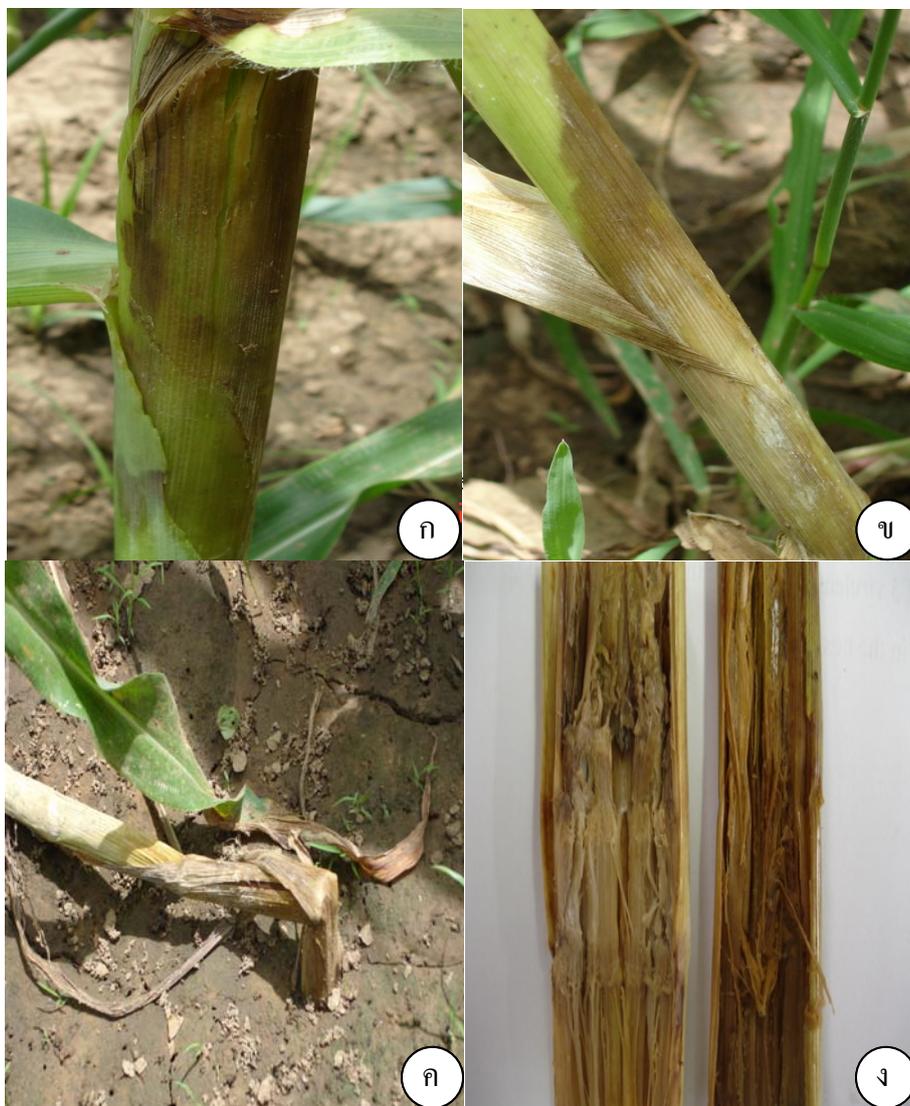
<sup>2/</sup>ระดับการระบาดของโรคคิดค่าเฉลี่ยในจุดสำรวจประเมินจากจำนวนต้นเป็นโรค

ตารางที่ 3 จำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่า ที่เก็บรวบรวมและแยกจาก  
ตัวอย่างข้าวโพดหวานในพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด

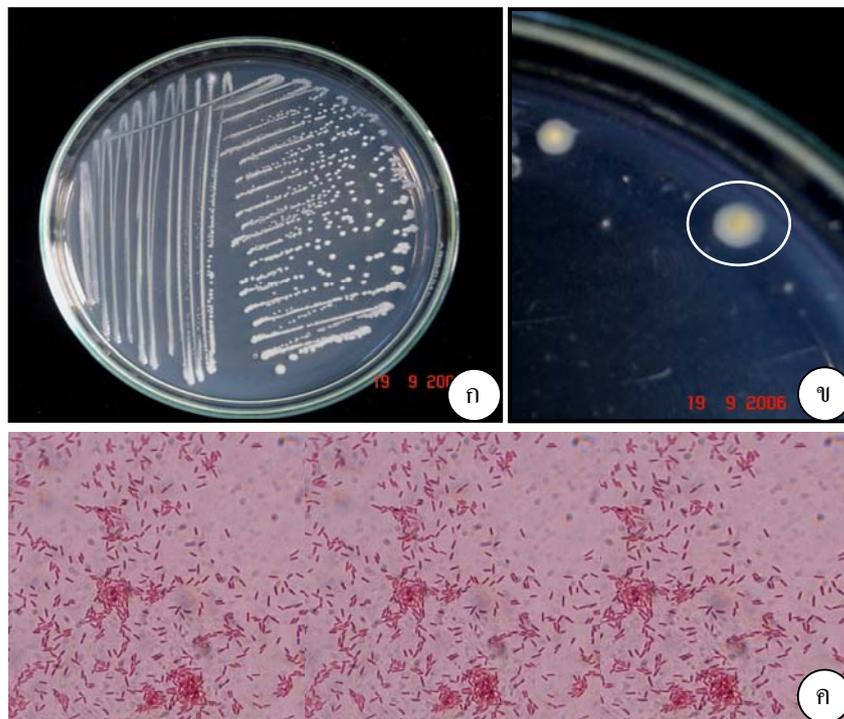
หมายเลขจัดเก็บ <sup>1/</sup>	พันธุ์ข้าวโพดหวาน	แหล่งสำรวจ	จำนวน	สายพันธุ์แบคทีเรีย <sup>2/</sup>
Ech1-Ech12	ไฮบริด 3	กาญจนบุรี	12	Kh01-Kh012
Ech13-Ech22	ซูการ์ 75	กาญจนบุรี	10	Ks01- Ks010
Ech23-Ech37	ATS 5	กาญจนบุรี	15	Ka01-Ka014
Ech38-Ech42	ไฮบริด 3	ราชบุรี	5	Rh01-Rh05
Ech43-Ech48	ซูการ์ 75	ราชบุรี	6	Rs01-Rs06
Ech49-Ech56	ATS 5	ราชบุรี	8	Ra01-Ra08
Ech57-Ech64	อินทรี 2	นครราชสีมา	8	Ni01-Ni08
Ech65-Ech69	ไฮบริด 3	นครราชสีมา	5	Ns01-Ns05
Ech70-Ech77	ไฮบริด 3	เพชรบูรณ์	8	Ph01-Ph06
Ech78-Ech79	ไฮบริด 3	สระบุรี	2	Sh01-Sh02
Ech80-Ech83	ซูการ์ 74	สระบุรี	4	Ss01-Ss04
Ech84-Ech85	ซูการ์ 74	ลพบุรี	2	Ls01-Ls02
รวม			85	

<sup>1/</sup>รหัสจัดเก็บแบคทีเรียที่กำหนดขึ้นตามแหล่งปลูกและพันธุ์ข้าวโพดที่เก็บรวบรวมตัวอย่างคือ K, R, N, P, S และ L = กาญจนบุรี ราชบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี

<sup>2/</sup>หมายเลขจัดเก็บสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งปลูก เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการบริเวณลำต้นฉ่ำน้ำ (ก) แสดงอาการเน่าเกือบทั้งต้น (ข) และฉ่ำน้ำอย่างรุนแรงจนต้นหักพับ (ค) เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในเน่าและเป็นสีน้ำตาลและมีกลิ่นเหม็น (ง)



**ภาพที่ 3** ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* pv. *zae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าที่เจริญบนอาหาร NGA ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา นูน วาว ขอบเรียบ (ก) และลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่ดาวตรงกลางโคโลนีนูน กลม สีเหลืองเข้มล้อมรอบด้วยสีขาว (ข) และการทดสอบแกรมด้วยวิธี Gram stain พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นแกรมลบติดสีแดงของ safranin-o (ค)

### 3. คุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลำต้นเน่า

การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในข้าวโพดหวานด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (ข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2) และการทดสอบการผลิต extracellular enzyme พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าทั้ง 85 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ โดยก่อให้เกิดอาการแผลไหม้ (necrotic) อย่างรวดเร็วและชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง จำนวน 10 สายพันธุ์ หลังฉีด suspension ของเชื้อแบคทีเรียและแสดงอาการที่ 48 ชั่วโมง จำนวน 75 สายพันธุ์ โดยในระยะแรกใบยาสูบแสดงอาการลำต้นเน่า และต่อมาจะเกิดอาการเซลล์ตายจนปรากฏเป็นแผลไหม้สีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4)

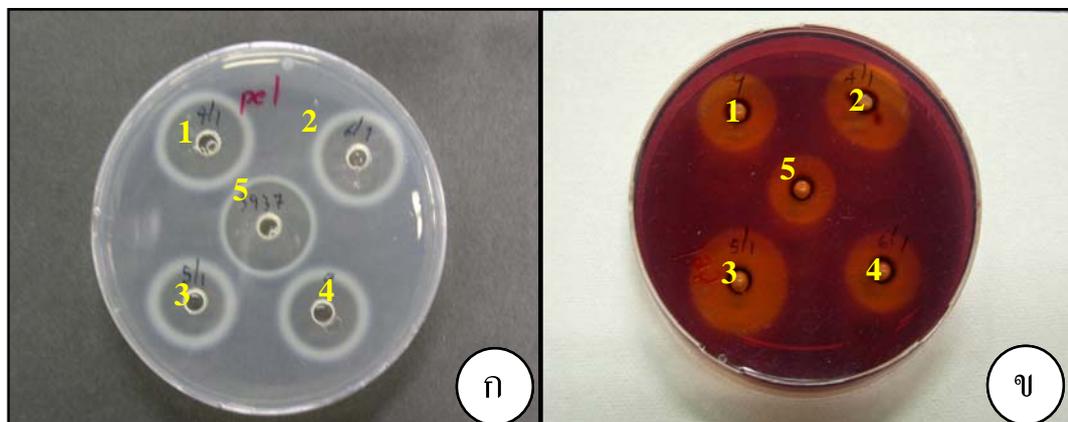
ขณะที่ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ที่ปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะะโคลโคนิแบคทีเรียจิ้มเข้าลำต้นโดยตรงลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร ระยะสูงจากพื้นดิน 3 เซนติเมตร และปิดปากแผลด้วยวาสลีน ร่วมกับการให้ความชื้นสูง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Jeamvijit *et al.*, 2005) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 85 สายพันธุ์ สามารถชักนำให้ต้นข้าวโพดหวานทดสอบแสดงอาการลำต้นเน่าได้ โดยเมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงของโรคหลังจากทำการปลูกเชื้อที่ 7 วัน สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ได้ 3 ระดับ คือ ระดับ 1 = แสดงอาการเน่าและบริเวณช่อและใบน้ำน้ำตาลอย่างรุนแรงภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อ ระดับ 2 = แสดงอาการแผลช้ำน้ำและเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ และระดับ 3 = แสดงอาการน้ำน้ำตาลบริเวณต้นและยอดที่ 6 วัน หลังจากปลูกเชื้อ ตามลำดับ และพบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจำนวน 10 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงและรวดเร็วที่สุดอยู่ในระดับ 3 ได้แก่ Ech11 Ech14 Ech18 Ech24 Ech44 Ech45 Ech55 Ech 60 Ech67 และ Ech71 โดยทั้ง 10 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดอาการ HR ชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) และเมื่อทำการแยกเชื้อกลับ (reisolate) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะและคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกลงบนต้นข้าวโพดหวานทดสอบ ซึ่งเป็นการยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีของ Koch's postulation เมื่อผ่าดูภายในลำต้นพบว่า เนื้อเยื่อพืชถูกย่อยทำลายบริเวณปลูกเชื้อตามแนวยาวลำต้นและมีกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 4) จึงคัดเลือกสายพันธุ์ Ech11 เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป

ส่วนผลการตรวจสอบการผลิต extracellular enzyme พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zeae* ทั้ง 85 สายพันธุ์ สามารถผลิต pectinase และ cellulase (ภาพที่ 5) ได้โดยมีระดับความกว้าง

ของโคโลนีแตกต่างกัน โดยการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *Cel* ของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zear* ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อ



ภาพที่ 4 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) หลังการฉีด suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zaea* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย



ภาพที่ 5 ลักษณะ clear zone บนอาหารทดสอบที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zaea* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยผลิต cellulase (ก) และ pectinase (ข)

ตารางที่ 4 ปฏิบัติการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zaea* สาเหตุโรค ลำต้นเน่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์หลังฉีดเชื้อ และความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบน ข้าวโพดหวานทดสอบ

สายพันธุ์เชื้อ	ปฏิกิริยา HR <sup>1/</sup>		ระดับความรุนแรงของโรค <sup>2/</sup>			การผลิต extracellular enzyme	
	24	48	1	2	3	cellulase	pectinase
Ech11	+	-	+	-	-	+++	+++
Ech14	+	-	+	-	-	+++	+++
Ech18	+	-	+	-	-	++	++
Ech24	+	-	+	-	-	++	+++
Ech44	+	-	+	-	-	++	++
Ech45	+	-	+	-	-	++	+
Ech55	+	-	+	-	-	++	++
Ech60	+	-	+	-	-	++	++
Ech67	+	-	+	-	-	++	++
Ech71	+	-	+	-	-	++	++

<sup>1/</sup>+ = เกิดปฏิกิริยา

- = ไม่เกิดปฏิกิริยา

<sup>2/</sup>+ = ระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ได้ 3 ระดับ คือ ระดับ 1 = แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบนํ้าอย่างรุนแรงภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อ ระดับ 2 = แสดงอาการนํ้าเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ และระดับ 3 = แสดงอาการนํ้าเน่าบริเวณต้นและยอดที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อ ตามลำดับ

#### 4. คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและการจัดจำแนก

การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย พบว่าตัวแทนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อก่อโรคมานี้แล้วในข้อ 2.2 ได้แก่ สายพันธุ์ Ech11 Ech14 Ech18 Ech24 Ech44 Ech45 Ech55 Ech60 Ech67 และ Ech71 พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา หนูนวาว ขอบเรียบ บนอาหาร NGA การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของเซลล์ โดยการย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วย methylene blue และส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อดังกล่าวมีลักษณะท่อนขนาดเล็ก ส่วนการทดสอบคุณสมบัติในการติดสีแกรมของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยวิธี Gram's stain reaction ผลปรากฏว่าเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าทั้ง 10 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียติดสีย้อมแกรมเป็นสีแดง (ภาพที่ 3) เมื่อทำการศึกษาคูสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 10 สายพันธุ์ และ *E. chrysanthemi* pv. *zaea* สายพันธุ์เปรียบเทียบ Ech3937 พบว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) สร้าง enzyme catalase ไม่สร้าง เอนไซม์ urease สามารถรีดิวซ์ nitrate สร้าง indole การทดสอบ citrate เป็นลบ สามารถย่อยมันฝรั่ง และย่อย galatin ได้ให้ผลในการทดสอบปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล cellobiose glucose lactose manitol และ sorbitol ได้ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol ducitol และสารซิทเรตได้ (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับเชื้อ *E. chrysanthemi* สายพันธุ์เปรียบเทียบ (Jeamvijit et al., 2005) และเมื่อนำข้อมูลจากการทดสอบทั้งหมดไปเปรียบเทียบกับตำรา Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> edition (Holt et al., 1994) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่แยกจากต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการลำต้นเน่า มีคุณสมบัติตรงกับ *E. chrysanthemi* pv. *zaea* ซึ่งจะนำเชื้อตัวแทนทั้งหมดไปยืนยันในระดับพันธุศาสตร์ต่อไป

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ Ech3937

ลักษณะทดสอบ <sup>2/</sup>	สายพันธุ์แบคทีเรีย <sup>1/</sup>										Ech3937 <sup>3/</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Gram reaction <sup>4/</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato soft rot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production											
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ducitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbital	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

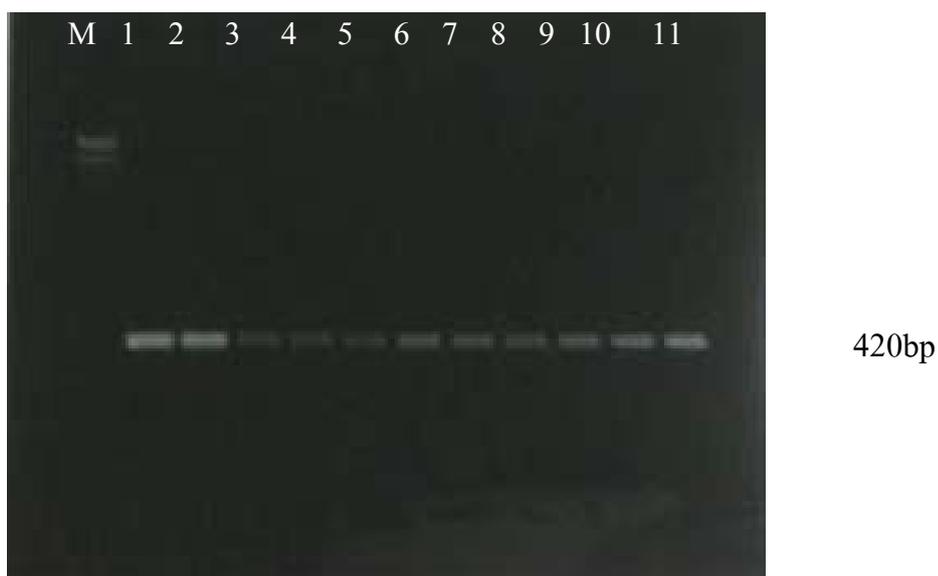
<sup>1/</sup> สายพันธุ์แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ คือ Ech11 Ech14 Ech18 Ech24 Ech44 Ech45 Ech55 Ech60 Ech67 และ Ech71 ตามลำดับ

<sup>2/</sup> ทดสอบปฏิกิริยา : + = เกิดปฏิกิริยา และ - = ไม่เกิดปฏิกิริยา

<sup>3/</sup> สายพันธุ์เปรียบเทียบ *E. chrysanthemi* Ech3937 (Shizuoka University ประเทศญี่ปุ่น)

<sup>4/</sup> Gram reaction - = Gram negative + = Gram positive

การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน *pel* gene ของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zuae* ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อบริเวณดังกล่าว ตามรายละเอียดในอุปกรณ์และวิธีการ พบว่า คู่ไพรเมอร์และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายได้ โดยหลังจากนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 420 bp บนแผ่นเจล (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นขนาดที่จำเพาะตรงตามที่ได้ ออกแบบไพรเมอร์ไว้ ทั้งนี้คู่ไพรเมอร์ทดสอบมีความจำเพาะระดับสปีชีส์ของ *E. chrysanthemi* pv. *zuae* และไพรเมอร์ดังกล่าวไม่ทำปฏิกิริยากับ *Erwinia* spp. ที่ศึกษาเปรียบเทียบรวมทั้งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดตรงกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ *E. chrysanthemi* 3937 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เชื้ออ้างอิงที่ ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ Plant pathology, Shizuoka University ประเทศญี่ปุ่น จึง ยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์เป็น *E. chrysanthemi* pv. *zuae*



ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR ของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zae* สายพันธุ์เปรียบเทียบและสายพันธุ์ไทย ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ *pel gene* ของเชื้อ *E. chrysanthemi* และตรวจบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ช่องที่ M : DNA marker ช่องที่ 1:Ech3937 ช่อง 2: Ech11 ช่อง 3: Ech14 ช่อง 4: Ech18 ช่อง 5: Ech 24 ช่อง 6: Ech44 ช่อง 7: Ech45 ช่อง 8: Ech55 ช่อง 9: Ech60 ช่อง 10:Ech67 และ ช่อง11:Ech71 ตามลำดับ

## 5. เทคนิควิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่เหมาะสมในการศึกษาโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค

### 5.1 เทคนิคและวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม

จากการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิควิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียเพื่อคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมและสะดวกต่อการศึกษาชีววิทยาของโรคลำต้นเน่าและปรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดหวานต้านทานโรค โดยมีการใช้ตัวแทนสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคทดสอบ 3 สายพันธุ์ คือ Ech11 Ech14 Ech24 ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความรุนแรงในการก่อโรคกับข้าวโพดหวาน และปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี คือ (1) การฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรค แต่ละสายพันธุ์เข้าลำต้นข้าวโพดหวานด้วยเข็มฉีดยา (2) การทำแผลที่รากและรากดินด้วย suspension เชื้อสาเหตุโรค (3) การทำแผลและถ่ายทอดเชื้อก่อโรค โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อและโคลนเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทดสอบจิ้มเข้าลำต้นข้าวโพดหวานโดยตรง และปิดปากแผลด้วยวาสลีน และตรวจสอบการเกิดโรคติดต่อกัน 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ต้นข้าวโพดหวานที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการที่ 3 สามารถชักนำให้ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการเน่าได้รวดเร็วและชัดเจนที่สุด อาการโรคปรากฏที่ 2 วัน หลังจากปลูกเชื้อ (อาการรุนแรงระดับ 1) และให้ผลที่ไม่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์เชื้อ (ตารางที่ 6) ในขณะที่วิธีการปลูกเชื้อด้วยการใช้เข็มฉีดยาฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดหวานโดยตรง (วิธีทั้ง 1) และการทำแผลที่รากร่วมกับการรากดินด้วย suspension เชื้อสาเหตุโรค (วิธีที่ 2) ให้ผลในการชักนำโรคช้ากว่าและความรุนแรงของโรคยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อ โดยสายพันธุ์ Ech11 ก่อให้เกิดโรคที่ 3 วันหลังปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธี ส่วน Ech24 ชักนำให้ให้เกิดโรคที่ 2 และ 3 วัน เมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีการที่ 2 และ 1 และสายพันธุ์ Ech14 ชักนำให้เกิดโรคที่ 2 และ 3 วัน เมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิคการปลูกเชื้อแบบต่าง ๆ  
ภายใต้สภาพเรือนทดลอง

สายพันธุ์แบคทีเรีย <sup>1/</sup>	ระดับความรุนแรงโรค <sup>2/</sup>		
	วิธีการปลูกเชื้อ		
	ราดดินด้วย suspension ร่วมกับการทำแผลที่ราก	ฉีด suspension	ใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคโลนีเชื้อ แบคทีเรีย
E.ch11	3	3	1
Ech14	3	2	1
Ech24	2	3	1

<sup>1/</sup> สายพันธุ์แบคทีเรียสาเหตุโรค

<sup>2/</sup> ระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ได้ 3 ระดับ คือ ระดับ 1 = แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบนํ้าอย่างรุนแรงภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อตามลำดับ ระดับ 2 = แสดงอาการนํ้าเน่าและเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ และระดับ 3 = แสดงอาการนํ้าเน่าบริเวณต้นและยอดที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อ



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ที่ระดับความรุนแรงของโรค หลังจากปลูกเชื้อด้วยวิธีที่ 3 ภายใต้สภาพเรือนทดลอง (ก) ไม่แสดงอาการโรค (ข) แสดงอาการน้ำเน่าบริเวณต้นและยอด (ค) แสดงอาการน้ำเน่าและบริเวณต้นและยอด (ง) แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบน้ำอย่างรุนแรงและต้นหักล้ม

## 5.2 ระยะเวลาเจริญเติบโตและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

การเปรียบเทียบระยะเวลาเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน สภาพความชื้น และการให้ปุ๋ยในโตรเจนที่มีผลต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* พบว่า ข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อด้วยการใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคและแทงเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดหวานโดยตรง และมีการให้ปุ๋ยในโตรเจน (46-0-0) ก่อนปลูกเชื้อ 2 วัน ร่วมกับการให้ความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) หลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง มีอัตราการเกิดโรคและระดับการเกิดโรคที่รุนแรงกว่าต้นข้าวโพดหวานที่ไม่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนก่อนปลูกเชื้อและ/หรือการให้ความชื้นหลังปลูกเชื้อและพบว่า อัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคมีความผันแปรแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะเวลาเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน โดยต้นข้าวโพดหวานอายุ 14 และ 21 วัน ที่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนก่อนปลูกเชื้อ 2 วัน ร่วมกับการให้ความชื้นหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง มีอัตราการเกิดโรคเฉลี่ย 100 และ 96 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคที่ระดับ 4 และ 3.5 ตามลำดับ โดยต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบแสดงอาการน้ำอย่างรุนแรงภายใน 2-3 วัน หลังปลูกเชื้อ ส่วนข้าวโพดหวานที่อายุ 28 วัน มีอัตราการเกิดโรคต่ำกว่าเฉลี่ย 92 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 3 คือ ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการเน่าบริเวณข้อและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ ในขณะที่ต้นข้าวโพดหวานทุกระยะเวลาเจริญเติบโตที่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนสูง 48 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้ออย่างเดียว และกรรมวิธีที่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนอย่างเดียวมีอัตราการเกิดและระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นข้าวโพดหวานอายุ 14 และ 21 วัน ที่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนสูงอย่างเดียวคิดต่อกัน 48 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อมีอัตราการเกิดโรคเท่ากับ 78 และ 76 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคที่ระดับ 2.5 ตามลำดับ คือ ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบแสดงอาการน้ำอย่างรุนแรงภายใน 5 วันหลังปลูกเชื้อ ส่วนข้าวโพดหวานอายุ 28 วัน มีอัตราการเกิดโรค 79 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 2 ส่วนต้นข้าวโพดหวานอายุ 14 21 และ 28 วันที่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจน ก่อนปลูกเชื้อ 2 วัน อย่างเดียวมีอัตราการเกิดโรคเท่ากับ 72 71 และ 68 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคที่ระดับเฉลี่ย 1.5 คือ ต้นข้าวโพดหวานแสดงอาการน้ำบริเวณต้นและยอดที่ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ ส่วนกรรมวิธีที่ไม่มีการให้ปุ๋ยในโตรเจนในทุกระยะการเจริญเติบโตไม่แสดงอาการโรคแต่อย่างใด ซึ่งให้เห็นว่าสภาพความชื้นถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดและความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย และการให้ปุ๋ยในโตรเจนในสภาพความชื้นสูงจะเป็นการส่งเสริมให้การเกิดมีความรุนแรงขึ้นและโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย สามารถเกิดขึ้นได้กับต้นข้าวโพดหวานทุกระยะเจริญ (ตารางที่ 7)

### 5.3 ระดับความต้านทานโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพดต่างพันธุ์

เมื่อนำเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zear* ด้วยการใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคลโคโนเชื้อสาเหตุโรคและแทงเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดโดยตรง ที่มีการให้ความชื้นหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง ที่ผ่านการทดสอบและคัดเลือกจากข้อ 4.1 และ 4.2 มาปรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคในสภาพเรือนทดลอง และเปรียบเทียบกับระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่แตกต่างกัน พบว่าข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมทั้ง 10 พันธุ์ คือ อินทรี 2 ชูการ์ 74 ชูการ์ 75 ไฮบริค 3 ไฮบริค 10 ไพโอเนีย 30A33 ไพโอเนีย 30Y87 ไพโอเนีย 3012 บ้านสวน และ KSC 503 มีการตอบสนองต่อวิธีการปลูกเชื้อแตกต่างกัน และอัตราการเกิดโรค ระดับความรุนแรงของโรคมีความผันแปรแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด (ตารางที่ 8) ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียบนข้าวโพดทดสอบต่างพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวโพดตามระดับความต้านทานโรค (resistance category) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แสดงเฉพาะอาการน้ำเน่าบริเวณยอดและลำต้นที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความต้านทานสูง ได้แก่ พันธุ์ไพโอเนีย 30A33 KSC 503 ไพโอเนีย 30Y87 และบ้านสวน กลุ่มที่ 2 แสดงอาการน้ำเน่าและลำต้นเน่าและหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานปานกลาง ได้แก่ พันธุ์ชูการ์ 74 ชูการ์ 75 ไฮบริค 3 และไฮบริค 10 และกลุ่มที่ 3 แสดงอาการเน่าบริเวณข้อและใบน้ำเน่ารุนแรง 2-3 วัน หลังจากปลูกเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความต้านทานต่ำ ได้แก่ พันธุ์ไพโอเนีย 3012 และ อินทรี 2 ตามลำดับ และจากการทดลองยังพบว่าต้นข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วัน อ่อนแอต่อการเกิดโรคมากกว่าที่ระยะ 21 วัน โดยแสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบแสดงอาการน้ำเน่าอย่างรุนแรงภายในระยะเวลา 2-3 วัน หลังปลูกเชื้อ ในขณะที่ข้าวโพดอายุ 21 วัน มีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 3 คือ ต้นข้าวโพดแสดงอาการเน่าบริเวณข้อและยอดที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 อัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในข้าวโพดหวาน พันธุ์อินทรี 2 หลังจากปลูกเชื้อที่อายุ 7 วันภายใต้สภาพเรือนทดลอง<sup>1</sup>

กรรมวิธี <sup>2/</sup>	อัตราการเกิดโรค (%) <sup>3/</sup>	ระดับความรุนแรงของโรค <sup>4/</sup>
1	100 a	4
2	96 a	3.5
3	92 ab	3
4	78 bc	2.5
5	76 c	2.5
6	79 bc	2.5
7	72 d	2
8	71 d	1.5
9	68 e	1
10	0 f	0

<sup>1/</sup>ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Rang Test

<sup>2/</sup>กรรมวิธีดังตารางที่ 1

<sup>3/</sup>อัตราการเกิดโรคคำนวณจากสมการ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (ผลรวมของอัตราการเป็นโรค/จำนวนต้นที่สุ่ม) x 100

<sup>4/</sup>ระดับความรุนแรงของโรค (diseased severity) ได้ 3 ระดับ คือ ระดับ 1 = แสดงอาการเน่าและบริเวณข้อและใบล่างอย่างรุนแรงภายใน 2 วัน หลังปลูกเชื้อระดับ 2 = แสดงอาการน้ำเน่าและเน่าและบริเวณต้นและยอดที่ 4 วัน หลังปลูกเชื้อ และระดับ 3 = แสดงอาการน้ำเน่าบริเวณต้นและยอดที่ 6 วัน หลังปลูกเชื้อตามลำดับ

ตารางที่ 8 การประเมินเพื่อคัดเลือกข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม ด้านทานต่อเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* ในสภาพเรือนทดลอง

พันธุ์ <sup>1/</sup>	ลักษณะอาการ	ระยะเวลาเจริญเติบโต <sup>2/</sup>			ระดับ <sup>3/</sup>
		7	14	21	
อินทรี 2	แสดงอาการเน่าบริเวณข้อและใบง้ำน้ำ	2	2	3	III
ไพโอเนีย 3012	แสดงอาการเน่าบริเวณข้อและใบง้ำน้ำ	2	2	4	III
ซูการ์ 74	แสดงอาการง้ำน้ำและลำต้นเน่า	3	3	5	II
ซูการ์ 75	แสดงอาการง้ำน้ำและลำต้นเน่า	3	4	5	II
ไฮบริคส์ 3	แสดงอาการง้ำน้ำและลำต้นเน่า	3	4	5	II
ไฮบริคส์ 10	แสดงอาการง้ำน้ำและลำต้นเน่า	4	4	5	II
บ้านสวน	แสดงอาการง้ำน้ำบริเวณยอดและลำต้น	6	6	6	I
KSC 503	แสดงอาการง้ำน้ำบริเวณยอดและลำต้น	5	6	7	I
ไพโอเนีย 30Y87	แสดงอาการง้ำน้ำบริเวณยอดและลำต้น	6	6	7	I
ไพโอเนีย 30A33	แสดงอาการง้ำน้ำบริเวณยอดและลำต้น	4	5	7	I

<sup>1/</sup> พันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่ได้ทดสอบรวม 10 พันธุ์

<sup>2/</sup> อายุข้าวโพดทดสอบ 3 ระดับ คือ 7 14 และ 21 วัน หลังปลูกเชื้อ

<sup>3/</sup> ระดับความต้านทานโรค I = ด้านทานระดับสูง II = ด้านทานระดับปานกลาง III = ด้านทานระดับต่ำ

## 6. การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย

### 6.1 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างใบและดินบริเวณราก

จากการเก็บตัวอย่างใบ ดินบริเวณรอบราก (rhizosphere) และรากข้าวโพดหวานจากพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ ราชบุรี สระบุรี และ ลพบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อแยกแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้ทั้งหมด 512 สายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบราก มีจำนวนมากที่สุด 201 สายพันธุ์ รองลงมาคือ ส่วนใบและรากตามลำดับ เท่ากับ 161 และ 150 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งจากส่วนใบ ดินบริเวณรากและรากมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งเป็นการยืนยันถึงนิเวศวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และสามารถจำแนกกลุ่มแบคทีเรียอย่างหยาบตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NGA ได้ 30 กลุ่ม (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 7) ดังนี้ กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือ กลุ่มที่ 16 ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวขรุขระขอบหยัก แสงผ่านไม่ได้ รองลงมาคือ กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่ 15 และกลุ่มที่ 29 ตามลำดับ ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ มีดังนี้ กลุ่มที่ 1 ลักษณะโคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้ กลุ่มที่ 2 ลักษณะโคโลนีสีเหลืองเรืองแสง รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด กลุ่มที่ 3 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น เป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยเชื้อรา รูปร่างไม่แน่นอน เจริญ สูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ผิวเรียบ ขอบเป็นเส้นสายแบบเส้นใย แสงผ่านได้บ้างโปร่งแสงเล็กน้อย กลุ่มที่ 4 ลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบหยักไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านได้เล็กน้อย กลุ่มที่ 5 ลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้เล็กน้อย กลุ่มที่ 6 ลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้ตลอด กลุ่มที่ 7 ลักษณะโคโลนีสีครีม เป็นเส้นหยาบแผ่ขยายคล้ายราก แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ แสงผ่านไม่ได้ กลุ่มที่ 8 ลักษณะโคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้ กลุ่มที่ 9 ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมมน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหารผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้ กลุ่มที่ 10 ลักษณะโคโลนีสีชมพู รูปร่างกลมมน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหารผิวเรียบ ขอบเรียบ



ตารางที่ 9 สายพันธุ์และแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่าง  
ต้นข้าวโพดหวานที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ

สายพันธุ์	จำนวนเชื้อ	ส่วนที่ใช้แยกเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
PCL1-PCL18	18	ใบ	อ.ชนแดน
PCSR1-PCSR25	25	ดินบริเวณราก	จ.เพชรบูรณ์
PCR1-PCR12	12	ราก	
SCL1-SCL10	10	ใบ	อ.พระพุทธบาท
SCSR1-SCSR14	14	ดินบริเวณราก	จ.สระบุรี
SCR1-SCR4	4	ราก	
LCL1-LCL10	10	ใบ	อ.ชัยบาดาล
LCSR1-LCSR10	10	ดินบริเวณราก	จ.ลพบุรี
LCR1-LCR8	8	ราก	
NCL1-NCL29	29	ใบ	ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าว
NCSR1-NCSR45	45	ดินบริเวณราก	ฟางแห่งชาติ
NCR1-NCR21	21	ราก	จ.นครราชสีมา
NCL01-NCL021	21	ใบ	อ.ปักธงชัย
NCSR01-NCSR026	26	ดินบริเวณราก	จ.นครราชสีมา
NCR01-NCR020	20	ราก	
RCL1-RCL15	15	ใบ	อ.จอมบึง
RCSR1-RCSR9	9	ดินบริเวณราก	จ. ราชบุรี
RCR1-RCR12	12	ราก	
KCL1-KCL24	24	ใบ	อ. เมือง
KCSR1-KCSR35	35	ดินบริเวณราก	จ. กาญจนบุรี

## ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนเชื้อ	ส่วนที่ใช้แยกเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
KCR1-KCR31	31	ราก	
KCL01-KCL020	20	ใบ	อ. ท่าม่วง
KCSR01-KCSR018	18	ดินบริเวณราก	จ. กาญจนบุรี
KCR01-KCR015	15	ราก	
KCL/1-KCL/14	14	ใบ	อ. ท่ามะกา
KCSR/1-KCSR/19	19	ดินบริเวณราก	จ. กาญจนบุรี
KCR/1-KCR/27	27	ราก	
รวม	512		

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างใบ ดินบริเวณ รากและรากข้าวโพดหวานที่เก็บจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ บนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่	แหล่งเก็บ <sup>2/</sup>	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา <sup>1/</sup>
1	LC	โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
2	LC	โคโลนีสีเหลืองเรืองแสง รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด
3	R	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยเชื้อรา รูปร่างไม่แน่นอน เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ผิวเรียบ ขอบเป็นเส้นสายแบบเส้นใย แสงผ่านได้เล็กน้อย
4	RS	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านได้เล็กน้อย
5	LC	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้
6	R	โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้ตลอด
7	R	โคโลนีสีครีม เป็นเส้นหยาบแผ่ขยายคล้ายราก แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ แสงผ่านไม่ได้
8	LC	โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
9	SR	โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมมน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
10	R	โคโลนีสีชมพู รูปร่างกลม กลมมน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
11	R	โคโลนีสีขาว ขนาดเล็ก แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
12	SR	โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด

## ตารางที่ 10 (ต่อ)

กลุ่มที่	แหล่งเก็บ <sup>2/</sup>	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา <sup>1/</sup>
13	LC	โคโลนีสีขาว รูปกระสวย แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบไม่เรียบ โคน้ำเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
14	R	โคโลนีสีครีม ขนาดเล็ก บุ่มตรงกลาง ผิวหน้าเป็นรอยย่น ขอบไม่เรียบ โคน้ำเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
15	LC	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน กลมมน โคน้ำสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านได้เล็กน้อย
16	R	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวขรุขระ ขอบหยัก แสงผ่านไม่ได้
17	LC	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
18	LC	โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ โคน้ำเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
19	SR	โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด
20	SR	โคโลนีสีขาว รูปกระสวย เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
21	R	โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม นูน โคน้ำสูงจากผิวหน้าอาหาร มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบไม่เรียบ โคน้ำเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
22	SR	โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน รูปกระสวย เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบเรียบ
23	LC	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ผิวเรียบ แสงผ่านไม่ได้
24	LC	โคโลนีสีเหลืองตรงกลางเข้ม รูปร่างกลม นูน โคน้ำสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
25	LC	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบไม่เรียบ โคน้ำเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

## ตารางที่ 10 (ต่อ)

กลุ่มที่	แหล่งเก็บ <sup>2/</sup>	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา <sup>1/</sup>
26	LC	โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบหยาบเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านไม่ได้
27	R	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม นูน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
28	R	โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวหน้าเป็นรอยย่น ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้เล็กน้อย
29	SR	โคโลนีสีเหลืองเขียวอ่อน รูปกระสวย เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้เล็กน้อย
30	SR	โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน เจริญสูงจากผิวหน้าอาหาร แต่ส่วนของโคโลนีเรียบ ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

<sup>1/</sup> ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบโดยดูความแตกต่างของสีและลักษณะ โคโลนี

<sup>2/</sup> แหล่งที่เก็บ LC = ใบ SR = ดินบริเวณราก R = รากข้าวโพดหวาน

**ภาพที่ 8** ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณรากและรากข้าวโพดหวาน

ก = กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

ข = กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเหลืองเรืองแสง รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด

ค = กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยเชื้อรา รูปร่างไม่แน่นอน ขอบเป็นเส้นสายแบบเส้นใย แสงผ่านได้เล็กน้อย

ง = กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านได้เล็กน้อย

จ = กลุ่มที่ 5 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้บ้าง โปร่งแสงเล็กน้อย

ฉ = กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้ตลอด

ช = กลุ่มที่ 7 โคโลนีสีครีม เป็นเส้นหยาบแผ่ขยายคล้ายราก แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ แสงผ่านไม่ได้

ซ = กลุ่มที่ 8 โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้

ฅ = กลุ่มที่ 9 โคโลนีสีเหลืองอ่อน กลมมนูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบแสงไม่ผ่าน

ญ = กลุ่มที่ 10 โคโลนีสีชมพู รูปร่างกลมมนูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้

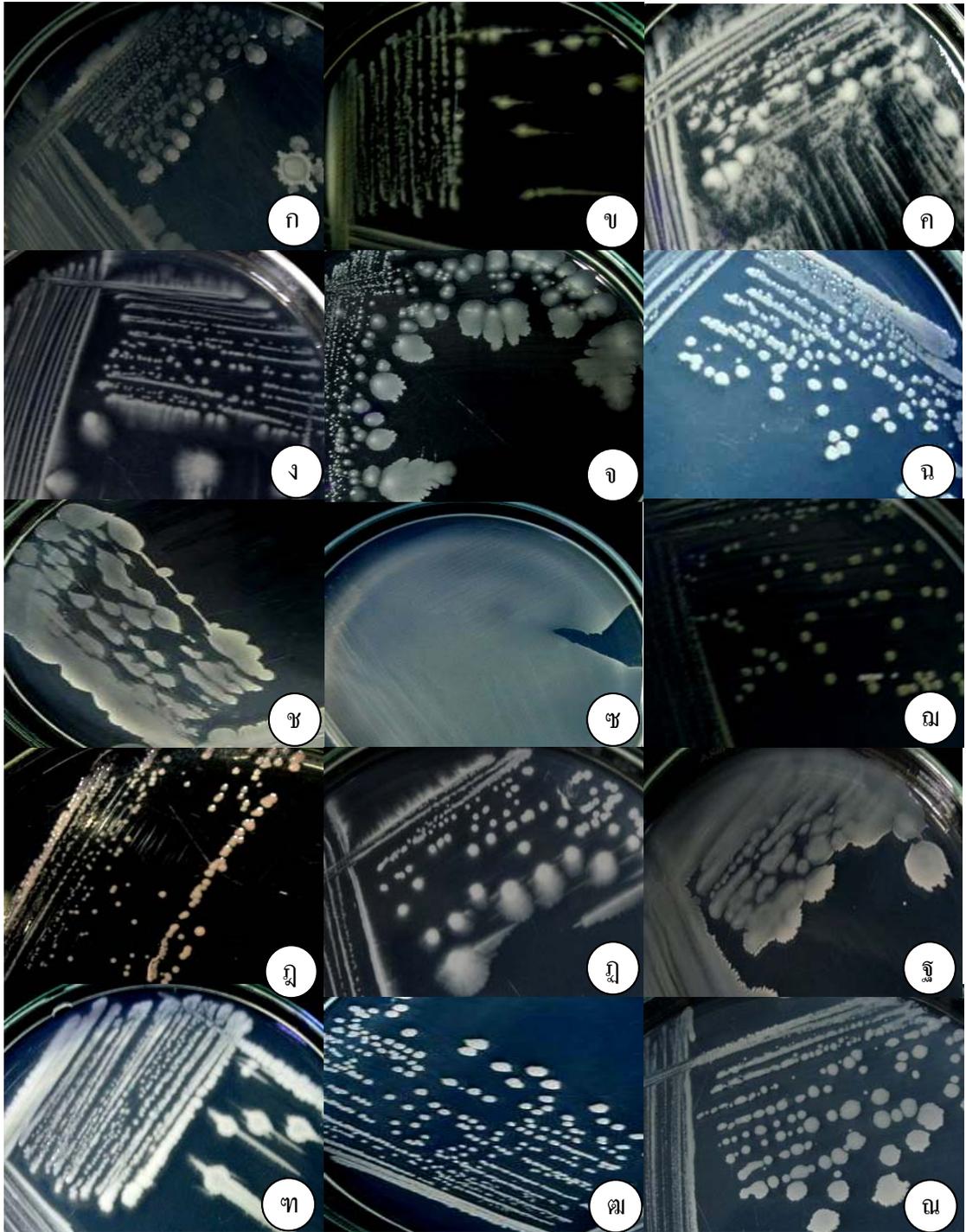
ฎ = กลุ่มที่ 11 โคโลนีสีขาว ขนาดเล็ก แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

ฏ = กลุ่มที่ 12 โคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด

ท = กลุ่มที่ 13 โคโลนีสีขาว รูปกระสวย แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

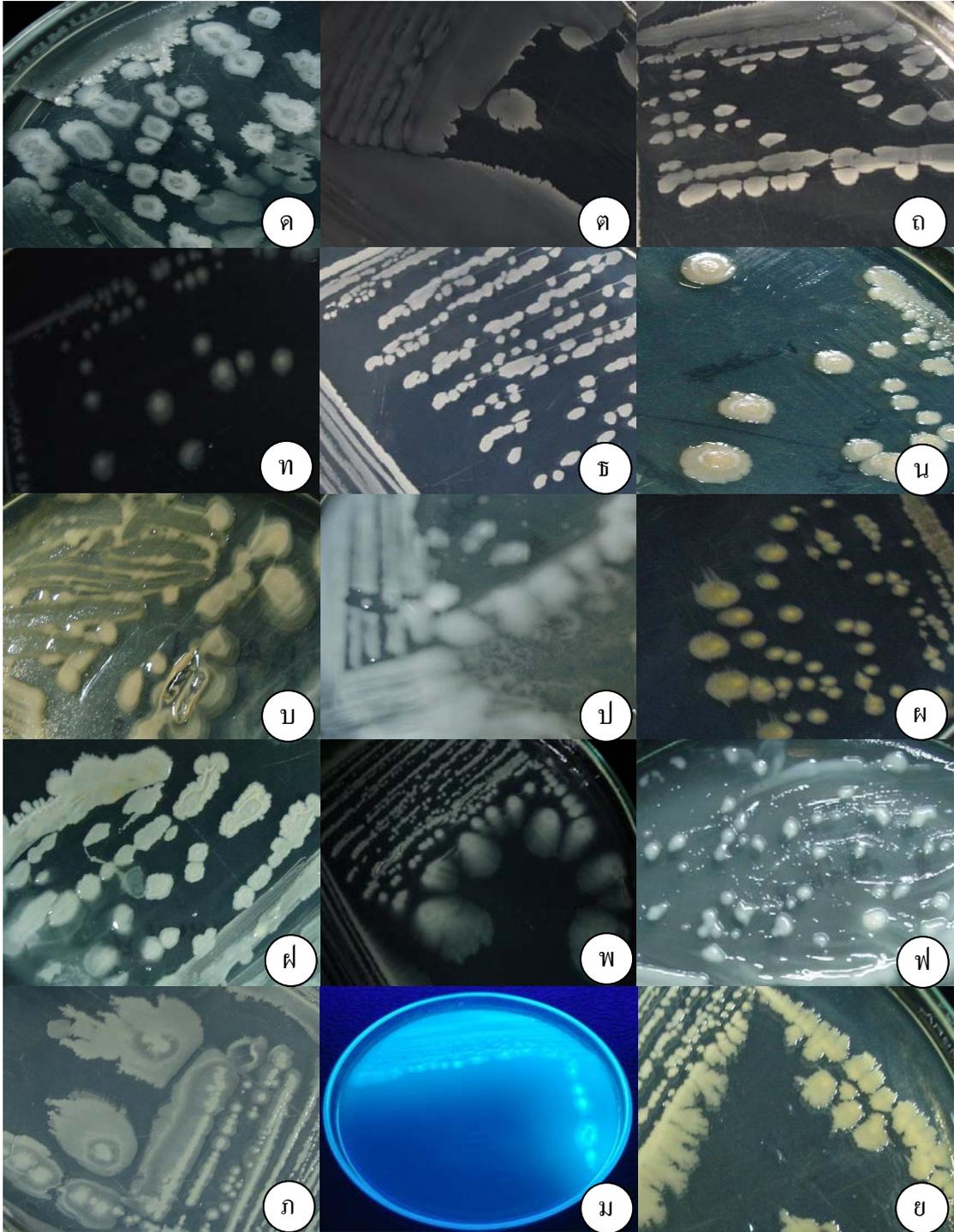
ฒ = กลุ่มที่ 14 โคโลนีสีครีม ขนาดเล็ก บุ่มตรงกลางผิวหน้าเป็นรอยย่น ขอบไม่เรียบ โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้

ณ = กลุ่มที่ 15 โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอนมนูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านได้เล็กน้อย



ภาพที่ 8 (ต่อ)

- ค = กลุ่มที่ 16 โคลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวขรุขระ ขอบหยัก แสงผ่านไม่ได้
- ค = กลุ่มที่ 17 โคลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
- ด = กลุ่มที่ 18 โคลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ขอบไม่เรียบ โคนี่เว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
- ท = กลุ่มที่ 19 โคลนีสีขาว รูปร่างกลม แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้ตลอด
- ช = กลุ่มที่ 20 โคลนีสีขาว รูปกระสวยเจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคนี่เรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
- น = กลุ่มที่ 21 โคลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมมน โคนี่สูงจากผิวหน้าอาหาร มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบไม่เรียบ โคนี่เว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
- บ = กลุ่มที่ 22 โคลนีสีน้ำตาลอ่อน รูปกระสวย เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคนี่เรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้เล็กน้อย
- ป = กลุ่มที่ 23 โคลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคนี่เรียบ ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
- ผ = กลุ่มที่ 24 โคลนีสีเหลืองตรงกลางเข้ม รูปร่างกลม มน โคนี่สูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
- ฝ = กลุ่มที่ 25 โคลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบไม่เรียบ โคนี่เว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านไม่ได้
- พ = กลุ่มที่ 26 โคลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ ขอบหยักเป็นฟันไม่สม่ำเสมอ แสงผ่านไม่ได้
- ฟ = กลุ่มที่ 27 โคลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน โคนี่สูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวเรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านไม่ได้
- ภ = กลุ่มที่ 28 โคลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวหน้าเป็นรอยย่น ขอบไม่เรียบ โคนี่เว้าเพียงเล็กน้อย แสงผ่านได้เล็กน้อย
- ม = กลุ่มที่ 29 โคลนีสีเหลืองเขียวอ่อน รูปกระสวย เจริญสูงจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนของโคนี่เรียบ ขอบเรียบ แสงผ่านได้เล็กน้อย
- ย = กลุ่มที่ 30 โคลนีสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน มน ขอบเรียบ แสงผ่านได้



## 7. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

### 7.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ด้วยวิธี dual culture และ cross-streak plate

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 512 สายพันธุ์ ที่แยกจากใบ ดินบริเวณรากและรากข้าวโพดหวานด้วยวิธี dual culture ยังเป็นวิธีที่นำมาตรวจสอบแบคทีเรียได้หลายกลไกและรวดเร็ว เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สายพันธุ์ Ech11 ในขั้นต้นพบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวนรวม 44 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ทั้งในลักษณะการเจริญแข่งขันกลุ่มทับเชื้อสาเหตุโรครวม 18 สายพันธุ์ โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกจากใบข้าวโพดหวาน 8 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PCL17 SCL12 LCL4 NCL40 RCL15 KCL10 KCL/10 และ KCL21 จากดินบริเวณรากข้าวโพดหวาน 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PCSR3 PCSR4 SCSR8 NCSR10 RCSR1 และ KCSR07 และจากรากข้าวโพดหวาน 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PCR6 RCR7 LCR7 และ KCR21 ตามลำดับ และกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้โดยรวม 26 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียจากใบข้าวโพดหวาน 11 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ NCL019 KCL02 KCL/3 KCL09 KCL10 RCL2 KCL20 NCL4 LCL14 SCL1 และ PCL18 จากดินบริเวณรากข้าวโพดหวาน 8 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KCSR/11 KCSR04 RCSR7 LCSR2 SCSR7 NCSR15 KCSR21 และ NCSR/2 และจากรากข้าวโพดหวาน 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KCR20 NCR25 LCR9 SCR3 NCR10 SCR26 และ NCR09 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) จึงนำเชื้อทั้ง 44 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพเชื้อด้วยวิธี paper disc diffusion ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 11 เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าวโพดหวานที่มีเนวมเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิบัตยัยการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สายพันธุ์ Ech11 ด้วยวิธี dual culture และ cross-streak plate

ส่วนของพืชที่แยกเชื้อ	สายพันธุ์เชื้อ	
	กลไกการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค	
	สร้างสารยับยั้งการเจริญ	เจริญแข่งขันคลุมทับ
ใบ	NCL019 KCL02 KCL/3 KCL09 KCL10 RCL2 KCL20 NCL4 LCL14 SCL1 และ PCL 18	PCL17 SCL12 LCL4 NCL40 RCL15 KCL10 KCL/10 และ KCL21
ดินบริเวณราก	KCSR/11 KCSR04 RCSR7 LCSR2 SCSR7 NCSR15 KCSR21 และ NCSR/2	PCSR3 PCSR4 SCSR8 NCSR10 RCSR1 และ KCSR07
ราก	KCR20 NCR25 LCR9 SCR3 NCR10 SCR26 และ NCR09	PCR6 RCR7 LCR7 และ KCR21
รวม	26	18

## 7.2 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าวโพดหวานทั้ง 44 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* (ตารางที่ 11) มาทดสอบยืนยันผลด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 23 สายพันธุ์ มีแนวโน้มในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) การเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* สายพันธุ์ Ech11 ได้ (ตารางที่ 12) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR20 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคได้บริเวณกว้างมากที่สุดคือ 12.9 มิลลิเมตร รองลงมาคือสายพันธุ์ KCL10 และ LCR9 ที่มีบริเวณยับยั้งกว้างเท่ากับ 7.5 และ 6.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ และอีก 21 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรคเป้าหมายในลักษณะการแข่งขัน โดยพบว่าสายพันธุ์ KCR21 สามารถเจริญคลุมทับร่วมกับการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งรอบโคโลนีกว้างเท่ากับ 3 เซนติเมตร และ สายพันธุ์ PCL17 ที่มีการเจริญคลุมทับร่วมกับการผลิตสารยับยั้ง และมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 3 เซนติเมตร (ตารางที่ 12) จึงนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 5 สายพันธุ์ มาทดสอบในระดับเรือนทดลองและระดับไร่ต่อไป

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และราก  
ข้าวโพดหวานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zea* สายพันธุ์  
Ech11 สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย ด้วยวิธี dual culture และ paper disc diffusion

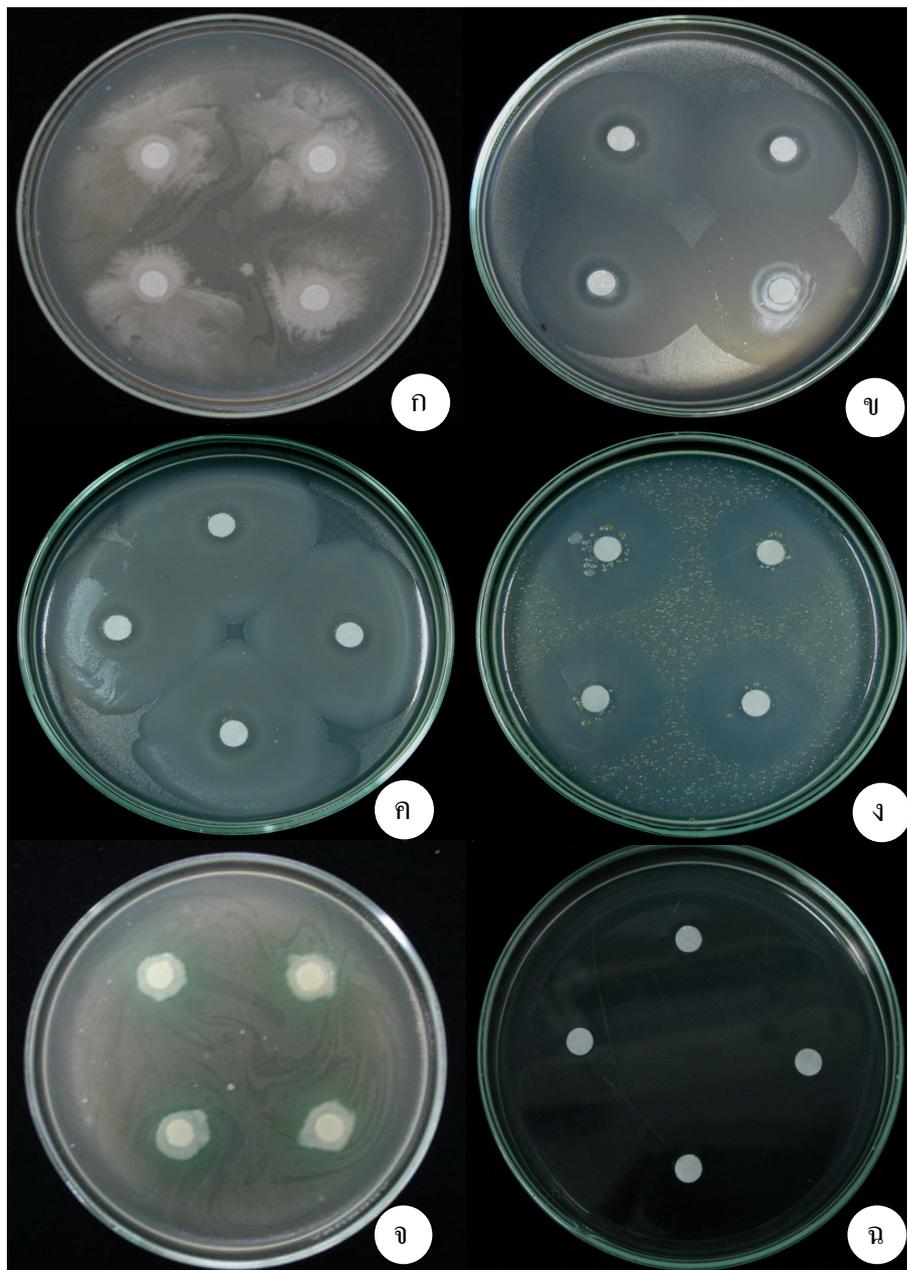
สายพันธุ์เชื้อ แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) <sup>1/</sup>			
	แหล่งที่มา <sup>2/</sup>	ความกว้างของบริเวณ ยับยั้งรอบโคโลนี	ความกว้างของ โคโลนี	บริเวณยับยั้ง (clear zone)
LCR9	R	29.2	16.7	6.2
NCL019	CL	17.0	5.2	5.8
KCL10	CL	28.5	13.5	7.5
KCR20	R	37.5	11.7	12.9
PCL18	CL	26.5	22.2	2.2
SCL1	CL	16.8	10.1	3.4
KCL02	CL	19.8	11.3	4.3
LCL14	CL	17.5	9.5	4.0
KCL/3	CL	13.7	5.5	4.1
KCL09	CL	19.5	9.8	4.8
KCL10	CL	20.5	10.1	5.2
NCL4	CL	20.1	12.4	3.9
RCL2	CL	15.3	12.8	1.3
KCL20	CL	16.8	10.1	3.4
KCSR/11	SR	17.3	10.0	3.7
KCSR04	SR	11.7	16.5	2.4
LCSR2	SR	10.8	13.7	1.4
SCSR7	SR	6.8	10.5	1.9
NCSR15	SR	12.5	16.6	2.0
KCSR21	SR	11.2	13.7	1.2
NCSR/2	SR	16.8	11.4	2.7
RCSR7	SR	15.3	12.8	1.3
KCR20	R	10.6	13.0	1.2

## ตารางที่ 12 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) <sup>1/</sup>			
	แหล่งที่มา <sup>2/</sup>	ความกว้างของบริเวณ ยับยั้งรอบโคโลนี	ความกว้างของ โคโลนี	บริเวณยับยั้ง (clear zone)
NCR10	R	10.5	12.0	0.8
SCR26	R	6.8	8.9	1.0
NCR09	R	6.4	9.8	1.6
NCR25	R	13.0	15.9	1.4
LCR9	R	14.6	17.5	1.4
SCR3	R	11.0	14.8	1.8

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยที่ได้จาก 4 ซ้ำของ 3 การทดลอง คำนวณได้จากสมการ  
 บริเวณยับยั้ง =  $\frac{\text{ความกว้างของบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของโคโลนี}}{2}$

<sup>2/</sup> ส่วนที่แยกเชื้อแบคทีเรีย CL = ใบข้าวโพด SR = ดินบริเวณรากข้าวโพด และ R = รากข้าวโพด



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์คุณภาพในการเจริญแข่งขันและการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zaea* สายพันธุ์ Ech11 ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion (ก = สายพันธุ์ PCL17 ข = สายพันธุ์ KCL10 ค = สายพันธุ์ KCR21 ง = สายพันธุ์ KCR20 จ = สายพันธุ์ LCR9 และ ฉ = Control)

## 8. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโพดหวาน ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าวโพดหวาน มาทดสอบผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพดหวาน โดยการคลุกเมล็ดด้วย suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกทั้งหมด 512 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม ตามศักยภาพและปฏิกิริยาต่อการส่งเสริมการงอกและความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวโพดหวาน ได้แก่ กลุ่ม 1 แบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่ส่งเสริมการงอกและความแข็งแรงต่อต้นกล้า 168 สายพันธุ์ กลุ่ม 2 พวกที่ไม่มีผลต่อความงอกและไม่ทำลายเมล็ด 287 สายพันธุ์ และกลุ่ม 3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและเป็นอันตรายต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า 57 สายพันธุ์ (ตารางที่ 13) ซึ่งให้ผลแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทน suspension ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบกับอัตราความงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงต้นกล้า พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 คือ แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส่งเสริมความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวราก และความสูงต้น เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ 10 และ 7 เซนติเมตร ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 คือ พวกที่ไม่มีผลต่อความงอกและไม่ทำลายเมล็ด มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวราก และความสูงต้น เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ 8.3 และ 6.2 เซนติเมตร ตามลำดับ กลุ่ม 3 คือ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่เป็นอันตรายต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวราก และความสูงต้น เท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ 5.12 และ 5.78 เซนติเมตร ตามลำดับ

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่ส่งเสริมการงอกและความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวโพด พบว่าเมื่อสุ่มเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 สายพันธุ์ จากโคโลนีที่ต่างกันมาทดสอบ ประสิทธิภาพยืนยันผลอีกครั้ง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ KCR20 KCR21 LCR9 PCL17 และ KCL10 แสดงศักยภาพในการกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวโพดหวาน ในระดับห้องปฏิบัติการดีที่สุด

**ตารางที่ 13** ผลของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากใบ ดินบริเวณราก และรากข้าวโพดที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ที่มีต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพดหวานจากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1/</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
PCL	PCL2 PCL4 PCL6 PCL7 PCL12 PCL13 PCL17 PCL19 PCL21 PCL23 PCL25	PCL3 PCL5 PCL8 PCL9 PCL11 PCL14 PCL15 PCL16 PCL18 PCL20 PCL22 PCL24	PCL1 PCL10
PCSR	PCSR1PCSR4 PCSR5 PCSR10 PCSR12 PCSR14 PCSR17	PCSR2 PCSR3 PCSR6 PCSR7 PCSR8 PCSR9 PCSR11 PCSR13	PCSR15 PCSR16
PCR	PCR4 PCR6	PCR1 PCR2 PCR3 PCR5	-
SCL	SCL2 SCL3 SCL5 SCL4 SCL7 SCL12 SCL14	SCL1 SCL6 SCL8 SCL9 SCL10 SCL11 SCL13 SCL15	-
SCSR	SCSR4 SCSR6 SCSR8 SCSR9 SCSR10	SCSR1 SCSR2 SCSR3 SCSR5 SCSR7	-
LCL	LCL4 LCL7 LCL8 LCL12 LCL13 LCL20 LCL21	LCL1 LCL2 LCL3 LCL5 LCL6 LCL9 LCL11 LCL14 LCL15 LCL17 LCL18 LCL19 LCL23	LCL10 LCL16 LCL22

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1/</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
LCSR	LCSR3 LCSR4	LCSR1 LCSR2 LCSR5 LCSR6 LCSR7	-
LCR	LCR5 LCR8 LCR9 LCR10	LCR1 LCR3 LCR4 LCR6 LCR7	LCR2
NCL	NCL3 NCL5 NCL6 NCL7 NCL10 NCL16 NCL18 NCL20 NCL22 NCL27 NCL35 NCL37 NCL38 NCL39 NCL40 NCL45	NCL1 NCL2 NCL4 NCL8 NCL9 NCL11 NCL12 NCL13 NCL14 NCL15 NCL19 NCL21 NCL23 NCL24 NCL25 NCL26 NCL28 NCL29 NCL32 NCL34	NCL16 NCL17 NCL30 NCL31 NCL33 NCL41 NCL42 NCL43 NCL44
NCSR	NCSR9 NCSR12 NCSR15 NCSR17 NCSR18 NCSR20 NCSR21	NCSR1 NCSR2 NCSR3 NCSR4 NCSR5 NCSR6 NCSR7 NCSR8 NCSR10 NCSR11 NCSR14 NCSR16 NCSR 19	NCSR13 NCSR22 NCSR23 NCSR24
NCR	NCR7 NCR9 NCR10 NCR15 NCR20 NCR22 NCR23 NCR25	NCR2 NCR3 NCR4 NCR5 NCR6 NCR8 NCR11 NCR12 NCR13 NCR14 NCR16 NCR17 NCR19 NCR21 NCR24	NCR1 NCR18 NCR26

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1/</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
NCL0	NCL04 NCL09 NCL016	NCL01 NCL02 NCL03	NCL010
	NCL018 NCL019	NCL05 NCL06 NCL07	NCL017
	NCL022 NCL023	NCL08 NCL011 NCL012	NCL020
	NCL024 NCL027	NCL013 NCL014 NCL015	NCL028
	NCL030 NCL034	NCL021 NCL025 NCL026	
	NCL036	NCL029 NCL031 NCL032 NCL033 NCL035	
NCSR0	NCSR07 NCSR09	NCSR01 NCSR02	NCSR012
	NCSR015 NCSR017	NCSR03 NCSR04	NCSR021
	NCSR019 NCSR020	NCSR05 NCSR06 NCSR08 NCSR10 NCSR011 NCSR013 NCSR014 NCSR016 NCSR018	
NCR0	NCR03 NCR09 NCR010	NCR01 NCR04 NCR05	NCR02 NCR019
	NCR014 NCR024	NCR06 NCR07 NCR08	NCR029
	NCR028 NCR030	NCR011 NCR012	
	NCR032	NCR013 NCR015 NCR016 NCR017 NCR018 NCR020 NCR021 NCR022 NCR023 NCR025 NCR026 NCR027	

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1/</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
		NCR031 NCR033	
RCL	RCL11 RCL16 RCL17 RCL18	RCL1 RCL2 RCL3 RCL4 RCL5 RCL6 RCL7 RCL8 RCL9 RCL12 RCL13 RCL14	RCL10 RCL9 RCL15
RCSR	RCSR1 RCSR2 RCSR3 RCSR11 RCSR13	RCSR4 RCSR5 RCSR6 RCSR7 RCSR8 RCSR9 RCSR12 RCSR14	RCSR10
RCR	RCR4 RCR5 RCR6	RCR1 RCR2 RCR3 RCR7 RCR8 RCR9 RCR10 RCR11 RCR12	-
KCL	KCL6 KCL12 KCL17 KCL20 KCL21 KCL22 KCL27 KCL29 KCL30 KCL34	KCL1 KCL2 KCL3 KCL4 KCL5 KCL7 KCL8 KCL9 KCL10 KCL11 KCL13 KCL14 KCL15 KCL16 KCL18 KCL19 KCL23 KCL24 KCL25 KCL26 KCL31 KCL32 KCL33	KCL28 KCL35
KCSR	KCSR4 KCSR16 KCSR21	KCSR1 KCSR2 KCSR3 KCSR5 KCSR6 KCSR7	KCSR9 KCSR10

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1/</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
		KCSR8 KCSR11 KCSR12 KCSR13 KCSR14 KCSR15 KCSR17 KCSR18 KCSR19 KCSR20	
KCR	KCR2 KCR4 KCR12 KCR13 KCR14 KCR16 KCR17 KCR21 KCR28 KCR31	KCR1 KCR3 KCR5 KCR6 KCR7 KCR8 KCR9 KCR10 KCR11 KCR18 KCR19 KCR20 KCR22 KCR23 KCR24 KCR25 KCR26 KCR27	KCR15 KCR29 KCR30
KCL0	KCL02 KCL06 KCL08 KCL017 KCL018	KCL01 KCL03 KCL04 KCL05 KCL09 KCL010 KCL011 KCL012 KCL013 KCL014 KCL015 KCL016	KCL07
KCSR0	KCSR03 KCSR07 KCSR014 KCSR016 KCSR017 KCSR019	KCSR01 KCSR02 KCSR04 KCSR05 KCSR06 KCSR08 KCSR09 KCSR10 KCSR11 KCSR12 KCSR13 KCSR15 KCSR18	KCSR020

## ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งที่มาของ เชื้อแบคทีเรีย <sup>1</sup>	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย		
	ผลต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
KCR0	KCR04 KCR010 KCR012 KCR013	KCR01 KCR02 KCR03 KCR05 KCR06 KCR07 KCR08 KCR09 KCR011 KCR014 KCR015	-
KCL/	KCL/3 KCL/7 KCL/12 KCL/13 KCL/14 KCL/15	KCL/1 KCL/2 KCL/4 KCL/5 KCL/6 KCL/8 KCL/9 KCL/10 KCL/11 KCL/16 KCL/17 KCL/19	KCL/18
KCSR/	KCSR/2 KCSR/11	KCSR/1 KCSR/3 KCSR/4 KCSR/5 KCSR/6 KCSR/7	KCSR/8 KCSR/9 KCSR/10
KCR/	KCR/9 KCR/10 KCR/11 KCR/15 KCR/16 KCR/22 KCR/24 KCR/27	KCR/1 KCR/2 KCR/4 KCR/5 KCR/6 KCR/8 KCR/12 KCR/13 KCR/17 KCR/18 KCR/19 KCR/20	KCR/3 KCR/7 KCR/21 KCR/14 KCR/23 KCR/25 KCR/26

<sup>1/</sup> แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียตามพื้นที่เก็บตัวอย่างและส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดหวาน โดย K = กาญจนบุรี N = นครราชสีมา P = เพชรบูรณ์ R = ราชบุรี และ L= ใบ SR = ดินบริเวณราก R = ราก

<sup>2/</sup> ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่ส่งเสริมความงอกและความแข็งแรงต่อต้นกล้า กลุ่มที่ 2 พวกที่ไม่มีผลต่อความงอกและไม่ทำลายเมล็ด และ กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและเป็นอันตรายต่อความงอกและความแข็งแรง

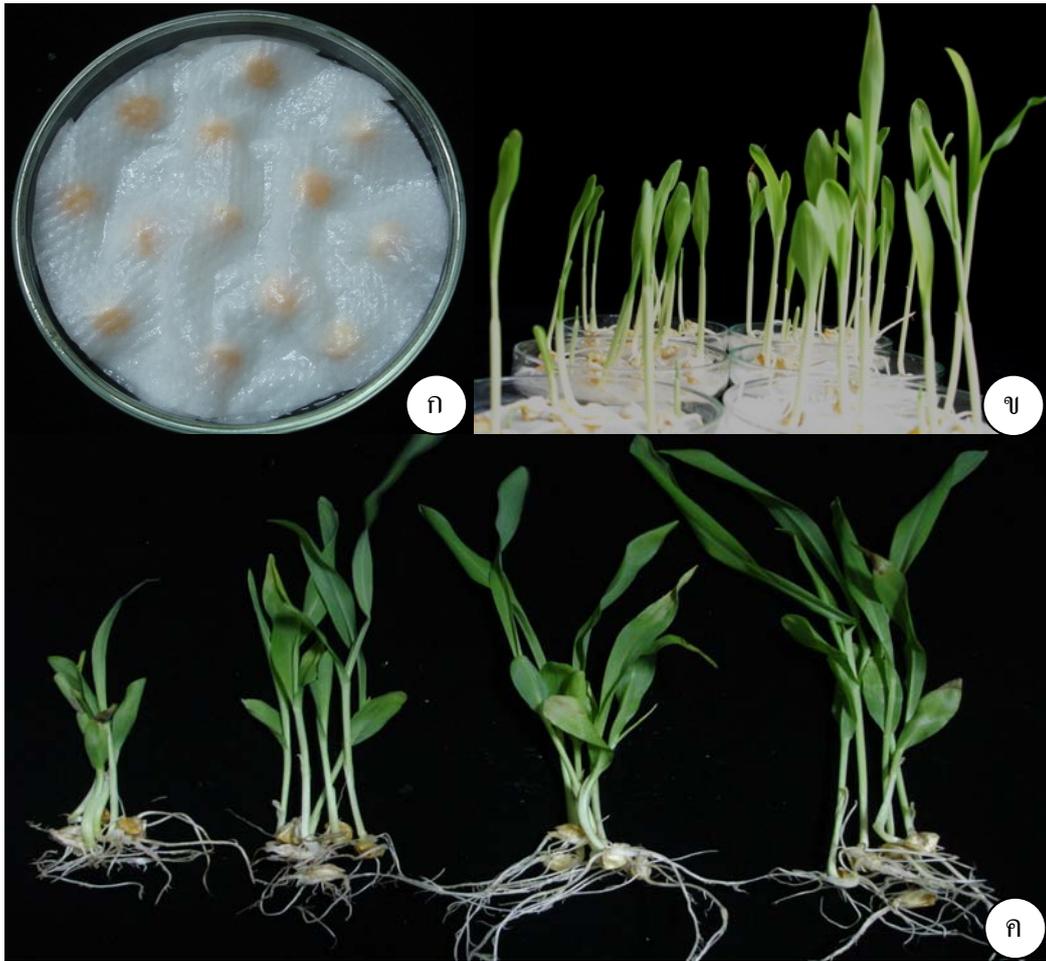
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 5 สายพันธุ์ มาคลุกเมล็ดด้วย suspension เชื้อแบคทีเรีย ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพด ทั้งในลักษณะของการส่งเสริมการงอกของเมล็ด และส่งเสริมการเจริญของระบบรากและลำต้น ซึ่งเชื้อโดยแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 5 สายพันธุ์ มี แนวโน้มเป็น PGPR ทั้งส่งเสริมความยาวราก และความสูงต้นของข้าวโพดสูงสุด จากใบ 2 สายพันธุ์ (PCL17 และ KCL10) และจากราก 3 สายพันธุ์ (KCR21 KCR20 และ LCR9) พบว่า เชื้อสายพันธุ์ KCR21 มีศักยภาพสูงสุดในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดข้าวโพดทดสอบสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวรากและลำต้นหลังงอกที่ 7 วัน เฉลี่ย 12 และ 7 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือสายพันธุ์ KCR20 และ KCL10 ที่มีความยาวรากและลำต้นเฉลี่ยเท่ากับ 9.5 6.5 และ 8.5 6.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการคลุกเมล็ดมีระดับการงอกของเมล็ดเท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวราก และลำต้นเฉลี่ย 7.0 และ 4.5 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 9)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของ PGPR ที่ส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน ภายใต้ห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการคลุกเมล็ด

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย	ลักษณะทดสอบ <sup>1/</sup>		
	ความงอก (%)	ความยาวราก (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
LCR9	100 ab	9.5 b	6.0 ab
NCL3	90 ab	8.5 b	7.0 a
KCL10	100 a	8.0 bc	6.5 ab
NCR8	90 ab	7.2 c	6.0 ab
KCR20	100 a	9.5 b	6.5 ab
PCR19	90 ab	9.4 b	5.5 b
KCR21	100 a	12 a	7.0 a
LCL15	90 ab	8.4 b	6.1 ab
PCL17	90 ab	7.0 c	6.0 ab
RCR6	90 ab	8.0 bc	6.0 ab
Control <sup>2/</sup>	78 c	7.0 c	4.5 c

<sup>1/</sup> ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Rang Test

<sup>2/</sup> กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อคลุกเมล็ดข้าวโพดแทน suspension ของแบคทีเรีย



ภาพที่ 10 ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวโพดหวาน ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้สายพันธุ์ KCR20 PCL17 KCR21 เทียบกับน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (control)

## 9. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทานโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพเรือนปลูกทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ KCL10 PCL17 LCR9 KCR20 และ KCR21 ที่แยกจากส่วนใบและรากข้าวโพดหวาน ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zoeae* สายพันธุ์ Ech11 ในสภาพเรือนทดลองด้วยการคลุกก่อนปลูก คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบ และการพ่นใบเพียงอย่างเดียว พบว่าทุกกรรมวิธีที่สามารถควบคุมและลดอัตราการเกิดโรคและ/หรือระดับความรุนแรงของโรคได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมโรค ทั้งนี้จากการทดลอง พบว่าการควบคุมโรคด้วยการคลุกเมล็ดข้าวโพดหวานด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ LCR9 KCL10 PCL17 KCR20 และ KCR21 ก่อนปลูกร่วมกับการพ่น suspension เชื้อสายพันธุ์เดิม เมื่อข้าวโพดหวานอายุ 14 วัน สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการคลุกเมล็ดอย่างเดียวและ/หรือการพ่น suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์เพียงอย่างเดียว การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่น suspension เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรค สามารถลดอัตราของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่าง ( $P \leq 0.05$ ) กับการใช้ copper hydroxide ที่ลดความรุนแรงของโรคได้ 70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ KCR20 PCL17 KCL10 และ LCR9 ที่ยับยั้งโรคได้ 67 40 36 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิภักษ์ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพเรือน  
ทดลอง <sup>1/</sup>

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย <sup>2/</sup>	วิธีการใช้ <sup>3/</sup>	อัตราการเกิดโรค(%)	อัตราการลดการเกิดโรค (%)
LCR9	Sb	66	34
	Sb+FS	44	56
	FS	56	44
KCL10	Sb	64	36
	Sb+FS	54	46
	FS	58	42
KCR20	Sb	54	46
	Sb+FS	33	67
	FS	59	41
KCR21	Sb	45	55
	Sb+FS	25	75
	FS	56	44
PCL17	Sb	49	51
	Sb+FS	29	71
	FS	58	42
KPS46	Sb	52	48
	Sb+FS	40	60
	FS	61	39
Copper hydroxide	Sb+FS	46	54
Positive control	-	100	0
Negative control	-	0	0

<sup>1/</sup>ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย SPSS version 10.5 ( $P \leq 0.05$ )

<sup>2/</sup>สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย = KCL10 PCL17 LCR9 KCR20 และ KCR21

<sup>3/</sup>วิธีการใช้ Sb = คลุกเมล็ดอย่างเดียว Sb+FS = คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่น และ FS = พ่นอย่างเดียว

## 10. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการกระตุ้นความต้านทานโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานในสภาพไร่

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะคุณภาพ 2 สายพันธุ์ คือ KCR21 และ PCL17 ที่แยกได้จากราก และ ใบของต้นข้าวโพดหวานและผ่านการคัดเลือก จากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลองแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน มาทดสอบต่อเนื่องในการลดความรุนแรงโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพไร่ ด้วยการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KCR21 สามารถลดความรุนแรงโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ดีที่สุด สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เท่ากับ 79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการคลุกเมล็ดและพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมโรคที่เกิดโรครุนแรง 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลแตกต่างกับกรรมวิธีการอื่น ๆ รวมถึงกรรมวิธีเปรียบเทียบที่คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 และกรรมวิธีควบคุมโดยใช้สารเคมี (copper hydroxide) ที่ลดความรุนแรงของโรคได้เท่ากับ 71 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ PCL17 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการใช้สารเคมีควบคุมโรค

นอกจากนี้พบว่ากรรมวิธีที่คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PCL17 ให้ผลผลิตสูงสุด โดยมีน้ำหนักทั้งเปลือกรวม 2,368 กิโลกรัม/ไร่ (ผลผลิตทั้งเปลือก = น้ำหนักฝักดี+น้ำหนักฝักเสีย) มีน้ำหนักฝักดีและฝักเสียหลังปอกเปลือก เท่ากับ 1,284 และ 423 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ความหวานเท่ากับ 15 บริกซ์ ซึ่งไม่แตกต่างกับกรรมวิธีอื่น ๆ ในขณะที่กรรมวิธีคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 มีผลผลิตทั้งเปลือกรวม 2,091 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PCL17 แต่มีน้ำหนักฝักดีสูงกว่ากรรมวิธีดังกล่าว 92 กิโลกรัม/ไร่ และมีน้ำหนักฝักเสียน้อยกว่าถึง 412 กิโลกรัม/ไร่ และมีเปอร์เซ็นต์ความหวาน 16.2 บริกซ์ ส่งผลให้กรรมวิธีดังกล่าวมีผลผลิตพร้อมขายสูงที่สุด สอดคล้องกับความรุนแรงโรคที่ได้กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 สายพันธุ์ มีกลไกที่แตกต่างกันในการส่งเสริมการเจริญเติบโตเพิ่มพูนคุณภาพและปริมาณผลผลิต และการควบคุมโรคโดยสายพันธุ์ KCR21 มีความโดดเด่นในด้านการควบคุมโรคและส่งเสริมด้านคุณภาพผลผลิต ในขณะที่สายพันธุ์ PCL17 มีศักยภาพในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตดีกว่าแต่ KCR21 แต่ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำกว่า ซึ่งการเกิดโรครุนแรงกว่าจะ

ส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพผลผลิต ถึงแม้ว่ากรรมวิธีดังกล่าวจะให้ปริมาณน้ำหนักรวมฝักดี  
ดังนั้นการปรับใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ร่วมกันจึงจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะส่งเสริมให้เกิด  
ประสิทธิภาพสูงสุดในระบบการผลิตข้าวโพดหวาน

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการลดการเกิดและความรุนแรงของโรคลำต้นเน่า  
แบคทีเรียในสภาพไร่<sup>1/</sup>

ลำดับที่	กรรมวิธี <sup>2/</sup>	ความรุนแรงโรค (%)	การลดความรุนแรง (%)
1	Sb bacterial strain KPS46	41e	59e
2	Sb bacterial strain KCR21	41e	59e
3	Sb bacterial strain PCL17	62g	38g
4	FS bacterial strain KPS46	35d	65d
5	FS bacterial strain KCR21	32c	68c
6	FS bacterial strain PCL17	53f	47f
7	Sb+FS bacterial strain KPS46	29b	71b
8	Sb+FS bacterial strain KCR21	21a	79a
9	Sb+FS bacterial strain PCL17	41e	59e
10	Copper hydroxide	52f	48f
11	Control negative	100h	0h

<sup>1/</sup>ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันสถิติ วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 10.07 ( $P \leq 0.05$ )

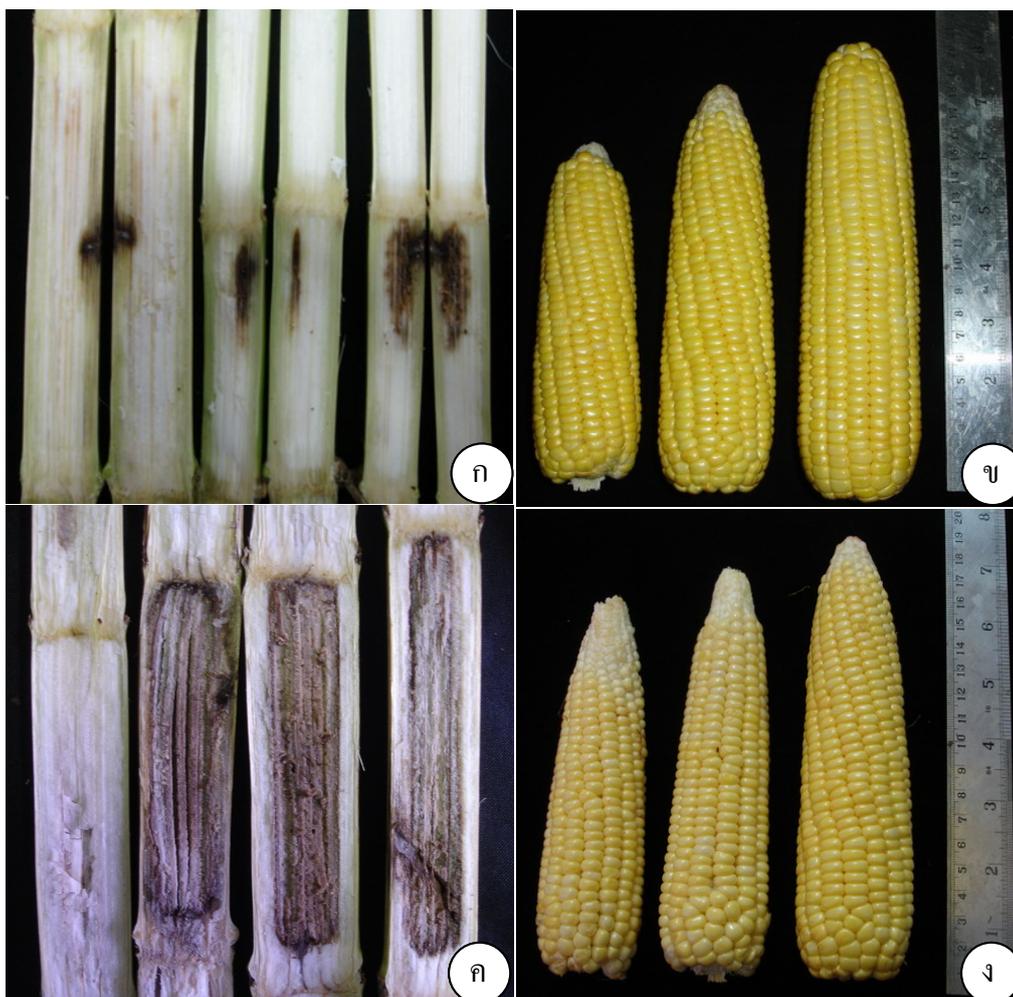
<sup>2/</sup>กรรมวิธี Sb = คลุกเมล็ดอย่างเดียว Sb+FS = คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่น และ FS = พ่นอย่างเดียว

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการส่งเสริมและเพิ่มปริมาณผลผลิตข้าวโพดหวาน  
ในสภาพไร่<sup>1/</sup>

กรรมวิธี	น้ำหนักผลผลิต (กก./ไร่)				ความหวาน (%)
	นน. ทั้งเปลือก	นน. ปอกเปลือก	นน. ฝักดี	นน. ฝักเสีย	
1	1835de	1237cd	1038c	199f	15b
2	1621fg	1103d	1042c	61c	15b
3	1657fg	1124d	1102c	21a	15b
4	1508g	1468b	1351a	117d	15b
5	1707ef	1106d	1070c	36b	16a
6	2368a	1707a	1284b	423	15b
7	2219ab	1383b	1265b	117d	15b
8	2091bc	1387c	1376a	11a	16.2a
9	1323h	850e	647d	203f	15b
10	1998cd	1259cd	1113c	146e	15.4b
11	2041c	1430b	1060c	370g	15b

<sup>1/</sup>ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันสถิติ วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 10.07 ( $P \leq 0.05$ )

<sup>2/</sup>กรรมวิธี Sb = คลุกเมล็ดอย่างเดียว Sb+FS = คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่น และ FS = พ่นอย่างเดียว



**ภาพที่ 11** ระดับความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียบนต้นข้าวโพดหวานที่ผ่านการคลุกเมล็ดก่อนปลูกร่วมกับการพ่น 3 ครั้ง ด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KCR21 (ก) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะที่แสดงอาการโรครุนแรง (ค) และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดหวาน (ขนาดและความสมบูรณ์ฝัก) จากต้นข้าวโพดหวานที่มีการใช้แบคทีเรีย KCR21 (ข) และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ (ง)

## 11. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี บางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานและยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zear* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียสูงสุด 2 สายพันธุ์ คือ KCR21 และ PCL17 บนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ KCR21 มีลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ขอบไม่เรียบโค้งเว้าเล็กน้อย ส่วนสายพันธุ์ PCL17 มีลักษณะโคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวขรุขระ เมื่อนำไปศึกษาคูณสมบัติการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์โดยการทดสอบ Gram's stain และย้อมสี methylene blue ผลปรากฏว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากติดสีม่วงของ methylene blue และเชื่อดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีแบบท่อนตรง

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ PCL17 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจน เจริญในอาหาร NGB ที่ผสม NaCl 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ สร้างเอนไซม์แคตะเลส สามารถรีดิวส์ไนเตรท ย่อยเจลาติน ไม่สร้างอินโดล สามารถทำปฏิกิริยาและผลิตรวดเมื่อเลี้ยงในน้ำตาล maltose sucrose และ manital ส่วนสายพันธุ์ KCR21 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพมีออกซิเจน สร้างเอนไซม์แคตะเลส ได้ สามารถเจริญในอาหาร NGB ที่ผสม NaCl 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท ย่อยเจลาตินได้ ไม่สร้างอินโดล สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาล lactose maltose sucrose และ sorbitol ได้

การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ บนใบยาสูบ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันหลังทำการทดสอบ 24-48 ชั่วโมง เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ศึกษาและเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. (Holt et al., 1994) ผลปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 มีคุณสมบัติสอดคล้องกับ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

ตารางที่ 18 คุณสมบัติทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แกรมบวก<sup>1/</sup>

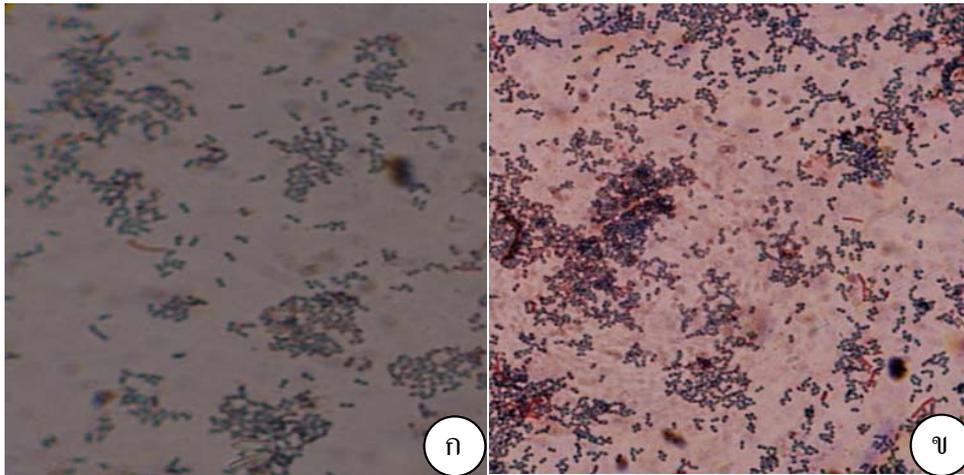
ลักษณะทดสอบ	สายพันธุ์แบคทีเรีย			
	PCL17	KCR21	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Gram reaction	Positive	Positive	Positive	Positive
Oxygen relationship	aerobe	aerobe	aerobe	aerobe
Endospore forming	+	+	+	+
Catalase production	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
Potato soft rot	-	d	d	-
Oxidase test	+			+
Nitrate reduction	+			+
Indole production	-	+	+	-
Salt Tolerance				
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
Acid production				
Lactose	-	+	+	-
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	+			+
Sorbital		+	+	
Sucrose	+	+	+	+

<sup>1/</sup> การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

ปฏิกิริยา : + = Gram positive คือ เกิดปฏิกิริยา

- = Gram negative คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

ND = ไม่ทดสอบ



ภาพที่ 12 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ในการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PCL17 (ก) และแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21(ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

## วิจารณ์

โรคลำต้นของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. chrysanthemi* pv. *zear* นับเป็นโรคแบคทีเรียที่สำคัญโรคหนึ่งของข้าวโพด และมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมพืช ระบบการปลูก พัฒนาการและการปรับตัวของเชื้อสาเหตุ ตลอดจนปัญหาสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของเชื้อสาเหตุ และความอ่อนแอของข้าวโพดหวาน โรคนี้ถือเป็นโรคที่ควบคุมยากเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรค คือ *E. chrysanthemi* pv. *zear* สามารถผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์พืชอาศัยโดยตรง ทำให้ต้นข้าวโพดหวานที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเกิดความเสียหายและหากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะทำให้เกิดการระบาดอย่างกว้างขวางเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคอาศัยอยู่ในดินและแพร่กระจายผ่านทางระบบการให้น้ำ หรือ ฝน การศึกษาถึงชีววิทยาของเชื้อ เช่น การเข้าทำลายของพืชอาศัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และความต้านทานของพืชอาศัย ถือเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการจัดการ/ควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย จากพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวานที่แตกต่างกัน และนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค พร้อมทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรค การทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนข้าวโพดหวานทดสอบพันธุ์อินทรี 2 และการจำแนกชนิดด้วยวิธีพื้นฐานและขั้นสูง แสดงให้เห็นว่ามีการระบาดของโรคดังกล่าวในสภาพแปลงปลูกคือ จังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา ราชบุรี เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี โดยเฉพาะในตัวอย่งข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสม ยังมีรายงานว่าข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคต่าง ๆ รวมทั้งโรคลำต้นเน่าด้วย

ทั้งนี้จากจำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุแล้ว ผลการสำรวจและการวิเคราะห์การระบาดในพื้นที่ปลูก พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ สภาพพื้นที่ และภูมิอากาศในพื้นที่ปลูก ตลอดจนพันธุ์ที่ใช้ปลูก จากการสำรวจ พบว่าในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี มีการระบาดของโรคลำต้นเน่ารุนแรงที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะกลุ่มข้าวโพดหวาน ซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมข้างต้นดังกล่าว พบว่าในช่วงการสำรวจพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค คือ มีปริมาณฝนตกติดต่อกันและมีช่วงอุณหภูมิสูงติดต่อกัน (ตารางภาคผนวก) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเหมาะต่อการระบาดของโรค รวมทั้งพื้นที่

ดังกล่าวมีการปลูกข้าวโพดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจทำให้มีการสะสมของเชื้อสาเหตุโรคในดิน เมื่อปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอและมีสภาพอากาศเหมาะสมจึงทำให้เกิดโรครุนแรง ในขณะที่พื้นที่ปลูกจังหวัดราชบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระบุรี และลพบุรี มีการระบาดน้อยกว่า คือ 25 20 20 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแต่ละพื้นที่มีปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิต่ำกว่ายังส่งผลโดยตรงต่อการเกิดและการระบาดของโรคในแต่ละพื้นที่ แต่อย่างไรก็ตามในทุกพื้นที่ พบว่าพันธุ์ข้าวโพดเป็นปัจจัยส่งเสริมต่อความรุนแรงของโรคซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช หนาแน่น สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรครุนแรง หากมีการจัดการหรือควบคุมปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งก็สามารถลดการเกิดโรคพบว่ามีความแตกต่างกันในการเข้าทำลายพืชทดสอบ ซึ่งเชื่อดังกล่าวมีศักยภาพในการชักนำให้ต้นข้าวโพดหวานเกิดอาการเน่าที่ระดับต่างกัน เมื่อทำการทดลองในสภาพแวดล้อมและปัจจัยเดียวกัน (พันธุ์ อายุ วิธีการปลูกเชื้อ) เชื้อบางสายพันธุ์ที่แยกจากต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรครุนแรงในสภาพไร่ แต่แสดงอาการเพียงเล็กน้อยในสภาพควบคุมเรือนทดลอง ในขณะที่บางสายพันธุ์ที่แยกจากต้นข้าวโพดหวานที่แสดงอาการโรคเล็กน้อยในสภาพไร่แต่กลับก่อให้เกิดความรุนแรงในสภาพควบคุม ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยทางธรรมชาติ/หรือสภาพแวดล้อมเป็นตัวแปรหนึ่งที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคและควบคุมการแสดงออกของยีนก่อโรคพืช ในสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคและลักษณะความต้านทานโรคของพืช ซึ่งจากการทดลองได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ก่อให้เกิดอาการเน่าและบนต้นข้าวโพดหวานทดสอบรุนแรงจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ Ech11 Ech14 Ech18 Ech24 Ech44 Ech45 Ech55 Ech60 Ech67 และ Ech71 ซึ่งทั้ง 10 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตสาร extracellular enzyme pectinase และ cellulase ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulent factor) ในสภาวะที่สายพันธุ์เชื้อมีการปลดปล่อยฮอร์โมนในปริมาณที่น้อยกว่าทั้งนี้สายพันธุ์เชื้อสาเหตุที่ผลิตเอนไซม์มากที่สุดและก่อให้เกิดโรครุนแรงสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ Ech11 Ech14 และ Ech24 จึงเลือกเป็นตัวแทนเชื้อสาเหตุโรค ตลอดการทดลอง

การศึกษาชีววิทยาและสภาวะที่เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อสาเหตุ และการศึกษาและพัฒนาเทคนิควิธีการในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียข้าวโพด ที่สะดวกและรวดเร็วให้ผลชัดเจนและแม่นยำในระดับเรือนทดลองทดแทนวิธีการคัดเลือกพันธุ์ในสภาพแปลง เริ่มต้นด้วยการศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อสู่ต้นข้าวโพดหวาน วิธีการต่าง ๆ 3 วิธี พบว่า การปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค อายุ 24-48 ชั่วโมง แทงเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดหวานที่อายุ 14 วัน ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะห่างสูงจากพื้นดินประมาณ 3 เซนติเมตร ปิดปากแผลด้วยวาสลินพร้อมให้ความชื้นสูงติดต่อกันนาน 24 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ดีที่สุด ทำให้ต้นข้าวโพดหวานทดสอบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการโรคอย่างรวดเร็วและรุนแรงที่สุด ในขณะที่กรรมวิธี

ฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรคเข้าลำต้นด้วยเข็มฉีดยา และการราดดินด้วย suspension เชื้อสาเหตุโรค ร่วมกับการทำแผลที่ราก (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) ร่วมกับการให้ความชื้น ให้ผลในการเกิดโรครุนแรงน้อยกว่า โดยกรรมวิธีการปลูกเชื้อ โดยฉีด suspension เชื้อเข้าลำต้น โดยตรงก่อให้เกิดอาการโรคในลักษณะเดียวกับวิธีปลูกเชื้อ โดยใช้ไม้จิ้มฟัน แต่การเกิดโรคช้าและอาการรุนแรงน้อยกว่า ในขณะที่การราดดินด้วย suspension เชื้อสาเหตุโรค ร่วมกับการทำแผลที่ราก เชื้อโรคจะปรากฏอาการเหี่ยวร่วมกับอาการลำต้นเน่า ซึ่งอาจเป็นผลจากการทำแผลที่รากแล้วปลูก เชื้ออาจส่งผลให้ระบบรากถูกทำลายก่อน และเชื้อจึงเจริญและลุกลามเข้าสู่ราก กระจายสู่ลำต้นทำให้เกิดอาการเน่าและต่อไป ทั้งนี้จากการศึกษาขั้นต้น พบว่าการใช้ความเข้มข้นของ suspension เชื้อ ก่อโรคที่ 0.2 O.D. (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^8$  cfu/ml) จะก่อให้เกิดโรคชัดเจนที่สุด (ไม่ได้ แสดงข้อมูล) เมื่อปลูกเชื้อ ร่วมกับการให้ความชื้นสูง อย่างไรก็ตามวิธีการปลูกเชื้อ โดยใช้ไม้จิ้มฟัน ปลอดภัยและโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค และปิดปากแผลด้วยวาสลีน ร่วมกับการให้ความชื้นสูง เป็นวิธี ที่ดีที่สุดสำหรับการปลูกเชื้อ เนื่องจากมีปัจจัยหรือสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคช่วยส่งเสริม ได้แก่ สภาพความชื้นสูง และสภาพไร้อากาศจากการปิดปากแผลด้วยวาสลีน เนื่องจากเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobe ที่จะมีปฏิริยาหรือกลไกการผลิตเอนไซม์ pectinase ย่อยผนังเซลล์พืชได้ดี ในสภาวะออกซิเจนต่ำ และมีพืชอาศัยที่เหมาะสม ในขณะที่กรรมวิธีอื่นมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเข้าทำลายพืช

การศึกษายืนยันผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดและการพัฒนาการของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียข้าวโพดหวานในสภาพเรือนทดลอง โดยเปรียบเทียบระยะเวลาเจริญเติบโต (14 21 และ 28 วัน) สภาพการให้ความชื้น และการใส่ปุ๋ยในโตรเจน (46-0-0) พบว่าเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายและทำความเสียหายกับข้าวโพดหวานได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ต้นข้าวโพดหวานทดสอบที่อายุ 14 และ 21 วัน จะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ โรคมากกว่า ข้าวโพดหวานอายุ 28 วัน แต่มีรายงานว่าข้าวโพดหวานที่ปลูกในสภาพแปลงจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียที่อายุประมาณ 3 สัปดาห์ หรือระยะออกดอกและจะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตข้าวโพด (Lal and Singh, 1984) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคสำคัญ ที่ทำความเสียหายกับระบบการข้าวโพดในอนาคตทั้งข้าวโพดหวานและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เพราะโรคดังกล่าวสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าและระยะให้ผลผลิตที่อาจเป็นผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลกระทบต่อระดับความรุนแรงและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อสาเหตุโรค (Jeamvijit *et al.*, 2005) ซึ่งจะต้องมีการศึกษาหาข้อมูลพื้นฐาน เพื่อหาวิธีการในการควบคุมโรคต่อไป

โรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียจะเข้าทำลายต้นข้าวโพดหวานได้ดีในสภาพอากาศร้อนอบอ้าว และมีความชื้นสูงติดต่อกัน (Lal and Singh, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยที่พบว่าเชื้อสาเหตุโรคกล้าต้นเน่าจะเข้าทำลายข้าวโพดหวานได้ดีต่อเมื่อมีการให้ความชื้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์ RH) ติดต่อกัน 48 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อหรือหลังจากเชื้อเข้าทำลายพืช หากระยะเวลาการให้ความชื้นน้อยกว่านี้ จะส่งผลให้การพัฒนาการของโรคบนต้นข้าวโพดหวานช้ากว่าหรือไม่เกิดอาการโรค (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่มีการให้ความชื้นต้นข้าวโพดหวานจะไม่แสดงอาการโรคเลย นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าการให้ปุ๋ยในโตรเจน (46-0-0) กับข้าวโพดหวานร่วมกับสภาพความชื้นสูงจะส่งเสริมให้โรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น เนื่องจากปุ๋ยในโตรเจนจะไปมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ของพืช และทำให้เนื้อเยื่อพืชมีความอวบน้ำและง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (White, 1999) ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงระบบการปลูกข้าวโพดหวานในระดับแปลงปลูก ซึ่งจะต้องมีการให้ปุ๋ยแต่งหน้า เมื่อข้าวโพดหวานอายุ 30 วัน หรือระยะออกดอก จึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรีย โดยเฉพาะแปลงที่มีการปลูกข้าวโพดหวานหนาแน่น การระบายน้ำในแปลงไม่ดี และเคยมีประวัติการเกิดโรค ซึ่งเกษตรกรจะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ เพราะอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิต ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานของโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียของข้าวโพดที่สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการโรคกล้าต้นเน่าแบคทีเรียแบบผสมผสานโดยเน้นการจัดการระบบปลูกและสภาพแปลงเพื่อลดความเสี่ยงต่อความเสียหายของผลผลิตข้าวโพดหวานจากโรคดังกล่าว ซึ่งยังไม่มีสารเคมีหรือวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค

การพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคการปลูกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการคัดพันธุ์ข้าวโพดด้านทาน/ทนทานต่อเชื้อสาเหตุโรค โดยการคัดเลือกตัวแทนพันธุ์ข้าวโพดจากกลุ่มต่าง ๆ คือ ข้าวโพดหวาน ได้แก่ พันธุ์อินทรี 2 ซูการ์ 74 ซูการ์ 75 ไฮบริคส์ 3 ไฮบริคส์ 10 บ้านสวน และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์ไพโอเนีย 3012 ไพโอเนีย 30A33 ไพโอเนีย 30Y87 KSC503 รวม 10 พันธุ์มาทำการปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อตะเคียนเชื้อสาเหตุโรค แทงเข้าสู่ลำต้นข้าวโพดหวานที่อายุ 14 วัน ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยระยะห่างสูงจากพื้นดินประมาณ 3 เซนติเมตร ปิดปากแผลด้วยวาสลีน พร้อมให้ความชื้นสูงติดต่อกันนาน 24-48 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่ากรรมวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกและเห็นผลรวดเร็ว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดพันธุ์ด้านทานโรคในระดับเรือนทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แทนวิธีการดั้งเดิมที่จะต้องปลูกเชื้อและคัดเลือกพันธุ์ด้านทานในสภาพไร่ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนถึงระดับความต้านทานที่แตกต่างกันของข้าวโพดต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มด้านทานสูง กลุ่มด้านทานปานกลาง และกลุ่มด้านทานต่ำ พันธุ์ข้าวโพดที่แสดงความต้านทาน

ต่อโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ดีที่สุด ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ โดยเมื่อพิจารณาโครงสร้างของสภาพลำต้นแล้วจะพบว่าต้นข้าวโพดดังกล่าวมีโครงสร้างของผนังลำต้นที่หนาและแข็งแรงกว่าพันธุ์อื่น ยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค (ธวัช และคณะ, 2531) ในขณะที่ข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสม โดยส่วนใหญ่จะมีความอ่อนนุ่มและอวบน้ำ ยังเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อก่อโรคสามารถเข้าทำลายได้ง่าย รวมถึงการทำให้เกิดแผล หรือการเกิดบาดแผลตามธรรมชาติจะเป็นการส่งเสริมให้เกิดโรครวดเร็วและรุนแรงมากยิ่งขึ้น (ไพโรจน์, 2525) นอกจากนี้หากพิจารณาถึงลักษณะทางพันธุกรรมพืช พบว่าสายพันธุ์และประวัติพันธุ์ของข้าวโพดหวานจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงสูงกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือข้าวโพดข้าวเหนียว (โชคชัย, 2536) โดยผลการทดลองนี้เป็นตัวชี้วัดอีกอย่างหนึ่งว่าควรมีการคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่เหมาะสมต่อพื้นที่หรือสภาพแวดล้อม โดยหลีกเลี่ยงการปลูกข้าวโพดพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคในพื้นที่ที่มีประวัติเกิดการระบาดของโรคดังกล่าว หรือควรมีการจัดการพื้นที่ปลูกเพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคก่อนทำการปลูกพืช หรืออาจใช้หรือคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรคปลูกในพื้นที่เสี่ยงร่วมกับการจัดการ โรคอย่างถูกวิธี

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังมีศักยภาพในการกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานได้ดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพดังกล่าวมีแนวโน้มสูงที่จะเป็นเชื้อ PGPR ที่มีคุณสมบัติในการครอบครองรากพืชเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าข้าวโพดหวาน และช่วยส่งเสริมการงอก และเสริมสร้างความแข็งแรงของระบบรากและลำต้นของกล้าข้าวโพดหวาน ได้ (Shishido and chanway, 1998) ทั้งนี้เชื้อ PGPR ดังกล่าวอาจมีความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานแบบ ISR (Induced Systemic Resistance) (Van Loon *et al*, 1998) โดยกลไกสำคัญของการเป็น PGPR คือทำให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ สามารถเปลี่ยนแปลงหรือลดความสามารถในการครอบครองของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ตลอดจนส่งเสริมหรือเพิ่มศักยภาพการใช้ธาตุอาหารในดิน สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีรายงานกลไกสำคัญของเชื้อ PGPR คือสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายวิธี เช่น การตรึงไนโตรเจน ผลิตสาร siderophores ออกมาจับเหล็กทำให้เชื้อสาเหตุโรคบางชนิดขาดธาตุเหล็กไม่สามารถเจริญได้ (Mayer, 2000) แบคทีเรียบางชนิดสร้าง vitamins และ amino acids ส่งเสริมความแข็งแรงของพืช (Vancura, 1987) การที่เชื้อจะประสบความสำเร็จในการครอบครองรากพืชได้ต้องมีปริมาณมากและเชื้อจะต้องมีการสัมผัสกับเมล็ดให้มากที่สุด (Bowen and Rovira, 1976) ตามที่ Chen and Bing-xin (2000) รายงานว่ากลไกสำคัญของเชื้อ PGPR ทำให้พืชมีการเจริญเติบโต โดยไปลดความสามารถของการครอบครองรากของจุลินทรีย์อื่น

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพเรือนทดลอง โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและ/หรือพ่นซ้ำบนต้นข้าวโพดหวาน เมื่ออายุ 14 วัน โดยก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1 วัน ซึ่งเปรียบเทียบกับการใช้ copper hydroxide และ positive control พบว่า การคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคดีกว่าการคลุกเมล็ดหรือการพ่นที่ลำต้นเพียงอย่างเดียว โดยการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 สามารถลดอัตราของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาคือ PCL17 KCR20 KCL10 และ LCR9 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อ PGPR หรือ ISR เนื่องจากให้ประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อมีการนำมาใช้ในลักษณะของการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่น สอดคล้องกับที่ Bowan and Rovira, 1976 รายงานว่าการใช้เชื้อ PGPR ให้ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานโรคได้นั้น เชื้อเป้าหมายจะต้องมีปริมาณมากพอ และจะต้องให้เชื้อใกล้ชิดกับเมล็ดพืชให้มากที่สุดรวมทั้งเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวจะต้องสามารถเจริญรอบบริเวณผิวรากและลำต้นได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะการนำมาใช้สำหรับควบคุมโรคทางลำต้นหรือรากที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งโดยส่วนใหญ่เชื้อสาเหตุจะอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชซึ่งยากต่อการควบคุมโดยวิธีการอื่นๆ

ทั้งนี้โรคลำต้นเน่าของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ย่อยและทำลายผนังเซลล์พืชทำให้เนื้อเยื่ออ่อนตัวง่ายต่อการเข้าทำลายและเป็นแหล่งอาหารของเชื้อสาเหตุโรค ส่งผลต่อท่อลำเลียงทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนย้ายน้ำในพืช (ไพโรจน์, 2525) จึงยากต่อการควบคุมโรค ประกอบกับยังไม่มีการพัฒนา/ปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคดังกล่าว เดิมเกษตรกรใช้วิธีการควบคุมด้วยสารเคมีที่มีศักยภาพไม่เพียงพอ และอาจส่งผลให้เชื้อต้านทานต่อการใช้ หากมีการใช้ผิดวิธีหรือใช้มากเกินไปจนความจำเป็น วิธีการควบคุมโรคโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และ/หรือแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต (PGPR) มาใช้ควบคุมและลดการระบาดของโรค จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาปรับแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้

สำหรับกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการกระตุ้นหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและความสามารถในการครอบครอง (colonize) ที่บริเวณรากหรือส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งความสามารถในการครอบครองนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของระบบหรือวิธีการนำเชื้อไปสู่ส่วนต่างๆ และความสามารถของเชื้อแบคทีเรียนั้นในการแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆ การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งผันแปรตามเป้าหมายหลักคือคุณสมบัติการผลิตสารทำลายแบคทีเรียด้วยตัวเอง (antibiotic, bacteriocin, enzymes) บางครั้งจะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย

ครอบครองรากที่มีคุณสมบัติข้างต้น มีการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการย่อยฟอสเฟต และขณะเดียวกันก็มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมด้วย ในการคัดเลือกแบคทีเรียคุณภาพจะไม่ได้มีการคัดเลือกกลุ่มที่มีความสามารถในการครอบครองรากเป็นหลักเพียงอย่างเดียวเนื่องจากจะทำให้ล้มเหลวในการนำเชื้อไปใช้ในการควบคุมโรคสภาพไร่ ในทางตรงข้าม ถ้าหากมีการคัดเลือกกลุ่มที่สามารถครอบครองรากร่วมกับการกระตุ้นการเจริญของพืชและภูมิคุ้มกันโรคของพืช จึงมาคัดเลือกคุณสมบัติในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จะทำให้เกิดความสำเร็จในการป้องกันกำจัดโรคในสภาพแปลงได้ดีขึ้น (นิพนธ์, 2533)

การใช้เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยตามบริเวณรากและดินบริเวณรอบรากของพืชที่มีความสามารถในการอยู่ร่วมกับพืชและไม่เป็นโทษกับพืช (symbiosis) มาเพิ่มปริมาณในการใส่ลงในดินเพื่อส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารของพืช ตลอดจนสามารถกระตุ้นให้พืชผลิตสารต่าง ๆ ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ รวมทั้งสารบางชนิดที่เชื้อแบคทีเรียผลิตกระตุ้นให้พืชเติบโตแข็งแรง จัดเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเรียกว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Louise, 2004) โดยมีรายงานว่า PGPR ที่มีผลในการชักนำให้เกิด SAR ในพืช (Alstrom, 1991) เช่น เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Fluorescent Pseudomonas* spp., *Pseudomonas putida*, *B. amyloliquefaciens* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น โดยเชื้อต่าง ๆ เหล่านี้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและแก้ไขสภาพอ่อนแอของพืชที่เกิดจากความเครียดได้ (Kopp *et al.*, 1989) ทำให้พืชเพิ่ม product activity จำพวก bacterial siderophors antibiotics ตลอดจน chitinase และ glucanase microbial cell (van Loon *et al.*, 1998) ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นโทษอื่น ๆ ได้ ถึงแม้จะอยู่ในสภาวะที่เชื้อโรคและสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเกิดโรค (ภูริพันธ์, 2526)

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานและการควบคุมโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย โดยการรวบรวมตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดหวาน ได้แก่ ใบ ดินบริเวณรากและราก สุ่มเก็บจากพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวานโดยเลือกจากต้นที่สมบูรณ์มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการต่าง ๆ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ในการทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีความแตกต่างทั้งชนิดและปริมาณตัวอย่างดินบริเวณรากและรากข้าวโพดหวานมีปริมาณและความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างใบมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียน้อยกว่า แสดงถึงระบบนิเวศวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน โดยที่บริเวณพื้นผิวของพืชทั้งส่วนเหนือดินและใต้ดินจะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและเป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม epiphytes และ soil microorganism ตามลำดับ โดยเชื้อเหล่านี้จะมี

กลไกและปฏิสัมพันธ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่แตกต่างกันทั้งในลักษณะพึ่งพาอาศัย (symbiosis) การเป็นศัตรู (เชื้อโรค) และการอยู่อย่างอิสระ

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียและ/หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดหวานด้วยการใช้วิธีทดสอบที่แตกต่างกันในสภาพห้องปฏิบัติการ (cross streak, dual culture, paper disc) แสดงให้เห็นว่ากลไกที่แตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติ แยกจากตัวอย่างใบ ดินบริเวณรากและราก โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามคุณสมบัติการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ คือ กลุ่มที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและกลุ่มที่มีความสามารถในการเจริญคลุมทับเชื้อโรค และยังพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้บางชนิดยังมีกลไกที่สำคัญในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืช ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมีกลไกในลักษณะร่วมกัน เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหรือมีแนวโน้มเป็น PGPR พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานเป็นเชื้อที่แยกได้จากรากเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากความเหมาะสมในการครอบครองพืช ซึ่งเชื้อที่แยกได้จากรากเป็นพวก epiphyte หรือ saprophyte ที่สามารถอาศัยหรือดำรงชีวิตอยู่ที่ผิวพืชได้เฉพาะชนิด (Hirano *et al.*, 1989) หรือกลุ่ม endophyte มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสามารถยับยั้งและเจริญแข่งขันเชื้อสาเหตุโรคได้ดีกว่าเชื้อที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ (Dimock *et al.*, 1989) และผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี cross streak dual culture และ paper disc ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 44 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zeae* มีทั้งลักษณะการเจริญแข่งขันคลุมทับเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วและสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย สอดคล้องกับที่ Baker and Cook (1974) รายงานว่ากลไกของการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์มีทั้งเจริญรวดเร็วแข่งขันทางด้านที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร การผลิตสารยับยั้งออกมามากุมเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพดังกล่าวแตกต่างกันไป และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี paper disc สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ KCR21 PCL17 KCR20 KCL10 และ LCR9 ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี แบคทีเรียสายพันธุ์ PCL17

สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน สร้าง endospore สร้างเอนไซม์ catalase ได้ สามารถเจริญในอาหาร NGB ที่ผสม NaCl 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ สร้างเอนไซม์เคตะเลส สามารถรีดิวส์ไนเตรท ย่อยเจลาตินได้ไม่สร้างอินโดล สามารถใช้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับน้ำตาล maltose sucrose และ manital ได้ ส่วนสายพันธุ์ KCR21 สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน สร้าง endospore สร้างเอนไซม์ catalase ได้ สามารถเจริญในอาหาร NGB ที่ผสม NaCl 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท ย่อยเจลาตินได้ไม่สร้างอินโดล สามารถใช้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับน้ำตาล lactose maltose sucrose และ sorbitol ได้ เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ศึกษาและเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. (Holt *et al.*, 1994) ผลปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 มีคุณสมบัติลักษณะสอดคล้องกับ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการลดความรุนแรงโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพไร่ พบว่า กรรมวิธีคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 สามารถลดความรุนแรงโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค เท่ากับ 79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 (สุคฤดี และคณะ, 2544) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคได้เท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ควบคุมโดยใช้สารเคมี (copper hydroxied) สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เพียง 48 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PCL17 ให้ผลผลิตทั้งเปลือกกรรม 2,368 กิโลกรัม/ไร่ สูงที่สุด โดยมีน้ำหนักฝักดีและฝักเสีย เท่ากับ 1,284 และ 423 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความหวาน 15 บริกซ์ ในขณะที่กรรมวิธีคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KCR21 มีผลผลิตทั้งเปลือกกรรม 2,091 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PCL17 แต่มีน้ำหนักฝักดีมากกว่า กรรมวิธีดังกล่าว 92 กิโลกรัม/ไร่ และมีน้ำหนักฝักเสียน้อยกว่าถึง 412 กิโลกรัม/ไร่ และมีเปอร์เซ็นต์ความหวาน 16.2 บริกซ์ ส่งผลให้กรรมวิธีดังกล่าวมีผลผลิตพร้อมขายสูงที่สุด

แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีกลไกที่แตกต่างกันในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตเพิ่มพูนคุณภาพและปริมาณผลผลิต และการควบคุมโรค โดยสายพันธุ์ KCR21 มีความโดดเด่นในด้านการควบคุมโรคและส่งเสริมด้านคุณภาพผลผลิต ในขณะที่สายพันธุ์ PCL17 มีศักยภาพในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตดีกว่าแต่ KCR21 แต่ประสิทธิภาพในการควบคุม

โรคต่ำกว่า ซึ่งการเกิดโรคระบาดที่รุนแรงกว่าจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพผลผลิต ถึงแม้ว่ากรรมวิธีดังกล่าวจะให้ปริมาณน้ำหนักรวมฝักดี ดังนั้นการปรับใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมกันจึงจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะส่งเสริมให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในระบบการผลิต ข้าวโพดในลักษณะกลไกร่วม (Ryu *et al.*, 2007)

## สรุป

สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียจากพื้นที่ปลูก 6 จังหวัด พบการระบาดของโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียมากที่สุดในจังหวัดกาญจนบุรี มากที่สุด และสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคได้ 85 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากใบ ดินบริเวณรากและราก บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ NGA King's medium B และ Thronton's medium สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้ทั้งหมด 512 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากพบมากที่สุด และจำแนกอย่างหยาบตามลักษณะรูปร่างและสีโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NGA ได้ 30 กลุ่ม พบกลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน บุ่มตรงกลาง ผิวขรุขระ ขอบหยัก แสงผ่านไม่ได้มากที่สุด

เทคนิคการปลูกเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zear* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรีย พบว่า วิธีการปลูกเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค มีความเหมาะสมต่อการเกิดและการพัฒนาการของโรคดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีอื่น และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญเติบโต สภาพการให้ความชื้นและการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน พบว่า เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายและทำความเสียหายกับข้าวโพดหวานได้ในทุกระยะเวลาการเจริญเติบโต โดยต้นข้าวโพดหวานทดสอบที่อายุ 14 และ 21 วัน จะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคมกกว่าข้าวโพดหวานอายุ 28 วัน และจากการคัดเลือกระดับความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมทั้ง 10 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ไพโอเนีย 30A33 ไพโอเนีย 30Y87 KSC 503 และ บ้านสวน มีความต้านทานสูง

ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi* pv. *zear* สาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง 2 สายพันธุ์ คือ KCR21 และ PCL17 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมี สอดคล้องกับ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis*

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าแบคทีเรียในสภาพเรือนทดลอง และสภาพไร่ พบว่า กรรมวิธีการควบคุมโรคด้วยการคลุกเมล็ดด้วย suspension เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 ก่อนปลูกร่วมกับการพ่น suspension เชื้อสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการคลุกเมล็ดอย่างเดียวและ/หรือการพ่น suspension เชื้อปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว โดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PCL17 มีประสิทธิภาพสูงสุดให้ผลผลิตทั้งเปลือกรวม 2,368 กิโลกรัม/ไร่ และมีน้ำหนักฝักดี เท่ากับ 1,284 กิโลกรัม/ไร่

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัณญา ทรรคนสฤษดิ์. 2538. อิทธิพลของการเลือกวันปลูก ระยะปลูก แหล่งของธาตุไนโตรเจน และระดับการให้น้ำของถั่วเหลืองที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคใบจุดบน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ สุวรรณธราดล. 2544. สองทศวรรษของธุรกิจเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดไร่พันธุ์ลูกผสมในประเทศไทย, น. 113-120. ใน รายงานการประชุมข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 30. 19-23 สิงหาคม 2544. ณ โรงแรมเนาว์ด้าแกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่. 2542. พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

โชคชัย เอกทัศนาวรรณ. 2544. พันธุ์ข้าวโพดหวาน, น. 35-40, ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การผลิตข้าวโพดหวานฝักสดเพื่อให้ได้ผลผลิตและคุณภาพสูง. ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา.

ณัฐณี กิจไพบูลทวี. 2546. การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานจากเขตอบอุ่นเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมภายในประเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2533. นิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประชุม จุฑาทรรณนะ, ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ และ จิรนนท์ แหม่มสูงเนิน. 2544. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อสาเหตุโรคข้าวโพดในประเทศไทย, น. 192-201. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่ 30. 19-23 สิงหาคม 2544. ณ โรงแรมเนาว์ด้าแกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี.

พิระวรรณ พัฒนวิภาส, อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, วันเพ็ญ, ศรีทองชัย และ ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การจัดทำบัญชีรายชื่อโรคและเชื้อสาเหตุโรคของข้าวโพดเพื่อ

การนำเข้า, น. 258-271. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่  
33. 22-24 สิงหาคม 2550. ณ โรงแรมทีเค พาเลซ กรุงเทพฯ.

กฤษพันธ์ ทีละศุติธรรม. 2526. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สร้างสารปฏิชีวนะจากดินจอม  
ปลวก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราชนนทร์ ธีรพร. 2539. ข้าวโพด การผลิต การใช้ประโยชน์ การวิเคราะห์ปัญหาและการถ่ายทอด  
เทคโนโลยีสู่เกษตรกร. ตำนานสหภาพการพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ.

วนิดา จิตะฐาน, สุทธิพงษ์ ญาณวารี, สุนตรา ภาวิจิตร และสมเกียรติ จิตะฐาน. 2529. การมีชีวิต  
รอดของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคริโคนเน่าของข้าวโพดในดิน  
และเศษพืช, น.6 ใน รายงานการค้นคว้าประจำปี 2529, กรมวิชาการเกษตร.

วนิดา จิตะฐาน, สุทธิพงษ์ ญาณวารี, สุนตรา ภาวิจิตร และสมเกียรติ จิตะฐาน. 2530. การมีชีวิต  
รอดของเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* ในไร่ข้าวโพด, น. 8 ใน รายงานการค้นคว้า  
ประจำปี 2529, กรมวิชาการเกษตร

วิชัย โหมสิตรัตน. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. คณะเกษตร. น. 161  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2547. การระบาดของโรคข้าวโพดจากแบคทีเรียชนิดใหม่ในประเทศไทย.  
น.249-262. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่าง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, อุดรฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แบคทีเรียที่สร้างเสริมความมั่นคงปลอดภัยทางอาหารด้านพืชอย่าง  
ยั่งยืน, น. 58-66 ใน 25 ปี สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.

สุพจน์ กาเข้ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2544. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพใน  
การควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองตัดเทียมสารเคมี, น.143-151 ใน รายงานการประชุม  
วิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5, กาญจนบุรี

- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. ไม้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย สำนักพิมพ์ร่วมเขียว กรุงเทพฯ
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2545. สถิติการเกษตร. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตรปีที่ 48 ฉบับที่ 549 แหล่งที่มา: <http://www.Oae.go.th/news/info/AgroMeg.htm>, 1 เมษายน 2545.
- อุไรจันทา กสิกรรมไพบุลย์. 2534. ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากและดินปลูกมะเขือเทศในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อแบคทีเรียโรคน้ำหนึ่ยของมะเขือเทศ (*Pseudomonas solanacearum*) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Baker, K. F. and R. J. Cook. 1974. **Biological Control of Plant Pathogens**. W. H. Freeman and Co, San Francisco. CA.
- Bowan, G. D. and A. D. Rovira. 1976. Microbial Colonization of Plant Roots. *Ann Rev. Phytopathol.* 14: 121-144.
- Bradbury, J. F. 1981. *Pseudomonas syringae* pv. *sesame*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No 696. **Commonwealth Mycological Institute** : Kew.
- Chase, A. R., R. E. Stall, N. C. Hodge and J. B. Jones. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. **Phytopathol** 82: 754-759 .
- Chen, X. and Z. Bing-xin. 2000. Advanced mechanisms of PGPR in the plant rhizosphere. **J. Microbiol.** 20: 38-41.
- Christensen, J. J. and R. D. Wilcoxson. 1966. Stalk rot of corn. *Phytopathological Monogy.* 3. A M. **Phytopatho.** Soc., St. Paut, Minnesota.
- Giancarlo, L. and Rolando L. 1993. **Biotectnology of Antibiosis and Other Bioactive Microbial Metabolites**. Plenum Press, New York.

- Goodman, R. N. and A. J. Novacky. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogen. **The American Phytopathological Society**. APS Press, St. Paul, MN. 244 p.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed.** The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Jeamvijit, J., S. Prathuangwong, P. Jutawantana and S. Tsuyumu. 2005. Identification of *Erwinia chrysanthemi* Thai strains and its pathogenic enzymes on corn. **Proc. of the International Conference on Maize Adaptation to Marginal Environments**. Mar. 6-9, 2005. Nakhon Ratchasima, Thailand : 146-152.
- Johnson, L. F. and E. A. Curl. 1972. Method for Research on the Ecology of Soil –Borne Plant Pathogen. Burgess Publishing Company, the United States of America. Cited O.N. Allen 1957. **Experiments in soil bacteriology. 3<sup>rd</sup> rev. ed. Burgess Publ. Co., MINNEAPOLIS, Minn.**
- Lal S. and I. S. Singh. 1984. Breeding for resistance to downy mildews and stalk rots in maize. **Appl. Genet.** 69: 111-119.
- Matsumoto, H., Jitareerat, P., Baba, Y. and Tsuyumu, S. 2003. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **MPMI**, 16:226-237.
- Moorman, G. W. and R. J. Lease. 1992. Residual efficacy of fungicides used in the management of *Botrytis cinerea* on greenhouse grown geranium. **Plant Dis** . 76: 374-376.
- Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, T.C. Paulitz and R.R. Belanger. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathol.** 49:523-530.

- Pataky, J.K. and R. Ikin. 2003. The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed. Online. **A pest risk analysis prepared for the international seed federation**, Nyon, Switzerland.
- Prathuangwong S., S. Kasem and J. Thowthampitak. 2004. Multiple Plant Response to Bacterial Mediated Protection Against Various Diseases. **Proc of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciens (Scientific Meeting)**. Hanoi Agricultural University (HAU), Hanoi, Vietnam.
- Prasad, M. and S. K. , Sinha. 1977. Survivel and retention of infectivity of bacterial stalk rot pathogen of maize and its perpetuation on varied cropping pattern . **Plant and Soil** 47: 245-248.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **Bacteriology Committee of American Phytopathological Society**, St. Paul MN.
- Scher, F. M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogen. **Phytopathool.** 72: 1567-1573
- Schroth, M. N. and J.G. Hancock. 1982. Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science** 216 : 1376-13881.
- Shishido, M. and C. P. Chanway. 1998. Forest soil community response to plant growth promoting rhizobacteria and spruce seedlings. **Biol. Firtil Soils** 26 : 179-186.
- Smith, C. W. 1995. **Crop production**. Jhon Wiley&Sons,Inc, New York.
- Suslow, T. V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of Sugar beets : Effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathol.** 72 : 199-206.

- Tollenaar, and L.M. Dwyer. 1999. Physiology of maize, pp.170-204. *In* D.L. Smith and C. Hamel, eds. Crop Yield Physiology and Processes. **Springer-verlag Berlin Heidelberg**, Germany.
- Tran, V. V., N. Omar, T. Heulin, O. Bevege and J. Balandreau. 1994. Selection of bacteria to enhanced plant growth and results of field test, pp. 14-17. *In* M. H. Reydev, P. M. Stephen and G. D. Bowen, eds. **Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria**. Australia.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker and C.M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann.Rev. Phytopathol.* 30:453-483.
- Waksman, S. A. 1961. The role of antibiotics in nature. *Perspect. Biol. Med.* 4:27-278.
- White, D. G. 1999. Compendium of Corn Diseases, 3<sup>rd</sup> ed. **The American Phytopathological Society**. APS Press, St.Paul, MN. 78 p.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

## nutrient glucose broth (NGB)

Beef extract	3	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
Glucose	2	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## nutrient glucose agar (NGA) (วิชัย, 2537)

nutrient glucose broth		
วุ้น	15	กรัม

เตรียมโดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง(500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นวุ้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมผงวุ้นนำไปหลอมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## King (et al.)'s medium B agar (KB) (Schaad et al., 1988)

Proteose peptone # 3	20	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGA

#### Potato glucose agar (PDA)

Potato	300	กรัม
Dextose	3	กรัม
Agar	15	กรัม

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า แล้วนำไปต้มจากนั้นกรองเอาชิ้นมันฝรั่งออกแล้วเติมน้ำให้ครบอัตรา 1000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีการเตรียม NGA

#### Thornton's medium

$K_2HPO_4$	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$KNO_3$	0.5	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
Mannital	1	กรัม
วุ้น	13	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGA

## ภาคผนวก ข

## การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

## Motility Test medium

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	5	กรัม

เตรียมอาหารดังกล่าวในปริมาตรน้ำ 1000 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหาร ประมาณ 6.8 –7 เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการ stab เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญออกนอกบริเวณปลูกเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

## Starch Agar (Starch hydrolysis)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	13	กรัม

เตรียมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้งได้โดยการหยดน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบ ๆ รอยขีดแสดงว่าเชื่อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

### การศึกษาการผลิตเอนไซม์ Catalase

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหารเอียง NGA ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดเชื้อ ถ้าภายในหลอดเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้

เอนไซม์ Catalase มีบทบาทในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียให้เป็นออกซิเจนและน้ำได้ดังสมการ



### สูตรอาหารสำหรับทดสอบ Oxygen Relationship

เตรียมอาหาร NGA ใส่ลงในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำมาเชื้อที่ความร้อน  $121^{\circ}C$  ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นโดยไม่ต้องเอียง นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้อายุ 24 ชั่วโมงมา stab ลงบนอาหารดังกล่าว สังเกตการเจริญและตำแหน่งการเจริญของเชื้อในอาหาร

### Simmon's Citrate Agar (Citrate utilization)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$(NH_4) H_2PO_4$	1	กรัม
$K_2HPO_4$	1	กรัม
Sodium citrate	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	13	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารที่เตรียม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร (Bromthymol blue) ทุกวัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้

## Hydrolysis of Gelatin (gelatin liquefaction)

Beef extract	10.0	กรัม
Bacto-Peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Gelatin	12.0	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ gelatinase ย่อย gelatin เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาพอุณหภูมิห้อง ย้ายหลอดเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 °C สังเกตการแข็งตัวของเจลาติน ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้ อาหารที่ทดสอบจะไม่แข็งตัว

## Christensen's Urea medium (Urease test)

Bacto-peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenal red 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นประมาณ 50 °C เติมสารละลาย Urea เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร เตรียมเป็น slant (aseptic technique) นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง streak ลงบนอาหารเอียงที่เตรียม บ่มเชื้อไว้ประมาณ 5-7 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

## Tryptone yeast extract broth (Indole test)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม

เตรียมสารละลายดังกล่าวในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ย้ายเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงในอาหาร Tryptone yeast extract broth ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน เติมสารละลายทดสอบ (Kovac's reagent) 0.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ดูการเกิดสีเปรียบเทียบกับ control

## Levan formation

เตรียมอาหาร NA (Nutrient agar) ตามวิธีการข้างต้น เติมน้ำตาล sucrose ลงไปในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ นำนึ่งฆ่าเชื้อ เทลงใส่จานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการ cross streak เชื้อแบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ถ้ามีลักษณะนุ่มคล้ายโดมหรือเข้มนมากกว่าปกติ (control) แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (positive)

## Nitrate broth (Nitrate reduction)

Beef extract	3	กรัม
Bacto-peptone	5	กรัม
KNO <sub>3</sub>	1	กรัม

เตรียมอาหารในอัตราส่วน 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อทำการทดสอบโดยการย้ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน หยดสารทดสอบ (α-naphthylamine 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sulphanilic acid 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 N acetic acid อัตราส่วน 1:1) ประมาณ 10 หยด สังเกตการเกิดสีแดง แสดงว่าเชื้อสามารถ reduce nitrate ไปเป็น nitrite หรือ nitrogen ได้

## Salt tolerance medium test

เตรียมอาหาร NB ตามวิธีการข้างต้น ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์) แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นิ่งมาเชื้อแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพรภิมล จันทรอ่อน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 พฤศจิกายน 2523
สถานที่เกิด	302 หมู่ 4 ต.ช้างกลาง กิ่งอำเภอช้างกลาง จ. นครศรีธรรมราช 80250
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากสถาบันเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (คอบ.)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	

พรภิมล จันทรอ่อน, สุพจน์ กาเซ็ม, ประชุม จุฑาวรรณะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. การศึกษาลักษณะสำคัญและการพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* สาเหตุโรคลำต้นเน่า ข้าวโพดหวาน. ใน รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรภิมล จันทรอ่อน และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. เทคนิคการประเมินเพื่อคัดเลือกพันธุ์ ข้าวโพดต้านทานต่อ *Erwinia chrysanthemi*. ในรายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช แห่งชาติ ครั้งที่ 8 โรงแรม อัมรินทร์ ลากูส พิษณุโลก.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, พรภิมล จันทรอ่อน, สุพจน์ กาเซ็ม และ ประชุม จุฑาวรรณะ. 2551. อิทธิพลของระยะการเจริญเติบโต และการให้ปุ๋ยใน ไตรเจนที่มีต่อความรุนแรง โรคลำต้นเน่าข้าวโพด และการประเมินเชื้อแบคทีเรียควบคุมโรค. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 33 ณ โรงแรม ทีเค. พาเลซ กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, พรภิมล จันทรอ่อน, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และ ประชุม จุฑาทรรณนะ. 2551. ชีวิตวิธีการควบคุมโรคกล้าต้นเน่าของข้าวโพดหวานด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 และกลไกการเป็นปฏิปักษ์. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการ โครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 3 ณ โรงแรมอิมพีเรียล ภูเก็ต รีสอร์ท เขาแก้ว เพชรบูรณ์.

ประชุม จุฑาทรรณนะ, สุดฤดี ประเทืองวงศ์, สุพจน์ กาเซ็ม, จิรนนท์ แหยมสูงเนิน, นันทิยา เตชะติ และพรภิมล จันทรอ่อน. 2551. การศึกษาโรคกาบและใบไหม้ ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการ โครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 3 ณ โรงแรม อิมพีเรียล ภูเก็ต รีสอร์ท เขาแก้ว เพชรบูรณ์.



## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพรกมล จันทร์อ่อน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 พฤศจิกายน 2523
สถานที่เกิด	302 หมู่ 4 ต.ช้างกลาง กิ่งอำเภอช้างกลาง จ. นครศรีธรรมราช 80250
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากสถาบันเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (คอบ.)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	

พรกมล จันทร์อ่อน สุพจน์ กาเซ็ม ประชุม จุฑาทวรรณะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. การศึกษาลักษณะสำคัญและการพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* สาเหตุโรคลำต้นเน่า ข้าวโพดหวาน. ใน รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พรกมล จันทร์อ่อน และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. เทคนิคการประเมินเพื่อคัดเลือกพันธุ์ ข้าวโพดต้านทานต่อ *Erwinia chrysanthemi*. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช แห่งชาติ ครั้งที่ 8 โรงแรม อัมรินทร์ ลากูต พิชญโลก.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ พรกมล จันทร์อ่อน สุพจน์ กาเซ็ม และ ประชุม จุฑาทวรรณะ. 2551. อิทธิพลของระยะการเจริญเติบโต และการให้น้ำในโตรเจนที่มีต่อความรุนแรง โรคลำต้นเน่าข้าวโพด และการประเมินเชื้อแบคทีเรียควบคุมโรค. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 33 ณ โรงแรม ทีเค. พาเลซ กรุงเทพฯ

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ พรกมล จันทร์อ่อน สุพจน์ กาเซ็ม ญัฐธิญา เป็อนสันเทียะ และ ประชุม จุฑาทวรรณะ. 2551. ชีวิตวิธีการควบคุมโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ KCR21 และ PCL17 และกลไกการเป็นปฏิปักษ์. ใน การประชุมเชิง

ปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<sup>125</sup>  
ครั้งที่ 3 ณ โรงแรมอิมพีเรียล ภูเก็ต รีสอร์ท แอนด์ สปา

ประชุม จุฬารัตนะ สุดดี ประเทืองวงศ์ สุพจน์ การัมย์ จิรนนท์ แหม่มสูงเนิน  
นันทิยา เตชะดี และพรภิมล จันทร์อ่อน. 2551. การศึกษาโรคคาบและใบไหม้  
ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการ  
โครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 3 ณ โรงแรม  
อิมพีเรียล ภูเก็ต รีสอร์ท แอนด์ สปา