การควบคุมโรคกล้าแห้งของต้นอ่อนข้าวหอมมะลิ 105 โดยชีววิธี

จรัญ ประจันบาล[1*] สถิตย์ พันวิไล[1] และวันทนี สว่างอารมณ์[2]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา และ [2]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ธนบุรี กรุงเทพฯ 10600
[*]E-mail: jaran_tor@hotmail.com

รับบทความ: 23 มีนาคม 2559 ยอมรับตีพิมพ์: 27 พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของ *Sclerotium rolfsii* Sacc. สาเหตุโรคกล้าแห้งของต้นอ่อนข้าวหอมมะลิ 105 จากตัวอย่างดินในแปลงนาข้าวจำนวน 70 ตัวอย่าง ในพื้นที่ 8 จังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดสุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ นครราชสีมา และชัยภูมิ สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราในห้องปฏิบัติการ พบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง การเจริญของราอยู่ในช่วงร้อยละ 30.30±4.29 ถึง 72.73±0.00 ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต BR60.7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดร้อยละ 72.73±0.00 รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SK12.3, YS22.1, CP68.3 และ NM69.6 โดยมีประสิทธิภาพยับยั้งร้อยละ 71.22±2.14, 71.22±6.43, 68.19±6.43 และ 66.67±4.29 ตามลำดับ และเมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต BR3.2, BR3.4, BR3.5, SK18.6, YS22.1, YS22.5, SK26.4, RE28.5, BR60.7, NM62.1,NM62.2, NM65.2 และ CP68.3 มีความเหมือน *Bacillus subtilis* ส่วนไอโซเลต SR8.9, SK12.7 และ SR53.6 มีความเหมือน *B. amyloliquefaciens* ในขณะที่ไอโซเลต SR8.4, SK12.3 และ NM69.9 มีความเหมือน *B. vallismortis* และไอโซเลต NM69.6 มีความเหมือน *B. aryabhattai* เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มาทดสอบการควบคุมโรคกล้าแห้งด้วยการปลูกในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี โดยช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายร้อยละ 57.45 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในต้นกล้า ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมโรคกล้าแห้งได้

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี โรคกล้าแห้งข้าว ข้าวหอมมะลิ 105

Restraining of Seedling Blight Disease in Jasmine Rice 105 Using Biological Control

Jaran Prajanban[1*], Sathit Panvilai[1] and Wantanee Sawangarom[2]

[1]Program Study of Microbiology, and [2]Program Study of Biology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thonburi, Bankok 10600, Thailand

[*]E-mail: jaran_tor@hotmail.com

Received: 23 March 2016 Accepted: 27 May 2016

Abstract

This research aimed to isolate and screen an antagonistic bacterium that possess the growing inhibition of *S. rolfsii* Sacc., caused seeding blight disease in jasmine rice 105. The 70 soil samples were collected from the northeastern Thailand, including Surin, Si Sa Ket, Yasothon, Roi-Et, Mahasarakham, Buri Ram, Nakhon Ratchasima, and Chaiyaphum. The bacterial isolates were discriminated into 127 isolates relied on the colony morphology. When investigating the inhibitory efficacy of mycelial growth of *S. rolfsii* Sacc. in the laboratory scale, there were only 20 isolates displayed antagonistic activity to this fungus with inhibition percentage averaged from 30.30±4.29% to 72.73±0.00%. The isolate BR60.7 showed the highest inhibitory percentage at 72.73±0.00%, following isolates SK12.3, YS22.1, CP68.3 and NM69.6 that showed the inhibition percentages at 71.22±2.14%, 71.22±6.43%, 68.19±6.43%, and 66.67±4.29%, respectively. The antagonistic bacterial isolates were identified using 16S rDNA sequencing technique. The results indicated that isolates were distinguished into 4 species: 1) isolates BR3.2, BR3.4, BR3.5, SK18.6, YS22.1, YS22.5, SK26.4, RE28.5, BR60.7, NM62.1, NM62.2, NM65.2 and CP68.3 were closely related to *B. subtilis*; 2) isolates SR8.9, SK12.7, and SR53.6 were closely related to *B. amyloliquefaciens*, 3) isolates SR8.4, SK12.3, and NM69.9 were closely related to *B. vallismortis*, and 4) NM69.6 isolate was similar to *B. aryabhattai*. In addition, the antagonistic bacteria were examined to inhibit *S. rolfsii* Sacc. in rice cultivated in non-sterile soil. The mycelial growth was efficiently inhibited by these bacteria that raised the survival rate of rice at 57.45%, indicating that the soil antagonistic bacteria were able to control the seeding blight disease in jasmine rice 105. The result implies that these bacteria may be useful to the development of biological control of rice disease as a commercial product.

Keywords: Biological control, Rice seedling blight, Jasmine rice 105

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรในประเทศไทยเป็นอย่างมากในฤดูการเพาะปลูก 2557/58 ประเทศไทยมีพื้นที่เก็บเกี่ยวประมาณ 64.19 ล้านไร่ ผลผลิตรวม 18.75 ล้านตัน (Rice Department, 2015) สิ่งที่จำเป็นในการปลูกและการเพิ่มผลผลิตข้าวต้องอาศัยการปฏิบัติที่ถูกต้องตั้งแต่เมล็ดพันธุ์ข้าว การบำรุงรักษาดิน การเตรียมดิน การกำหนดเวลาปลูกข้าวให้เหมาะสมการป้องกันและกำจัดวัชพืช ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปลูกและการเพิ่มผลผลิตของข้าว อีกทั้งประเทศไทยอยู่ในเขตอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิกลางคืนอยู่ระหว่าง 20 – 25 องศาเซลเซียส กลางวันอยู่ระหว่าง 30 – 35 องศาเซลเซียส ความชื้นระหว่างร้อยละ 70 – 100 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของราและแบคทีเรียทั้งชนิดที่มีประโยชน์และชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (Chantarasa-ard et al., 2010) ประกอบกับพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรปลูกนั้นมาจากการเก็บเมล็ดจากแปลงนาของชาวนาเอง หรือซื้อจากเพื่อนบ้านที่ปลูกข้าวเพื่อขายเป็นเมล็ดพันธุ์ ซึ่งทั้งสองกรณีไม่มีการรับรองคุณภาพ อาจทำให้มีเชื้อโรคติดไปกับเมล็ดพันธุ์แล้วถ่ายทอดไปสู่ต้นข้าว ปัจจุบันการปลูกข้าวในหลายพื้นที่โดยเฉพาะข้าวนาปีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างประสบปัญหาเกี่ยวกับความแห้งแล้งขาดแคลนระบบชลประทานต้องอาศัยน้ำฝนจากธรรมชาติในการเพาะปลูก และยังประสบปัญหาขาดแคลนแรงงาน ด้วยเหตุนี้การเพาะปลูกข้าวหอมมะลิ 105 ในปัจจุบันจึงหันมานิยมใช้วิธีการปลูกข้าวแบบหว่านแห้ง ซึ่งมีต้นทุนต่ำ ใช้แรงงานน้อย และไม่ต้องการน้ำในปริมาณมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกข้าวโดยวิธีการปักดำหรือหว่านข้าวงอกในนาหว่านน้ำตม (Chaisattapagon, 2007) อย่างไรก็ตามการปลูกข้าวด้วยวิธีการหว่านแห้งเสี่ยงต่อการเกิดโรคกล้าแห้งข้าวที่มีสาเหตุมาจาก *S. rolfsii* Sacc. เนื่องจากราชนิดนี้เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวนมากที่กำลังงอกและยังไม่โผล่ขึ้นมาเหนือระดับผิวดิน นอกจากนี้ยังสามารถเข้าทำลายต้นข้าวบริเวณโคนต้นที่อยู่ระดับผิวดิน ทำให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าชะงัก ใบเหลืองและเหี่ยว จากนั้นจึงแห้งตายไปทั้งต้น โดยบริเวณต้นข้าวที่เป็นโรคจะมีเส้นใยสีขาวและมีเม็ดสเคลอโรเทียม (sclerotium) สีน้ำตาลไหม้กระจายอยู่บนพื้นดินและที่โคนของต้นกล้า (Weerapat, 1965) การควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากราชนิดนี้ เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีคาร์บอกซิน (carboxin) โดยคลุกเมล็ดพืชก่อนปลูก (Wisessang, 2009) ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค อีกทั้งราดังกล่าวอาศัยอยู่ในดิน การฉีดพ่นสารเคมีลงไปในดินจึงต้องใช้ปริมาณมาก ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อมและการตกค้างของสารเคมีอยู่ในดิน และสารเคมีที่ใช้ในปริมาณมากส่งผลให้ราเกิดการดื้อยา (Amein et al., 2008) จากปัญหาดังกล่าวการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของราก่อโรคในข้าวจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นการควบคุมโรคแบบชีววิธี (biocontrol) ซึ่งปลอดภัยกับทั้งเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม *S. rolfsii* Sacc. ก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น โรคโคนเน่าและลำต้นเน่าในมะเขือเทศ (stem rot and collar rot disease) ซึ่ง Chanutsa et al. (2014) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งราชนิดนี้ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ รวมทั้งมีการศึกษาการยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า แบคทีเรียสามารถทำให้ราหยุดการเจริญ (Sawatdikarn, 2011) ในขณะ

ที่การศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุม *S. rolfsii* Sacc. ที่ทำให้เกิดโรคกล้าแห้งในข้าวยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการควบคุมการเจริญของราก่อโรคกล้าแห้งของข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งผลที่ได้จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารเคมี ลดสารตกค้างในนาข้าวให้กับเกษตรกร

วัตถุประสงค์

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* Sacc. สาเหตุของโรคกล้าแห้งต้นอ่อนของข้าวหอมมะลิ 105

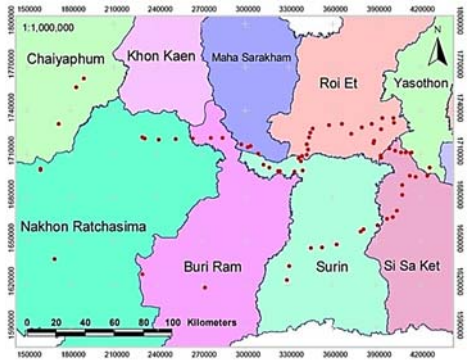
วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกและการศึกษาการก่อโรคกล้าแห้งของ S. rolfsii Sacc.

สำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคซึ่งคาดว่าเกิดจาก *S. rolfsii* Sacc. จากแหล่งต่าง ๆ จากนั้นแยกราจากชิ้นส่วนพืชโดยวิธี tissue transplant และนำราบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อใช้ในการทดลอง พร้อมทั้งศึกษาลักษณะการเกิดโรคในพืชอาศัยของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105

การคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชและดินในนาข้าวลึกลงประมาณ 5–10 เซนติเมตร พร้อมทั้งบันทึกพิกัดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ประกอบด้วยจังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร ร้อยเอ็ด มหาสารคาม นครราชสีมา และชัยภูมิ จัดทำแผนที่จุดเก็บตัวอย่างด้วยโปรแกรม ArcView GIS 3.3 (ภาพที่ 1) จากนั้นนำตัวอย่างดินมาคัดแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิคการเจือจางบนอาหาร nutrient agar (NA) เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะและสีแตกต่างกัน ตลอดจนลักษณะที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. rolfsii* Sacc.



ภาพที่ 1 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค

นำรา *S. rolfsii* Sacc. ที่แยกได้จากต้นข้าวที่เป็นโรคกล้าแห้งมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ส่วนแบคทีเรียนำมาเลี้ยงบนอาหารเอียง NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของรา *S. rolfsii* Sacc. ด้วยวิธี dual culture technique โดยใช้ cork borer เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของราวางบนอาหาร PDA จานใหม่ โดยวางให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงแตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ (อายุ 24 ชั่วโมง) มาขีดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับชิ้นวุ้นราที่วางไว้ก่อน เปรียบ-

เทียบกับชุดควบคุม (control) ที่วางเฉพาะชิ้นวุ้นรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้ทั้ง 3 ซ้ำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Kunasakdakul and Suwitchayanon, 2012) ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

เมื่อ R_1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของราในจานชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของราในจานชุดทดสอบ

การระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์

สกัดโครโมโซมแบคทีเรียด้วยชุดสกัด (Wizard® genomic DNA purification kit) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 nm จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ forward primer จำนวน 2 สาย (E8Fb และ St9F) จับคู่กับ reverse primer จำนวน 3 สาย (E1407R, Ser1603R และ B1524R) (ตาราง 1) ซึ่ง E8Fb ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ตามการรายงานของ Youssef et al. (2009) และ E1407R ตามรายงานของ Wuyts et al. (2002) ในขณะที่ St9F, Ser1603R และ B1524R ออกแบบโดยใช้โปรแกรม SnapGene®Viewer v.2.4 อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank ของ *Staphylococcus* sp. (JX458459.1), *Serratia* sp. (FM179752.1) และ *B. subtilis* (AB192294.2) ตามลำดับ

ตาราง 1 primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR

Primer	Sequence (5' ⟶ 3')	T_m (°C)
E8Fb	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55
St9F	RWTGAACGCTGGCGGC	58
E1407R	GACGGGCGGTGTGTRC	58
Ser1603R	TTCCSMTACGGYTACCTTG	55
B1524R	AAGGAGGTGATCCARCCG	58

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ตามรายการดังนี้ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 50 ng, 1x buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 8.3), 200 µM dNTP, 0.3 µM primers, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase (NEB) และปรับปริมาตรให้ครบ 50 ไมโครลิตร ด้วย nuclease-free water (Invitrogen) จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้นตอนที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวนรอบของปฏิกิริยาคือ 34 รอบ ขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทำปฏิกิริยาจนสมบูรณ์จะได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,500 bp จากนั้นนำ amplified 16S rDNA ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick gel extraction kit (Qiagen) แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye®Terminator v3.1: Applied Biosystems (1st BASE) ประเทศสิงคโปร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม

BLASTN 2.3.1+

ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเรือนปลูกพืชทดลอง

1) เตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. rolfsii* Sacc. มาเลี้ยงในอาหารเหลว GYP บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนได้แบคทีเรียมีความเข้มข้นที่ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)

2) เตรียมหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc.

นำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำประมาณ 1 คืน นำไปนึ่งให้สุกพอดี จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น เลี้ยงราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของรา 1 ชิ้น ใส่ในเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ

3) ทดสอบการควบคุมโรคกล้าแห้งสาเหตุจาก *S. rolfsii* Sacc.

ปลูกเมล็ดข้าวลงในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปลูกพืชอาศัย (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 ปลูกพืชอาศัยพร้อมกับลงหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc. ในเมล็ดข้าวฟ่างโดยวางห่างจากโคนต้นพืชอาศัย 1.5 เซนติเมตร จำนวน 4 เมล็ด และชุดการทดลองที่ 3 ปลูกพืชอาศัยและราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL ปริมาตร 3 มิลลิลิตร พร้อมกับลงหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc. ในเมล็ดข้าวฟ่าง โดยวางห่างจากโคนต้นพืชอาศัย 1.5 เซนติเมตร จำนวน 4 เมล็ด รอบ ๆ ต้นพืช (ทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ทุกชุดการทดลอง)

เก็บผลการทดลองทุกวันที่ 3 6 9 12 และ 15 หลังจากการปลูก ศึกษาลักษณะการเข้าทำลายต้นข้าวของ *S. rolfsii* Sacc. และคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละการเกิดโรคในชุดการทดลองที่ 2 เทียบกับร้อยละการรอดตายของต้นข้าวในชุดการทดลองที่ 3 คำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดตายของต้นพืชทดสอบตามสูตร

$$\text{ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดตาย}}{\text{จำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมด}} \times 100$$

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA)รวมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ $p = .05$ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ผลการวิจัย

ลักษณะของ S. rolfsii Sacc. *ที่ก่อให้เกิดโรคกล้าแห้ง*

จากการแยกราสาเหตุโรคกล้าแห้งจากต้นข้าว พบว่า ลักษณะเส้นใยหยาบฟูมีสีขาว การเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 3–5 วัน จากนั้นเส้นใยรา *S. rolfsii* Sacc. จะสานรวมกันในระยะแรกของการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมจะมีสีขาว จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้มที่มีขนาดแตกต่างกัน ราเริ่มสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมหลังจากสร้างเส้นใยประมาณ 4–6 วัน (ภาพที่ 2)

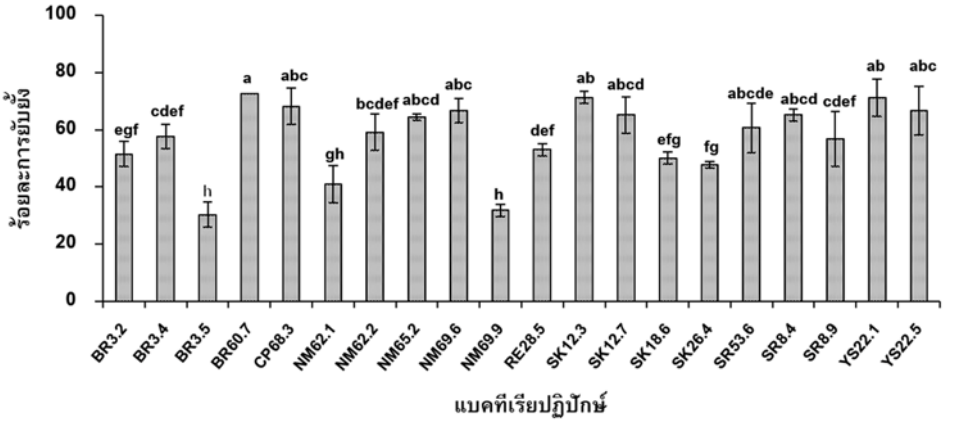
จากการทดสอบการเกิดโรคในพืชอาศัยของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ พบว่า ข้าวหอมมะลิงอกจากเมล็ดประมาณ 3 – 4 วัน เมื่อลงหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc. เส้นใยของราเจริญเข้าหาต้นข้าวหอมมะลิ 105 ภายใน 10 วัน โดยลักษณะของเส้นใยราเป็นสีขาวหยาบ เจริญแผ่ออกเป็นรัศมีปกคลุม

ภาพที่ 2 ลักษณะการสร้างเส้นใยราและการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมของ *S. rolfsii* Sacc. อายุ 3 วัน (ซ้าย) 5 วัน (กลาง) และ 7 วัน (ขวา)

บริเวณโคนต้นและพบแผลสีน้ำตาล เมื่อผ่านไป 13 วัน พบอาการของโรคชัดเจนคือ โคนต้นมีลักษณะเน่าแห้งสีน้ำตาล พบเม็ดสเคลอโรเทียมสีน้ำตาลเกาะบริเวณโคนต้น และเมื่อผ่านไป 16 วัน ทั้งลำต้นมีอาการเน่าแห้งสีน้ำตาล ยืนต้นตาย พบเม็ดสเคลอโรเทียมสีขาวและสีน้ำตาลเกาะบริเวณโคนต้นและกระจายทั่วไปบริเวณผิวดินรอบ ๆ โคนต้น

ผลการแยกแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

จากการเก็บตัวอย่างดินรอบรากพืชในแปลงนาข้าวจำนวน 70 ตัวอย่าง ในพื้นที่ 8 จังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดสุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร ร้อยเอ็ด มหาสารคาม บุรีรัมย์ นครราชสีมา และชัยภูมิ สามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีและสีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *S. rolfsii* Sacc. ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า มีแบคทีเรีย 20 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* Sacc. ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 30.30±4.29 ถึง 72.73±0.00 โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่ร้อยละ 61 – 75 จำนวน 9 ไอโซเลต กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ร้อยละ 50 – 60 จำนวน 7 ไอโซเลต และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำที่ร้อยละ 50 จำนวน 4 ไอโซเลต (ภาพที่ 3) โดยส่วนใหญ่ทำให้เส้นใยของราชะงักการเจริญ ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BR60.7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดร้อยละ 72.73± 0.00 (แยกได้จากพื้นที่ตำบลหายโศก อำเภอพุทไธสง จังหวัดบุรีรัมย์) รองลงมาคือ ไอโซเลต SK 12.3, YS22.1, CP68.3 และ NM69.6 มีประสิทธิภาพยับยั้งร้อยละ 71.22±2.14, 71.22±6.43, 68.19± 6.43 และ 66.67±4.29 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *S. rolfsii* Sacc. ที่เป็นสาเหตุของโรคกล้าแห้งในต้นอ่อนข้าวหอมมะลิ 105

หมายเหตุ สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงผลค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์

จากผลการทดสอบการควบคุมโรคสาเหตุจาก *S. rolfsii* Sacc. พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของราก่อโรคได้ดี จึงนำมาจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต BR3.2, BR3.4, BR3.5, SK18.6, YS22.1, YS22.5, SK 26.4, RE28.5, BR60.7, NM62.1, NM62.2, NM 65.2 และ CP68.3 มีความเหมือนกับ *B. subtilis* (ตาราง 2) ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต SR8.9, SK12.7 และ SR53.6 มีความเหมือนกับ *B. amyloliquefaciens* ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต SR8.4, SK12.3 และ NM69.9 มีความเหมือนกับ *B. vallismortis* และแบคทีเรียไอโซเลต NM69.6 มีความเหมือนกับ *B. aryabhattai* ซึ่งการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ 16S rDNA มีหลักเกณฑ์ทั่วไปคือ ใช้ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ร้อยละ 99 – 100 ในการจัดจำแนกระดับสกุล และสูงกว่าร้อยละ 99 ในระดับชนิด

ตาราง 2 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 20 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN

Isolate	closest NCBI strain	Identity	% Similarity	Accession number
BR3.2	*B. subtilis* strain LLP–4	1434/1434	100	KU821697.1
BR3.4	*B. subtilis* strain TM27IT	1302/1302	100	KX018275.1
BR3.5	*B. subtilis* strain TN27K	1281/1281	100	KX018276.1
SK18.6	*B. subtilis* strain LN16CAN	1335/1335	100	KX018269.1
YS22.1	*B. subtilis* strain TN8DA	1335/1335	100	KX018265.1
YS22.5	*B. subtilis* strain S1	1403/1403	100	KT381023.1
SK26.4	*B. subtilis* strain Sua-BAC001	1330/1330	100	EU870498.1
RE28.5	*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* strain PF8–3.1	1407/1407	100	KT720004.1
BR60.7	*B. subtilis* strain BR4	1415/1416	99	KU052617.1
NM62.1	*B. subtilis* strain L23	1419/1419	100	KU179336.1
NM62.2	*B. subtilis* strain SZMC 6179J	1400/1400	100	CP015004.1
NM65.2	*B. subtilis* strain NIIST B 580	1424/1429	99	KT884827.1
CP68.3	*B. subtilis* strain NAP1	1417/1418	99	KJ872852.1
SR8.9	*B. amyloliquefaciens* strain Ab-525	1405/1405	100	KJ879953.1
SK12.7	*B. amyloliquefaciens* strain SIB_Pb_R4	1413/1413	100	KX036564.1
SR53.6	*B. amyloliquefaciens* strain S15B5	1283/1286	99	KU363819.1
SR8.4	*B. vallismortis* strain 33 (BC3)	1409/1410	99	KF254574.1
SK12.3	*B. vallismortis* strain NBRC 101236	1413/1417	99	NR_113994.1
NM69.9	*B. vallismortis* strain TD3	1406/1408	99	HQ992817.1
NM69.6	*B. aryabhattai* strain IHBB 9820	1412/1412	100	KR085881.1

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเรือนปลูกพืชทดลอง

จากการทดสอบการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์กับต้นข้าวหอมมะลิ 105 โดยทดลอง 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ปลูกข้าวหอมมะลิ (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 ปลูกข้าวหอมมะลิพร้อมกับลงหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc. 4 จุดติดโคนต้นข้าว และชุดการทดลองที่ 3 ปลูกข้าวหอมมะลิพร้อมกับลงหัวเชื้อของ *S. rolfsii* Sacc. 4 จุด ติดโคนต้นข้าวพร้อมกับใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อต้นข้าวหอมมะลิอายุ 5 วัน ลงหัวเชื้อของราซ้ำในชุดการทดลองที่ 2 และชุดการทดลองที่ 3 โดยทดลองซ้ำชุดการทดลองละ 5 ครั้ง เก็บผลการทดลองทุกวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 หลังการปลูกข้าวหอมมะลิ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *S. rolfsii* Sacc. ไม่ให้เจริญเข้าทำลายต้นข้าวหอมมะลิได้ (ตาราง 3) โดยในชุดการทดลองที่ 3 หลังการปลูกข้าวหอมมะลิได้ 3 วัน เส้นใยรามีลักษณะเป็นสีขาว ขดเป็นก้อนกลม จากนั้นเส้นใยราจะค่อย ๆ ฝ่อลง เมื่อผ่านไป 6 วันไม่พบการเจริญของเส้นใยรา และไม่พบเม็ดสเคลอโรเทียม ซึ่งต่างกับชุดการทดลองที่ 2 ที่พบว่าหลังจากการปลูกข้าวได้ 3 วัน ลักษณะเส้นใยรามีสีขาวฟู เจริญแผ่ออกเป็นรัศมีในแนวราบกับพื้นดิน และเข้ายึดโคนต้นข้าว พบการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมสีขาว เมื่อผ่านไป 6 วัน เม็ดสเคลอโรเทียมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อลงหัวเชื้อของราซ้ำในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ในวันที่ 5 หลังการปลูก พบว่าเส้นใยรามีรูปแบบการเจริญไม่ต่างจากเดิมที่ลงราในครั้งแรก คือ ในชุดการทดลองที่ 3 การเจริญของเส้นใยราเจริญเป็นสีขาวฟู ขดเป็นก้อนกลม และฝ่อลงหลังจากลงหัวเชื้อของราได้ 3 วัน โดยไม่พบการเข้าทำลายต้นข้าวหอมมะลิ ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 เส้นใยของราเจริญเป็นสีขาวฟูแผ่ออก เป็นรัศมีกับผิวดิน เจริญเข้าทำลายต้นข้าวหอมมะลิ และสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมภายใน 3 วันหลังจากลงหัวเชื้อของรา

ตาราง 3 ค่าล็อกเฉลี่ยการรอดตายของต้นข้าวหอมมะลิ 105

ชุดการทดลอง	ค่าล็อกเฉลี่ยการรอดตาย
ชุดการทดลองที่ 1	2.00 ± 0.00^{b}
ชุดการทดลองที่ 2	1.64 ± 1.60^{a}
ชุดการทดลองที่ 3	2.00 ± 0.00^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงผลค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการคำนวณค่าล็อกเฉลี่ยการรอดตายของต้นข้าวหอมมะลิ 105 พบว่าในชุดการทดลองที่ 3 ที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ ต้นข้าวหอมมะลิ 105 มีค่าล็อกเฉลี่ยการรอดตายอยู่ที่ร้อยละ 2.00±0.00 โดยไม่พบการเข้าทำลายต้นข้าวหอมมะลิ 105 ของ *S. rolfsii* Sacc. เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 2 ที่มีค่าล็อกเฉลี่ยการรอดตายที่ 1.64±1.60 (ภาพที่ 4) ดังนั้นการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ส่งผลต่ออัตราการรอดตายเพิ่มขึ้นที่ร้อยละ 57.45 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่มีเพียงราก่อโรคพืช

สรุปและอภิปรายผล

ราสาเหตุโรคกล้าแห้งแยกจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรค พบลักษณะเส้นใยเจริญมีสีขาวหยาบฟู การเจริญเติบโตเร็วเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเริ่มสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็น

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4 การทดสอบการควบคุมโรคกล้าแห้งข้าวหอมมะลิ 105 ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์
(ก) ต้นข้าวหอมมะลิชุดควบคุม
(ข) ต้นข้าวหอมมะลิชุดควบคุมลงหัวเชื้อของรา
(ค) ต้นข้าวหอมมะลิชุดทดสอบการควบคุมโรค

ลักษณะการเจริญปกติของราชนิดนี้ที่แยกจากต้นพืชที่เป็นโรค (Sarma, 2002)

จากตัวอย่างดินรอบรากพืชในแปลงนาข้าวจำนวน 70 ตัวอย่าง ในพื้นที่ 8 จังหวัด สามารถแยกแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลต มีเพียง 20 ไอโซเลตเท่านั้นที่ให้ผลการยับยั้ง *S. rolfsii* Sacc. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BR 60.7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดและผลการจัดจำแนกพบว่า มีความคล้ายกับ *B. subtilis* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตสารต้านทานราได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin, mycosubtilin, subtuleneA (Fiddaman and Rossall, 1994; Prusky et al., 1989; Thasana et al., 2010) นอกจากนี้เคยมีรายงานการทดลองนำอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยง *B. subtilis* SSE4 มากรองและนำไปทดสอบการยับยั้งราโรคพืช พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งที่ร้อยละ 36.1 และ 64.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารต้านทานราที่แบคทีเรียสร้างขึ้นหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Thasana et al., 2010) มีรายงานผลการศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B4 และ *B. subtilis* B5 ในการควบคุมโรคเน่าขาวในหอม พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. cepivorum* ที่ร้อยละ 56.67 และ 46.67 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของราที่ร้อยละ 93.33 (Shalaby, 2013) นอกจากนี้มีการศึกษาการควบคุมโรครากเน่าของชูการ์บีท สาเหตุจาก *S. rolfsii* Sacc. พบว่า *Pseudomonas fluorescens* ยับยั้งการเจริญเส้นใยได้ที่ร้อยละ 48.9 และ *B. subtilis* EPCO1 มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีที่สุดร้อยละ 44.4 (Rasu et al., 2013) ในการศึกษานี้ ไอโซเลต BR3.2, BR3.4, BR3.5, SK18.6, YS22.1, YS22.5, SK 26.4, RE28.5, NM62.1, NM62.2, NM65.2 และ CP68.3 มีความเหมือน *B. subtilis* เช่นกัน

อีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ คือ การสร้าง chitinase โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำลาย โครงสร้างผนังเซลล์ของรา เมื่อตรวจดูลักษณะผนังเซลล์ของราที่เลี้ยงพร้อมกับ *B. subtilis* SG6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าผนังเซลล์ของราถูกทำลาย ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกมา (Zhao et al., 2014) ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต SR8.9, SK12.7 และ SR53.6 มีความเหมือน *B. amyloliquefaciens* ความสามารถของ *B. amyloliquefaciens* ในการยับยั้งการเจริญของราเป็นผลมาจากการสร้างสารกลุ่ม volatile compounds (VOCs) เช่น benzothiazoles phenol และ 2,3,6–trimethylphenol ที่สร้างจาก *B. amyloliquefaciens* NJN-6 สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์รา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Yuan et al., 2012) โดย VOCs ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างขึ้นมีผลกระตุ้นให้พืชสร้าง salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) และ ethylene (ET) สารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญเปรียบเสมือนภูมิคุ้มกันของพืชในการป้องกันต้นพืชจากเชื้อโรคต่าง ๆ (Jia

et al., 2012; Ponzio et. al., 2013) แบคทีเรียไอโซเลต SR8.4, SK12.3 และ NM69.9 มีความเหมือน *B. vallismortis* โดยการศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้พบว่า มีการเจริญเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ส่งผลเสียต่อพืช (endophyte) และต้านทานราได้หลายชนิด ซึ่ง *B. vallismortis* ZZ185 สามารถยับยั้งราได้ โดยทดลองใช้ทั้งสารที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียด้วย *n*-butanol และอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย สารที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างขึ้นคือ Bacillomycin D และยังพบการสร้างสารนี้ใน *Bacillus* spp. อื่นด้วย (Zhao et al., 2010) แบคทีเรียไอโซเลต NM69.6 มีความเหมือน *B. aryabhattai* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช (rhizobacteria) โดยสร้างสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนพืชออกมา สารเหล่านี้ยังส่งผลทางอ้อมต่อการกระตุ้นให้พืชต้านทานโรค (induced systemic resistance, ISR) กลุ่มของ rhizobacteria สามารถสร้างสารต้านทานราได้หลายชนิด เช่น pyrrolnitrin, 2,4–diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, visconinamide และ tensin (Ahemad and Kibret, 2014; Lee et al., 2012)

ในการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราเป็นกลุ่ม *Bacillus* spp. เพราะแบคทีเรียที่พบมากในดินและยังช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีพร้อมผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้หลากหลายชนิด และแบคทีเรียกลุ่มนี้ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดี (Ajilogba et al., 2013) โดย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทดสอบการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์กับต้นข้าวหอมมะลิด้วยการปลูกในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี โดยการยับยั้งในช่วงแรกเส้นใยรามีลักษณะเป็นสีขาวขดเป็นก้อนกลม จากนั้นจะค่อย ๆ ฝ่อลงจนไม่พบการเจริญของเส้นใยรา และไม่พบการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียม ดังนั้นการผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงไปจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายของต้นพืช ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืช และหากนำไปใช้ในพื้นที่มีการเพาะปลูกข้าวก็จะช่วยให้เกษตรกรลดต้นทุนการใช้สารเคมีพร้อมทั้งส่งผลในการลดความเสี่ยงที่ร่างกายจะได้รับสารเคมี นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ว่าการควบคุมโรคโดยชีววิธีมีประสิทธิภาพและเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีมากในประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการควบคุมโรคในพืชชนิดต่าง ๆ ที่เป็นพืชอาศัยของ *S. rolfsii* Sacc.
2. พัฒนาหรือปรับปรุงแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาใช้ในแปลงของเกษตรกร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ (รหัสโครงการ 2557A13802019)

เอกสารอ้างอิง

Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University – Science** 26: 1–20.

Ajilogba, C. F., Babalola, O. O., and Ahmad, F. (2013). Antagonistic effects of *Bacillus*

species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. **Ethno-Medicine** 7(3): 205–216.

Amein, T., Omer, Z., and Welch, C. (2008). Application and evaluation of *Pseudomonas* strains for biocontrol of wheat seedling blight. **Crop Protection** 27: 532–536.

Chaisattapagon, C., Nakwattananukul, S., Opanukul, W., and Mongkoltanatus, J. (2007). **Testing on Rice Seeder and Rice Broadcaster.** Bangkok: Agricultural Engineering Research Institute, Department of Agriculture. (in Thai)

Chantarasa-ard, S. (2010). Rice diseases and farmer manipulation. **Ladda Newsletter** 9(34): 2–4. (in Thai)

Chanutsa, N., Phonkerd, N., and Bunyatratchata, W. (2014). Potential of *Pseudomonas aeruginosa* to control *Sclerotium rolfsii* causing stem rot and collar rot disease of tomato. **Journal of Advanced Agricultural Technologies** 1(2): 132–135.

Fiddaman, P. J., and Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology** 76(4): 395–405.

Jia, C., Zhang, L., Liu, L., Wang, J., Li, C., and Wang, Q. (2012). Multiple phytohormone signaling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Experimental Botany** 64(2): 637–50.

Kunasakdakul, K., and Suwitchayanon, P. (2012). Antimicrobial activities of chili and black pepper extracts on pathogens of Chinese kale. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences** 11(2): 135–141.

Lee, S., Ka, J. O., and Song, H. G. (2012). Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhattai* in microcosm soil. **Journal of Microbiology** 50(1): 45–49 .

Ponzio, C., Gols, R., Pieterse, C. M. J., and Dicke, M. (2013). Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. **Functional Ecology** 27: 587–598.

Prusky, D., Gold, S., and Keen, N. T. (1989). Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 35: 121–133.

Rasu, T., Sevugapperumal, N., Thiruvengadam, R. and Ramasamy, S. (2013). Biological control of sugarbeet root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Biological** 2: 2277–4394.

Rice Department. (2015). **Current situation of world rice production 2015/2016.** Retrieved from web site: http://www.ricethailand.o.th/home/images/november58.pdf, April 4, 2016

Sarma, B. K., Singh, U. P., and Singh, K. P. (2002). Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. **Mycologia** 94(6): 1051–1058.

Sawatdikarn, S., and Samithiarporn, S. (2011). Effects of antagonistic microorganisms on growth of pathogenic fungus of dirty panicle disease in rice. **Agricultural Science Journal** 42(2): 169–172. (in Thai)

Shalaby, E., Ghoniem, E., and El-Diehi, A. (2013). Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. **Annals of Microbiology** 63(4): 1579–1589.

Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Ruchirawat, S., and Loprasert, S. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtuleneA, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β-amino acid. **FEBS Letters** 584(14): 3209–3214.

Weerapat, P. (1965). Reactions of rice varieties to seedling blight caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Proceeding of the 4th national conference on Agriculture and Biology Plant and Biological Science, and Animal Science section** (pp. 294–302). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Wisessang, O. (2009). **Manual of pesticide usage**. Bangkok: Plant Protection Research and Development Office. (in Thai)

Wuyts, J., Van de Peer, Y., Winkelmans, T. and De Wachter, R. (2002). The European database on small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research** 30(1): 183–185.

Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A., and Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. **Applied and Environmental Microbiology** 75(16): 5227–5236.

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., and Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense.* **Applied and Environmental Microbiology** 78(16): 5942–5944.

Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M., and Liu, Y. (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE** 9(3): e92486.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C. and Gu, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ 185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology** 101(1): 292–297.