กิจกรรมการยับยั้งเชื้อโรคในข้าวด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ANTAGONISTIC ACTIVITIES AGAINTS RICE PATHOGENS BY ENDOPHYTIC BACTERIA

วิริยะ แซ่เฮง
วุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล
ศรินทิพย์ แก้วงาม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อโรคในข้าวด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ANTAGONISTIC ACTIVITIES AGAINTS RICE PATHOGENS BY ENDOPHYTIC BACTERIA

วิริยะ แซ่เฮง
วุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล
ศรินทิพย์ แก้วงาม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTAGONISTIC ACTIVITIES AGAINTS RICE PATHOGENS BY ENDOPHYTIC BACTERIA

WIRIYA SAEHENG
WUTTHIPONG PATTARASAIKUL
SARINTHIP KAEWNGAM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	กิจกรรมการยับยั้งเชื้อโรคในข้าวด้วยแบคทีเรียแอนโดไฟต์ Antagonistic activities against rice pathogens by endophytic bacteria
ชื่อนักศึกษา	นายวิริยะ แซ่เฮง รหัสนักศึกษา 55051394 นายวุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล รหัสนักศึกษา 55051395 นางสาวศรินทิพย์ แก้วงาม รหัสนักศึกษา 55051396
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา-อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ	
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ กิจกรรมการยับยั้งเชื้อโรคในข้าวด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์
ชื่อนักศึกษา นายวิริยะ แซ่เฮง รหัสนักศึกษา 55051394
นายวุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล รหัสนักศึกษา 55051395
นางสาวศรินทิพย์ แก้วงาม รหัสนักศึกษา 55051396
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

ข้าวถือเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นรายได้หลักของประเทศไทย และยังนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ แต่เกษตรกรมักประสบกับปัญหาโรคข้าวที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและรา คือ โรคขอบใบแห้ง มีสาเหตุมาจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และโรคใบไหม้ มีสาเหตุมาจาก *Pyricularia grisea* sacc. โครงงานพิเศษนี้ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 30 ไอโซเลตที่คัดแยกจากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 สายพันธุ์หอมนิล และสายพันธุ์ไรซ์เบอรี่ ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Dual Culture พบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea* ถูกยับยั้งเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 3048 และ 3052 เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* สามารถเจริญได้เพียงร้อยละ 22.75±7 เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2015 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture ทุกไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี Well Diffusion และ Disc Diffusion ได้ ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส, โปรติเอส และเซลลูเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ 4 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ 20 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ 16 ไอโซเลต สามารถสร้างได้ทั้งเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้ 3 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลสได้ 1 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์โปรติเอสและเซลลูเลสได้ 12 ไอโซเลต และไอโซเลต 2017 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้อาจมีบทบาทสำคัญช่วยให้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ผลการทดลองจากโครงงานพิเศษนี้แสดงให้เห็นว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่นำมาทดสอบอาจมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต่างๆ โดยเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่

คำสำคัญ : ข้าว, แบคทีเรียเอนโดไฟต์, โรคขอบใบแห้ง, โรคใบไหม้, *Pyricularia grisea*, *Xanthomonas oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antagonistic Activities Against Rice Pathogens by Endophyte Bacteria
Students	Mr. Wiriya Saeheng Student ID 55051394
	Mr. Wutthipong Pattarasaikul Student ID 55051395
	Miss Sarinthip Kaewngarm Student ID 55051396
Degree	Bachelor of Science (Induatrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Asst.Prof.Dr. Chokchai Kittiwongwatthana

Abstract

Rice (*Oryza sativa*) is an important crop that is the main income of Thailand and planted widely in different regions. But the farmers often faced with the problem of rice is caused by bacteria and fungi disease. Bacterial Leaf Blight is caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Rice blight is caused by *Pyricularia grisea* sacc. The endophytic bacteria were isolated from three species rice that are กข.47, Homnin and Riceberry. And tested to inhibit rice pathogens. First tested by Dual Culture Method. *P. grisea* can not grow when tested with endophytic bacteria isolate 3048 and 3052. *X. oryzae* can grow in 22.75 ± 7% when tested by endophytic bacteria isolate 2015. Then, all isolates of Endophytic bacteria that from tests with Dual Culture Method are not inhibit the growth of two pathogens in rice with Well Diffusion Method and Disc Diffusion Method. Enzyme activities (chitinase, protease and cellulase) of endophytic bacteria are part of promote to inhibit the growth of pathogens showed that many isolates of endophytic bacteria can create enzymes. The pathogens inhibition is requiring living cells of endophytic bacteria.

Keywords : Endophytic Bacteria, Rice, Rice Blast Disease, Leaf Blight Disease, *Pyricularia grisea*, *Xanthomonas oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาแนวทางในการค้นคว้า การทำวิจัย ตลอดการดำเนินงาน รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขการเขียนโครงงานพิเศษเล่มนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ และ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ ที่เสียสละเวลาตรวจทาน และพิจารณาโครงงานพเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่นักวิจัย พี่นักวิทยาศาสตร์ พี่นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือระหว่างการดำเนินงานวิจัย

วิริยะ แซ่เฮง
วุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล
ศรินทิพย์ แก้วงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ข้าว	3
2.2 โรคข้าว	3
2.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคข้าว	6
2.4 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Endophytic Bacteria)	9
2.5 กิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรค	9
2.6 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค	11
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	36
ภาคผนวก ก	36
ภาคผนวก ข	39
ภาคผนวก ค	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ Chitinase, Protease และ Cellulase ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าว..... 25

ข-1 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture..... 39

ข-2 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture..... 40

ข-3 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 อาการของโรคขอบใบแห้ง 5

2.2 อาการของโรคไหม้ในส่วนของใบ และอาการไหม้บริเวณคอรวง 6

2.3 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อ *P. grisea* 8

2.4 โครงสร้างเซลลูโลส 12

4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยวิธี Dual Culture 19

4.2 แสดงร้อยละของอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *X. oryzae* ที่ยับยั้งได้โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 20

4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยวิธี Dual Culture 21

4.4 แสดงร้อยละของอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *P. grisea* ที่ยับยั้งได้โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 22

4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยวิธี Well Diffusion 23

4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยวิธี Well Diffusion 24

4.7 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ บนอาหาร NA ที่เติม 1% Colloidal Chitin 26

4.8 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ บนอาหาร Carboxymethylcellulase Agar (CMC) 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของโลก ประชากรส่วนใหญ่นิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียที่มีความนิยมบริโภคและเพาะปลูกข้าวมากกว่าภูมิภาคอื่น ๆ ซึ่งในประเทศไทยมีลักษณะภูมิประเทศส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ราบลุ่ม มีความเหมาะสมต่อการเพาะปลูก จึงมีการเพาะปลูกข้าวอย่างแพร่หลายในภูมิภาคต่าง ๆ และเป็นรายได้หลักของประเทศในการส่งออก แต่ปัญหาสำคัญของการเพาะปลูกข้าว คือ โรคต่าง ๆ ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและรา เช่น โรคขอบใบแห้ง มีสาเหตุมาจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* โรคใบไหม้ มีสาเหตุมาจาก *Pyricularia grisea* sacc. เป็นต้น ส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวลดลง จึงต้องมีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโรค ถึงแม้ว่าสารเคมีจะมีประโยชน์ต่อการเจริญของพืช ช่วยลดความเสียหายของผลผลิตจากโรคพืชต่างๆ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น แต่การใช้สารเคมีอย่างไม่เหมาะสมและมากเกินความจำเป็น อาจก่อให้เกิดผลกระทบในด้านต่างๆ ทั้งด้านสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค ด้านสิ่งแวดล้อม และด้านเศรษฐกิจของประเทศ ปัจจุบันจึงมีการนิยมใช้วิธีการทางชีวภาพมาทดแทนการใช้สารเคมี เพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถทำงานร่วมกับพืชในกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การสร้างฮอร์โมนพืช การสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และสามารถเพิ่มความต้านทานต่อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชได้ จึงนำมาศึกษาสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมและต้านทานโรคในพืช เพื่อนำสารที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ผลิตได้ มาทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคในข้าว

โครงงานพิเศษนี้ศึกษากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยแยกสารออกฤทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว รวมทั้งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วยส่งเสริมแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานพิเศษนี้ศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียเอนไฟต์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว โดยทดสอบด้วยวิธี Dual culture และทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ตลอดจนศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งเสริมแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงกิจกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว

2) ได้สารออกฤทธิ์ที่สกัดจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์

3) ทราบถึงกิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ข้าว (*Oryza sativa* L.)

2.1.1 ความหมาย

ข้าว มีความหมายตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน คือ "ชื่อไม้ล้มลุกหลายชนิด หลายสกุล อยู่ในวงศ์ Gramineae ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า วงศ์ Gramineae สกุล *Oryzeae* ซึ่งสกุลนี้มีอยู่ประมาณ 25 ชนิด แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่เพาะปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร คือ *Oryza sativa* ที่นิยมปลูกกันมาก และ *Oryza glaberrima* นิยมปลูกกันในบางส่วนของทวีปแอฟริกา ส่วนชนิดอื่นๆ ที่เหลือเป็นข้าวที่เจริญอยู่ในป่า (ชาญ, 2536)

ข้าวเป็นอาหารหลักที่สำคัญของมนุษย์ โดยประชากรโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (อภิชาต และคณะ, 2555) ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวมากประเทศหนึ่ง โดยมีพื้นที่การเพาะปลูกมากในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จึงทำให้ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ โดยมีผลผลิตข้าวในปี 2556-2557 อยู่ที่ 20.5 ล้านตัน ซึ่งอยู่ในลำดับที่ 6 ของการผลิตข้าวของโลก และมีการส่งออกข้าวในปี 2556-2557 อยู่ที่ 10.3 ล้านตัน ซึ่งส่งออกข้าวอยู่ในลำดับที่ 3 ของการส่งออกข้าวของโลก (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2557) แม้ว่าประเทศไทยจะมีผลผลิตของข้าวมาก แต่ประเทศไทยก็ประสบปัญหาเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของโรคข้าว เช่น โรคขอบใบแห้ง โรคใบไหม้ และโรคเมล็ดด่าง เป็นต้น (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554) ทำให้ผลผลิตข้าวในประเทศไทยเสียหาย จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันและปราบปรามโรคข้าวอย่างเหมาะสม

2.2. โรคข้าว

ในปัจจุบัน สาเหตุของการสูญเสียผลผลิตข้าวเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ดินที่ใช้ในการเพาะปลูกไม่สมบูรณ์ สภาพอากาศไม่เอื้ออำนวยต่อการเพาะปลูก เกิดภัยแล้ง หรือเกิดอุทกภัย แต่สาเหตุที่สำคัญที่สุดของการสูญเสียผลผลิตข้าวคือ โรคข้าว โดยเฉพาะโรคข้าวที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและรา เช่น โรคขอบใบแห้ง โรคใบไหม้ เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยเสียหายและสูญเสียผลผลิตข้าวจากสาเหตุนี้มากกว่า 20% (Boukaew and Prasertsan, 2014) และยังมีการระบาดของโรคอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและความชื้นเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค (นวรัตน์ และคณะ, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Disease)

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial Leaf Blight Disease)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomanas oryzae* pv. *oryzae*

การแพร่ระบาด เชื้อแบคทีเรียสาเหตุของการเกิดโรคขอบใบแห้งสามารถแพร่ไปกับน้ำ ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง และสภาพที่มีฝนตก ลมพัดแรง จะช่วยทำให้โรคแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางรวดเร็ว (กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย, 2557)

อาการ โรคนี้พบในข้าวได้ตั้งแต่ในระยะกล้า หลังปักดำ และระยะแตกกอ (พยอม และพูนศักดิ์, 2548)

ระยะกล้า จะพบรอยขีดลักษณะช้ำน้ำที่ขอบในด้านล่าง และต่อมาประมาณ 7 - 10 วัน รอยช้ำนี้จะมีสีเหลืองลามไปตามขอบใบข้าว และใบข้าวจะตายอย่างรวดเร็ว ในระยะกล้านี้จะสังเกตอาการของโรคได้ยาก

ระยะปักดำ โรคขอบใบแห้งจะแสดงอาการในระยะหลังปักดำประมาณหนึ่งถึงหนึ่งเดือนครึ่ง ซึ่งอาการในระยะนี้จะเกิดรอยขีดช้ำ บริเวณขอบใบใกล้ปลายใบ ต่อมาแผลจะกลายเป็นสีเหลือง และขยายไปตามความยาวและความกว้างของใบ ขอบแผลเป็นรอยหยัก เมื่อเวลาผ่านไปแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เกิดโรคจะม้วนตามความยาว ในกรณีที่มีการเกิดโรคอย่างรุนแรงเชื้อก่อโรคจะเข้าทำลายต้นข้าวทางราก และส่วนล่างของลำต้น โดยเชื้อก่อโรคจะเข้าไปในส่วนของท่อน้ำ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำและท่ออาหาร ส่งผลให้ต้นข้าวหรือใบข้าวเหี่ยวและเฉาตายอย่างรวดเร็ว เรียกอาการในลักษณะนี้ว่า ครีเสค (Kresek)

ระยะแตกกอ เป็นอาการที่พบได้ทั่วไปในพื้นที่นาข้าวของเกษตรกร แผลมักจะเป็นแถบช้ำชุ่มน้ำที่ขอบใบห่างจากปลายใบลงมาเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายตามด้านกว้างและยาวของขอบใบ แผลอาจจะเกิดที่ขอบใบด้านใดด้านหนึ่งก่อนหรือเกิดพร้อมกันสองข้างก็ได้ กรณีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจะพบกลุ่มเซลล์ในรูปหยดน้ำสีครีมคล้ายยางสนกลม ๆ ขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด (Bacteria ooze) บนขอบแผลที่แสดงอาการของโรค ถ้าอาการของโรครุนแรงมากแผลจะขยายไปทั่วทั้งใบและเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อน จากนั้นจะแห้งตายอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 อาการของโรคขอบใบแห้ง
ที่มา : http://www.knowledgebank.irri.org/decision-tools/rice-doctor/rice-doctor-fact-sheets/item/bacterial-blight
สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2559

2.2.2 โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อรา (Fungal Disease)

โรคไหม้ (Rice Blast Disease)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* sacc. ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตข้าวได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (พูนศักดิ์, 2548)

การแพร่ระบาด สปอร์ของเชื้อก่อโรคไหม้แพร่ไปโดยลม และเมื่อตกลงบนข้าวที่มีปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมก็จะเกิดการระบาดของโรคขึ้น (ชาญ, 2536)

ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ได้แก่

1.) พันธุ์ข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค

2.) ความชื้นในอากาศสูง ถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงเกิน 95 เปอร์เซ็นต์ สปอร์จะเข้าทำลายเซลล์ของข้าวได้ภายใน 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21-27 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิในประเทศไทยมีความเหมาะสมอย่างมากในการเกิดการระบาดของโรค

3.) ความหนาแน่นของต้นข้าว และใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไป ถ้าต้นข้าวหนาแน่นมากเกินไปจะทำให้เกิดการอับลม ความชื้นในแปลงจะยิ่งสูง ทำให้ง่ายต่อการเกิดโรค และถ้าใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้ต้นข้าวมีความสมบูรณ์มาก อวบน้ำ เซลล์จะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงหลายชนิด

4.) ข้าวไร่และข้าวขาดน้ำ ข้าวไร่และข้าวนาสวนที่ปล่อยให้น้ำแห้ง และข้าวเจริญงอกงามจากการเติมปุ๋ยไนโตรเจนจะได้รับความรุนแรงของโรคไหม้มากกว่าข้าวซึ่งมีน้ำขัง สาเหตุก็คือ สารซิลิกอน ถ้ามีสานนี้อยู่มากในเซลล์ของใบจะยิ่งทำให้เซลล์แข็ง ยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคถ้าข้าวขาดน้ำ จะทำให้สารซิลิกอนในดินถูกดูดซึมขึ้นไปสู่ใบได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ข้าวที่ขาดน้ำมีเซลล์ที่เปราะบางกว่าข้าวที่อยู่ในบริเวณน้ำขัง จึงเกิดโรคไหม้ได้มากกว่า

อาการ โรคใบไหม้นี้จะพบในข้าวได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะกล้าไปจนถึงระยะที่ข้าวออกรวง (นาถยา, 2556) ดังนี้

ระยะกล้า ส่วนของใบจะเกิดแผลเป็นจุดสีน้ำตาลและบริเวณตรงกลางมีสีเทาคล้ายรูปตา ความกว้างของแผลประมาณ 2-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบ ถ้าโรครุนแรงต้นกล้าจะแห้งฟุบตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้

ระยะแตกกอ อาการพบได้ที่ใบ ข้อต่อของใบและข้อต่อของลำต้น ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะแผลช้ำสีน้ำตาลดำ และมักหลุดจากกาบใบเสมอ

ระยะข้าวออกรวง (โรคเน่าคอรวง) ข้าวที่เริ่มออกรวง หากถูกเชื้อราเข้าทำลายเมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยวจะปรากฏเป็นรอยแผลช้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก

รูปที่ 2.2 อาการของโรคไหม้ในส่วนของใบ และอาการไหม้บริเวณคอรวง
ที่มา : http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/RiceBlast.aspx
สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2559

2.3. เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคข้าว

2.3.1 เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Domain *Bacteria*

Phylum *Proteobacteria*

Class *Gammaproteobacteria*

Order *Xanthomonadales*

Family *Xanthomonadaceae*

Genus *Xanthomonas*

Species *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ลักษณะทั่วไป

เชื้อ *Xanthomonas oryzae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ขนาดความกว้าง 0.4 – 0.7 μm ยาว 0.7 – 2.0 μm เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาเส้นเดียว โคโลนีมีลักษณะกลม ผิวเรียบมันเยิ้ม สีเหลือง ลักษณะของสีเหลืองนี้เกิดจากสาร brominatedarylpolyenes หรือมีชื่อเรียกว่า Xanthomonadins ต้องการอากาศในการเจริญ และไม่สร้างสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Nino-Liu *et al.*, 2006) ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 6 - 6.5 ปกติเชื้อจะอยู่แบบเดี่ยวๆ หรืออาจจับกันเป็นคู่หรือสายยาว เมื่อทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่าไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไม่สร้างแอมโมเนีย ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตได้ สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี (แสงชัย, 2552)

การก่อโรค

การเข้าทำลายต้นข้าวของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* มีลักษณะแบบดูดซึม (systemic) โดยจะเข้าทำลายได้ 2 ทาง ได้แก่ ทาง hydathode และทางบาดแผล โดย hydathode คือโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายปากใบ โดยทั่วไปจะพบ hydathode บริเวณด้านบนใบใกล้ส่วนปลายใบข้าว ซึ่งใบข้าวจะมีการคายน้ำทาง hydathode ในตอนเช้าหยดน้ำที่ออกมาทาง hydathode นี้จะถูกส่งผ่านที่ว่างระหว่างเซลล์พาเรนไคมา ซึ่งหยดน้ำนี้จะสัมผัสกับน้ำในท่อน้ำท่ออาหาร (vascular system) ของพืช ดังนั้นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจึงมีโอกาสปนเปื้อนในหยดน้ำผ่านเข้ามาทาง hydathode นอกจากนี้ยังอาจมีสารอินทรีย์และสารอนินทรียที่แบคทีเรียก่อโรคใช้เป็นแหล่งอาหารได้ ส่วนทางบาดแผล (Wounds) เป็นลักษณะการทำลายที่เกิดขึ้นมากกว่าทาง hydathode หรือทางช่องเปิดตามธรรมชาติ (แสงชัย, 2552)

2.3.2 เชื้อรา *Pyricularia grisea*

เชื้อรา *Pyricularia grisea* จัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kingdom Fungi

Division Ascomycota

Class Sordariomycetes

Order Magnaporthales

Family Magnaporthaceae

Genus *Pyricularia*

Species *Pyricularia grisea*

ลักษณะทั่วไป

เชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นชื่อเรียกเชื้อก่อโรคข้าวในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่หากสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมเชื้อราจะสร้างแอสโคสปอร์ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เรียกเชื้อราก่อโรคข้าวในระยะนี้ว่า *Magnaporthe grisea* (พยอม และคณะ, 2548) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้มี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553)

รูปที่ 2.3 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อ *P. grisea*

ที่มา : http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/RiceBlast.aspx

สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2559

การก่อโรค

โรคไหม้ในข้าวนี้จะเกิดโรค โดยเชื้อราจะสร้างสปอร์ (Conidia) ปลิวไปในอากาศ เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส และเมื่อสปอร์ปลิวไปตกบนใบข้าวที่มีความเปียกชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมง จากนั้นสปอร์ของเชื้อจะเริ่มเจริญโดยใช้เวลาเพียง 30 - 90 นาที และอาศัยน้ำบนใบข้าวสำหรับการงอกเส้นใย และสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

appressorium เพื่อเกาะยึดและใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า prenetration peg แทงเข้าไปในใบและใช้อาหารในใบข้าวสำหรับการเจริญ ทำให้เกิดโรคไหม้ใบข้าว การเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคไหม้ในข้าวนี้มักเกิดในช่วงเวลากลางคืน ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างเย็นและมีความชื้นสูง (พูนศักดิ์, 2548)

2.4 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Endophytic Bacteria)

แบคทีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถอาศัยและเจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้ โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช (ณัฐวุฒิ, 2548) ซึ่งคำว่า “Endophyte” เกิดจากการนำคำ 2 คำมารวมกัน คือคำว่า “Endo” หมายถึง ภายใน และ “Phyte” หมายถึง พืช ดังนั้น Endophyte จึงหมายถึง สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในพืช (Chanway, 1996) ในปัจจุบันมีการศึกษาแบคทีเรียเอนไฟต์พบว่า มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว (สุจิตตรา และคณะ, 2556) และมีความสัมพันธ์กับพืชหลายชนิด เพื่อช่วยในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการเจริญและการยับยั้งสาเหตุของโรคพืชได้ (นงลักษณ์, 2551)

2.5 กิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรค

2.5.1 กลไกการควบคุมโรค

กิจกรรมการควบคุมโรคที่ใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กัน คือ การควบคุมโรคโดยใช้ชีววิธี ซึ่งมีกิจกรรมที่เกี่ยวข้อง 3 แบบ คือ

1) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และการทำลายเชื้อโรค (lysis)

2) การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition)

3) การเป็นปรสิต (parasitism) และเป็นผู้ล่า (predator)

1) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) การทำลายเชื้อโรค (lysis)

การสร้างสารปฏิชีวนะ หมายถึง การสร้างสารโดยสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง และสารนั้นสามารถยับยั้งสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่งสารนั้นอาจส่งผลถึงการเจริญเติบโตหรืออาจทำให้สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งตายได้ โดยสารที่สร้างขึ้นนั้นอาจซึมผ่านเข้าสู่เซลล์และเกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ทำให้มีผลต่อการยับยั้งสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยเรียกสารนี้ว่า สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

การทำลายเชื้อโรค (lysis) เป็นคำจำกัดความกว้างๆ ของการเกิดการทำลาย, การไม่สามารถรวมกันได้, ความไม่สามารถในการละลาย หรือการเน่าสลายในสารประกอบของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการในการผลิตสารเหล่านั้น และผลของสารเหล่านั้นที่มีต่อเซลล์ของพืช

แม้ว่าการย่อยผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตด้วยน้ำย่อย ที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ภายนอกนั้น เคยมีผู้ให้คำจำกัดความว่า การทำลายเชื้อโรค (lysis) ซึ่งความจริงแล้วเรียกว่า การทำลายเชื้อโรคจากภายนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเข้าทำลายเชื้อโรคจากภายใน (endolysis) จะพิจารณาว่าเป็นความไม่สามารถในการละลายของส่วน Protoplast ของเซลล์ โดยปราศจากการย่อยของผนังเซลล์ แม้ว่าจะเกิดชักนำด้วยตัวเองหรือจากภายนอกก็ตาม การเข้าทำลายของเชื้อโรคภายใน (endolysis) เกิดขึ้นจาก

1. การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึมภายใน ซึ่งเกิดจากการมีอายุมากหรือแก่, การขาดธาตุอาหาร, ความไม่สามารถในการใช้ธาตุอาหารเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น การขาดออกซิเจน, หรือการสะสมของสารพิษที่สร้างขึ้นมาเอง ความเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้เคยมีผู้เรียกว่า autolysis และยังเป็นผลจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย ซึ่งเพิ่มขยายจำนวนอยู่รอบๆ เส้นใยของรา ที่ทำให้เส้นใยของราเกิดรูรั่วเพิ่มมากขึ้นและตายในที่สุด ลักษณะดังกล่าวนี้ปกติเรียกว่า heterolysis จุลินทรีย์อาจเป็น saprophyte อยู่บนผิวหน้าของเส้นใยที่ตายแล้ว หรืออาจเป็นอันตรายต่อเส้นใยราที่มีชีวิตด้วยการสร้างสารพิษ ด้วยการเพิ่มการไหลของเหลวออกจากเซลล์ หรือโดยการใช้ออกซิเจนและธาตุอาหารจากภายนอก การเกิดการเข้าทำลายของเชื้อโรคภายใน (endolysis) นั้นส่วนมากแล้วจะเกิดขึ้นในดิน

2. สารพิษที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตอื่น หรือจากการเน่าสลายของอินทรีย์วัตถุ หรือจากการที่มนุษย์ใช้สารป้องกันกำจัดรา ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับต่ำ และใช้ความร้อนอ่อนๆ มีผลต่อเส้นใยรา *Armillaria mellea* อ่อนแอ และง่ายต่อการเข้าทำลายของ *Trichoderma viride* เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวนี้เป็นผลจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งอาจซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ ไม่สามารถละลายรวมกับ protoplasm มีผลทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อโรคภายใน (endolysis) นี้ได้แก่ เซลล์แห้งตายเนื่องจากแบคทีเรียอาจจะถูกยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น bacteria จากแอคติโนมัยซีส เช่น streptomycin และจากรา เช่น เพนนิซิลิน

3. การเกิดปฏิกิริยา การสร้างภูมิคุ้มกัน (immunological reaction) แบคทีเรียรวมกับ antibody ที่สร้างโดยสัตว์ซึ่งเกิดปฏิกิริยาป้องกัน มีผลต่อการซึมผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงทำให้สารในเซลล์รั่วออกมา สิ่งนี้มักเกิดกับเชื้อโรคของสัตว์ และอาจเกี่ยวข้องกับความตายอันเนื่องจากความไม่สามารถรวมกันกับ cytoplasm (lethal cytoplasmic incompatibility) หรือเรียกว่า Killer reaction ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างสายพันธุ์ (strains) ที่แตกต่างกันของราในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น (เกษม, 2532)

2) การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition)

การแข่งขันซึ่งกันและกัน เป็นการแข่งขันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดหรือมากกว่าในการได้รับอาหารที่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ต้องการจากพื้นที่เดียวกัน และเมื่ออาหารมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิด จึงทำให้สิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดจำเป็นต้องแย่งอาหารจากพื้นที่นั้น ๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต เช่น คาร์โบไฮเดรตที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงานสูง ไนโตรเจน และปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตอื่น ๆ เช่น ออกซิเจน หรือการแย่งพื้นที่ในการเจริญเติบโต (เกษม, 2532)

3) การเป็นปรสิต (palasitism) และเป็นผู้ล่า(predator)

เชื้อที่สามารถก่อโรคในข้าวหรือพืชหลายชนิดสามารถเป็นปรสิตในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่ก่อโรคในข้าวหรือพืชได้ เช่น เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกาบใบแห้งในข้าว (Sheath Blight Disease) คือ *Rhizoctonia solani* สามารถเป็นปรสิตบนรา *Pythium* ได้ เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวหรือเกิดจุดบนพืช *Fusarium roseum* สามารถเป็นปรสิตบนราสนิม (rust) ได้ ซึ่งการเป็นปรสิตของเชื้อก่อโรคเหล่านี้ อาจทำให้ข้าวหรือพืชชนิดอื่น ๆ มีโอกาสเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคเหล่านี้ได้มากขึ้น เพราะเชื้อราก่อโรคสามารถอาศัยอยู่บนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่พบได้ทั่วไปบนพืชได้ (เกษม, 2532) เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเข้าไปเจริญภายในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้และดูดซึมสารอาหารในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจะทำให้เชื้อโรคอ่อนแอและตายในที่สุด (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)

2.6 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค

2.6.1 เอนไซม์ Chitinase

เอนไซม์ Chitinase สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายตั้งแต่เชื้อแบคทีเรียทั้งบนดินและใน ทะเล เชื้อรา รวมทั้งพืช โดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่ว และสัตว์บางประเภท (มณฑารพ, 2554) เอนไซม์ Chitinase เป็น Pathogenesis Related Protein (PR protein) ชนิดหนึ่งที่มีผลโดยตรงต่อการยังยั้งเชื้อก่อโรค โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อก่อโรค โดยสารประกอบนี้เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ N-acetyl-Dglucosamine ด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic bond เอนไซม์ไคติเนสแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะการสลายพันธะ ได้แก่

1. Endochitinase หรือ chitinase สลายพันธะ β-1,4 glycosidic ภายในโครงสร้างไคตินแบบสุ่ม ได้เป็นมัลติเมอร์ของ N-acetylglucosamine เช่น chitotetraose, chitotriose และ chitobiose

2. Exochitinase แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1. Chitobiosidases ซึ่งจะสลายพันธะ β-1,4 glycosidic ด้านปลาย non-reducing เข้าทีละครั้งได้เป็น chitobiose

2.2. N-acetylglucosaminidase ซึ่งจะสลาย N-acetylglucosamine ออกจากปลาย non-reducing เข้าทีละครั้งได้เป็นโมโนเมอร์ของ N-acetylglucosamine

เอนไซม์ไคติเนสยังมีบทบาทหลักในกลไกการเป็นปรสิต เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pythium sp. *Pyricularia grisea และ Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นต้น อีกทั้งเอนไซม์ chitinase ถูกควบคุมการสร้างโดยยีนไคติเนส (สุวิตา และคณะ, 2554)

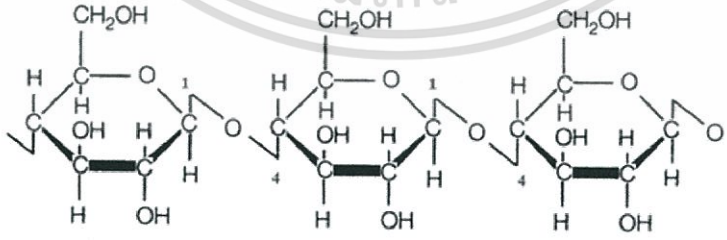
จากงานวิจัยของ นงลักษณ์ (2551) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* ได้

2.6.2 เอนไซม์ Protease

เอนไซม์โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ มีหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) หรือพันธะเอไมด์ (amide bond) แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ 1. เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในสายโปรตีน หรือเรียกว่า เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ได้แก่ เซรีนโปรติเอส (serine protease) ซีสเตอีน (cysteine protease) แอสปาติกโปรติเอส (aspartic protease) และเมททัลโลโปรติเอส (mettalo protease) และ 2. เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาที่ปลายสายด้าน C-terminal และ N-terminal (นวมาลย์, 2548) เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โปรติเอสจากพืช เช่น ปาเปน (papain) ในยางมะละกอดิบ โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด และฟิซิน (ficin) จากผลมะเดื่อ เป็นต้น โปรติเอสจากสัตว์ เช่น เปปซินและเรนนิน (หรือไคโมซิน) ที่เตรียมได้จากกระเพาะสัตว์ทริพซิน (trypsin) และไคโมทริพซิน (chymotrypsin) เตรียมได้จากตับอ่อนของหมู ส่วนโปรติเอสจากจุลินทรีย์ เช่น รา และแบคทีเรีย เช่น serine protease จาก *B. licheniformis* และ neutral protease จาก *Aspergillus oryzae* (เข็มทอง, 2554)

2.6.3 เอนไซม์ Cellulase

เซลลูโลสคือสารพอรีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมาก มีรูปร่างเป็นแท่ง เป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก และมีมากที่สุดในธรรมชาติ ส่วนมากจะพบในพืช โครงสร้างของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก โครงสร้างเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่แตกแขนง (ทิพวรรณ, 2553) เซลลูโลสสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งหน่วยโมเลกุลที่เล็กที่สุดของเซลลูโลสคือ กลูโคส



รูปที่ 2.4 โครงสร้างเซลลูโลส

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose

สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryose* ที่เป็นสาเหตุโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา เนื่องจากพบว่าผนังเซลล์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryose* มีส่วนประกอบของเซลลูโลสอยู่ด้วย (กาญจนา, 2557) นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีส่วนช่วยย่อยเซลลูโลสในพืช (นงลักษณ์, 2551) ทำให้เชื้อเอนโดไฟต์เข้าไปในพืชได้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Naureen *et al.* (2009) ทดสอบการยับยั้งโรคใบไหม้ในข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* ด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากของต้นข้าวในบริเวณที่มีเกลือและไม่มีเกลือ จากปากีสถาน พบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 16 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเชื้อรา *Pyricularia griea* ได้ แต่เมื่อนำไปทดสอบบนใบของต้นข้าว หากไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ใบข้าวจะเกิดโรค

Shyamala *et al.* (2012) ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าว ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากของต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ไอโซเลต RB04 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pyricularia grisea* ได้ดีที่สุด และเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลต RB04 มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย 16S rRNA พบว่ามีลักษณะคล้าย *Pseudomonas fluoresens* และพบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพหลายชนิด เช่น สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส IAA และsiderophore ได้

Nagendran *et al.* (2013) ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากพืชต่างชนิดกัน ทำการทดสอบโดยหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนเมล็ดข้าว หลังจากนั้น 15 วันย้ายลงปลูกในเรือนกระจกและเติมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* เทียบกับการทดลองแบบเดียวกันแต่ใช้สารเคมี คือ Streptomycin และ Tetracyclin แทนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ซึ่งมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ EPB9, EPB10, EPCO29 และ EPCO78 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์

Xanthomonas oryzae

Pyricularia grisea

3.1.2 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)

เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (digital balance)

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

เครื่องเขย่า (Incubator shaker)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporation)

ไมโครเวฟ (Microwave)

3.1.3 อุปกรณ์

ฟลาสก์ (Flask)

บีกเกอร์ (Beaker)

ปิเปตพร้อมจุกยาง (Pipette)

จานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

หลอดทดลองพร้อมฝา (Tube)

แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bottle)

ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

ช้อนตักสาร (Spatula)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบอกตวง (Cylinder)

3.1.4 สารเคมี

Agar

Ethyl acetate

Methanol

Hydrogen peroxide

Ortho-Phosphoric acid

Congo red

Sodium Chloride

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (NA)

Nutrient broth (NB)

Potato dextrose agar (PDA)

Skim milk agar

Colloidal Chitin agar

Carboxymethylcellulose agar (CMC)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.2.1 การทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในข้าว ด้วยวิธี Dual Culture

จากงานวิจัยของชาญณรงค์ และคณะ (2557) ศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว โดยแยกเชื้อเอนโดไฟต์จากต้นข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 ข้าวอินทรีย์หอมนิล และข้าวอินทรีย์ไรซ์เบอรี่ ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งและโรคใบไหม้ เพื่อใช้ทดสอบจากงานวิจัยดังกล่าวได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต คือ ให้ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* 7 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต 1036, 2004, 2015, 2017, 2018, 2022 และ 4045 และให้ผลยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* 27 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 1004, 1015, 1025, 1051, 2009, 2015, 2017, 2018, 2021, 2022, 2024, 2027, 3003, 3004, 3033, 3038, 3047, 3048, 3052, 3077, 3078, 4015, 4028, 4035, 4039, 4040 และ 4041

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* โดยขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนด้านหนึ่งของอาหาร Nutrient Agar (NA) ยาว 5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และขีดเชื้อก่อโรค *X. oryzae* ตามแนวขวางกับเชื้อตัวอย่างให้มีระยะห่าง 1 เซนติเมตร และมีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดยวัดระยะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในจานทดสอบเทียบกับจานควบคุม โดยจานควบคุมจะขีดเชื้อก่อโรค *X. oryzae* ตามแนวขวางให้มีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร บนอาหาร NA ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์อยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* โดยตัดชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. grisea* วางลงที่ด้านหนึ่งของจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) จากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ใช้ทดสอบห่างจากเชื้อรา 1.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยวัดรัศมีของโคโลนีของเชื้อราก่อโรคที่เจริญเข้าหาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เปรียบเทียบกับจานควบคุม โดยจานควบคุมจะตัดชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. grisea* วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และใช้ปากกาขีดทำเครื่องหมายเป็นระยะทาง 1.5 เซนติเมตร ที่ใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คำนวนร้อยละการยับยั้งเชื้อโรคสามารถหาได้จากระยะการเจริญของเชื้อโรคที่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญร่วยอยู่ กับระยะการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญร่วมอยู่ (ตัวควบคุม) จากสูตร

$$\text{ร้อยละการเจริญเชื้อโรค} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยระยะการเจริญของเชื้อก่อโรคที่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญร่วมอยู่} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยระยะการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญร่วมอยู่}}$$

3.2.2 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี well diffusion method

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน incubator shaker ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ โดยดูดสารละลายน้ำหมักเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธี well diffusion method

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* เตรียมอาหาร NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเจาะหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บริเวณด้านหนึ่งของจานอาหาร ขีดเชื้อ *X. oryzae* ยาว 4 เซนติเมตร จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดยวัดระยะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* เปรียบเทียบกับจานควบคุมโดยจานควบคุมจะเจาะหลุมเปล่า และขีดเชื้อ *X. oryzae* ยาว 4 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. grisea* เจริญ วางลงตรงกลางจานอาหาร เจาะหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ให้ห่างจากชิ้นวุ้นกลางจานอาหารด้านละ 1 และ 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนติเมตร จากนั้นปิเปตส่วนใสที่ได้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยวัดรัศมีการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *P. grisea* เปรียบเทียบกับจานควบคุมโดยจานควบคุมจะเจาะหลุมเปล่า ให้ห่างจากชิ้นวุ้นกลางจานอาหารด้านละ 1 และ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี disc diffusion method

เตรียมสารสกัดจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยหนึ่งสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร 1 ขวด ใน incubator shaker ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาสกัด โดยใช้ ethyl acetate ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหารเหลวแล้วเขย่าประมาณ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้รอให้สารเกิดการแยกชั้น เก็บส่วนใสและทำซ้ำอีก 1 รอบ จากนั้นนำส่วนใสไประเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง เก็บรักษาสารที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ละลายสารสกัดด้วย absolute methanol

เตรียมแผ่นกระดาษทดสอบเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยดูดสารละลายสารละลายความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษ

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เตรียมอาหาร NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผ่นกระดาษบริเวณด้านหนึ่งของจานอาหาร และขีดเชื้อ *X. oryzae* ยาว 4 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดยวัดระยะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับจานควบคุมโดยจานควบคุมจะมี 2 แบบ คือ 1) จานควบคุมที่ใช้ absolute methanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงบนแผ่นกระดาษ วางแผ่นกระดาษบนอาหารและขีดเชื้อ *X. oryzae* ยาว 4 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 2) จานควบคุมที่ใช้แผ่นกระดาษเปล่า วางแผ่นกระดาษเปล่าบนอาหารและขีดเชื้อ *X. oryzae* ยาว 4 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. grisea* เจริญ วางลงตรงกลางจานอาหาร วางแผ่นกระดาษให้ห่างจากชิ้นวุ้นด้านละ 1 และ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยวัดรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *P. grisea* เปรียบเทียบกับจานควบคุมโดยจานควบคุมจะมี 2 แบบ คือ 1) จานควบคุมที่ใช้ absolute methanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงบนแผ่นกระดาษ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. grisea* เจริญ วางลงตรงกลางจานอาหาร วางแผ่นกระดาษให้ห่างจากชิ้นวุ้นด้านละ 1 และ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 2) จานควบคุมที่ใช้ แผ่นกระดาษเปล่าตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. grisea* เจริญ วางลงตรงกลางจานอาหาร วางแผ่นกระดาษให้ห่างจากชิ้นวุ้นด้านละ 1 และ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase)

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส โดยขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร อาหาร NA ที่ผสม 1% Colloidal chitin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หากเกิดโซนใสแสดงว่าเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

3.2.5 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease)

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร อาหาร skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หากเกิดโซนใสแสดงว่าเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

3.2.6 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร อาหาร CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยหยด 0.1% Congo- red ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเททิ้ง และหยด 1M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เป็นเวลาไว้ 15 นาที และเททิ้ง หากเกิดโซนใสแสดงว่าเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Turkey's Test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* สายพันธุ์ X3 ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวจำนวน 30 ไอโซเลต บนอาหาร NA โดยขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ด้านหนึ่งของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดระยะที่สามารถขีดเชื้อก่อโรคได้ และขีดเชื้อก่อโรค บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อก่อโรคเทียบกับจานควบคุม พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเอนดไฟต์ จำนวน 7 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ได้ คือ ไอโซเลต 1036, 2004, 2015, 2017, 2018, 2022 และ 4045 โดยมีร้อยละอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรค *X. oryzae* เมื่อเทียบกับตัวควบคุม เท่ากับ 77.00±0.70, 73.33±9.46, 22.75±7.23, 55.33±0.70, 28.33±8.63, 75.00±11.35 และ 81.44±2.54 ตามลำดับ (ตารางที่ ข-1)

ก. ข.

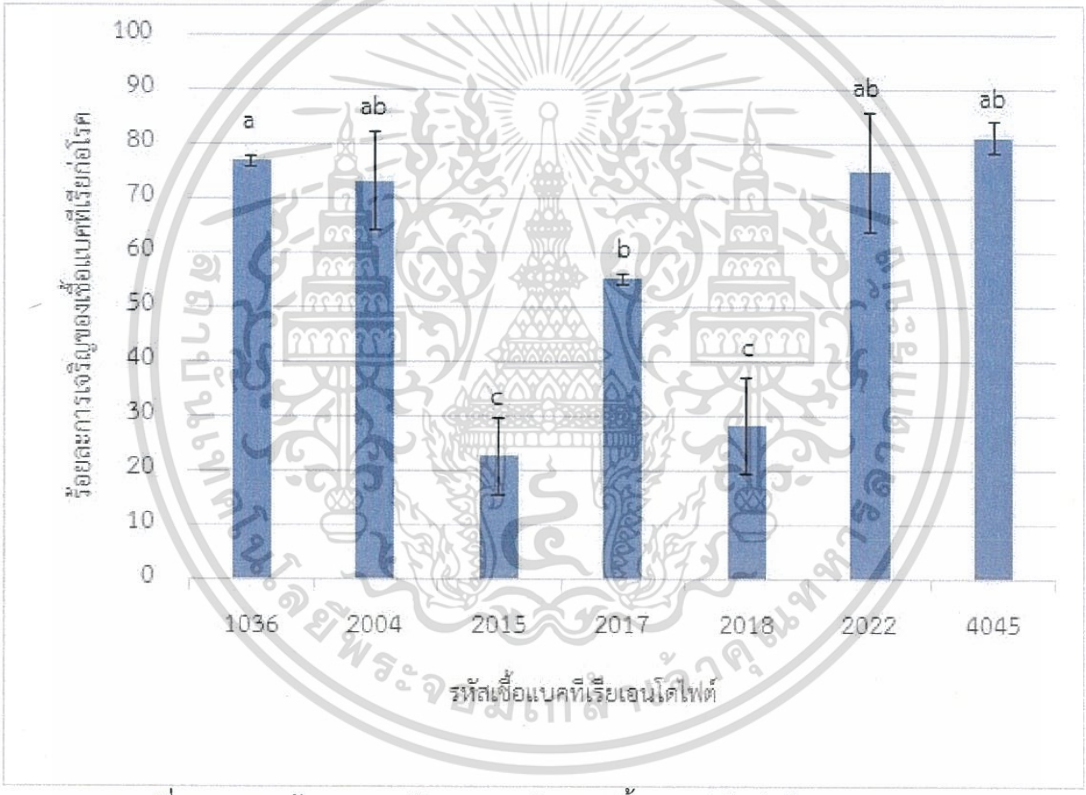
รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยวิธี Dual Culture

(ก.) แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* สายพันธุ์ X3 ในจานควบคุม

(ข.) แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *X. oryzae* สายพันธุ์ X3 ได้ โดยไอโซเลต 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปรียบเทียบร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. oryzae* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์เมื่อเทียบกับจานควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อโรคมีร้อยละของการเจริญเติบโตน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2015 และ 2018 มีค่าเท่ากับร้อยละ 22.75±0.23 และ 28.33±8.63 ตามลำดับ ค่าร้อยละที่น้อยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคได้ดีที่สุด ในขณะที่ร้อยละการเจริญเติบโตของเชื้อโรคเมื่อทดสอบกับเชื้อไอโซเลต 2004, 2017, 2022 และ 4045 นั้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนร้อยละการเจริญของเชื้อโรคเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 1036 มีค่าเท่ากับ 77.00±0.70 ซึ่งแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2004, 2022 และ 4045 อย่างไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 แสดงร้อยละของอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *X. oryzae* ที่ยับยั้งได้โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าว เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว บนอาหาร PDA โดยวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. grisea* ที่ด้านหนึ่งของอาหาร จากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ให้ห่างจากเชื้อก่อโรคด้านละ 1 และ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดระยะการเจริญของเชื้อก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับชุดควบคุม พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ 16 ไอโซเลต คือ 1025, 2015, 2017, 2018, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3048, 3052, 3078, 4015, 4028, 4035 และ 4041 โดยมีร้อยละการเจริญของเชื้อก่อโรคเทียบกับตัวควบคุมเท่ากับ 5.56±5.52, 5.56±0.00, 9.26±2.91, 7.41±5.52, 31.48±2.91, 12.96±3.46, 7.41±2.91, 27.78±19.05, 5.56±0.00, 0.00±0.00, 0.00±0.00, 5.56±0.00, 51.85±3.46, 9.26±2.91, 66.67±14.74 และ 42.59±2.91 ตามลำดับ (ตารางที่ ข-1)

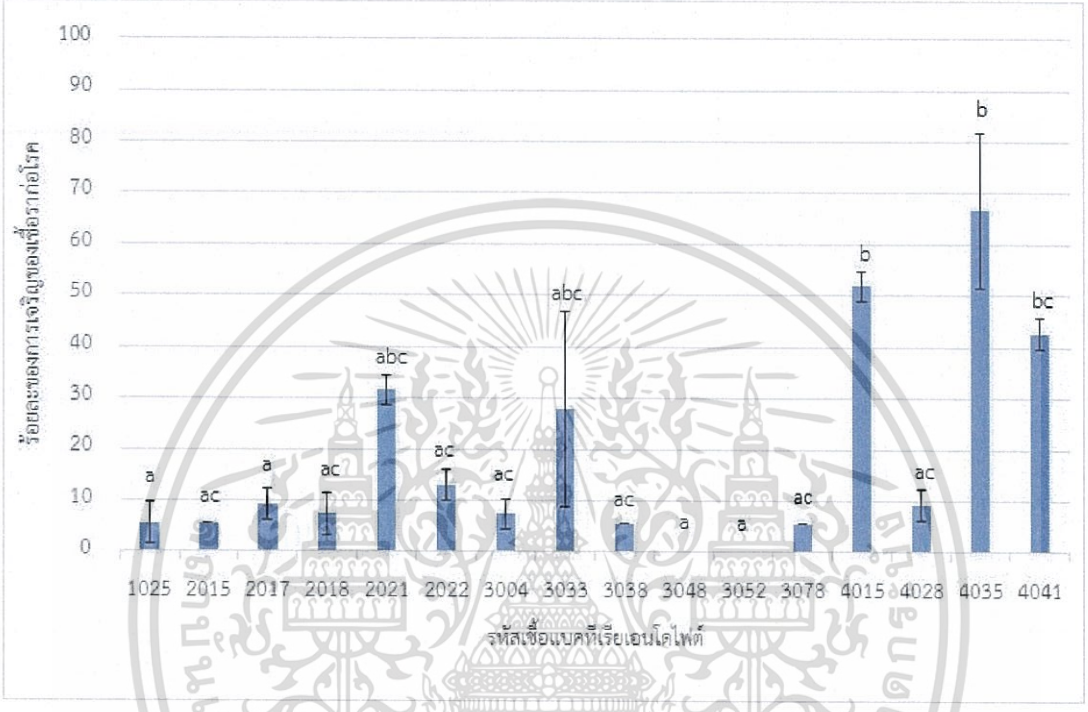
ก. ข. ค.

รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี Dual Culture
(ก.) แสดงการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในชุดควบคุม
(ข.) แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 4028
(ค.) แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 4039

การเปรียบเทียบร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. grisea* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์เมื่อเทียบกับจานควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อโรคมีร้อยละของการเจริญเติบโตน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 1025, 2015, 2017, 2018, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3048, 3052, 3078 และ 4028 โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.56±5.52, 5.56±0.00, 9.26±2.91, 7.41±5.52, 31.48±2.91, 12.96±3.46, 7.41±2.91, 27.78±19.05, 5.56±0.00, 0.00±0.00, 0.00±0.00, 5.56±0.00 และ 9.26±2.91 ตามลำดับ ค่าร้อยละน้อยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 12 ไอโซเลตนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคได้ดีที่สุด ในขณะที่ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเชื้อโรคเมื่อทดสอบกับเชื้อไอโซเลต 2015, 2018, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3078, 4028 และ 4041 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนค่าร้อยละการเจริญของเชื้อโรคเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 4035 มีค่าเท่ากับ 66.67±14.74 และแตกต่างจากเชื้อ 2021, 3033, 4015 และ 4041 อย่างไม่มีนัยสำคัญ การวิเคราะห์ทางสถิตินี้ไม่น่าเชื่อถือเนื่องจากในรูปที่ 4.4 เมื่อดูความสูงของกราฟจะมีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัดเจนแต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วจะเห็นว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบไอโซเลต 3048 กับ 2021 ที่มีร้อยละของการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.00±0.00 และ 31.48±2.91 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันแต่เมื่อคำนวณความแตกต่างทางสถิติจะเห็นว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลต แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 แสดงร้อยละของอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *P. grisea* ที่ยับยั้งได้โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

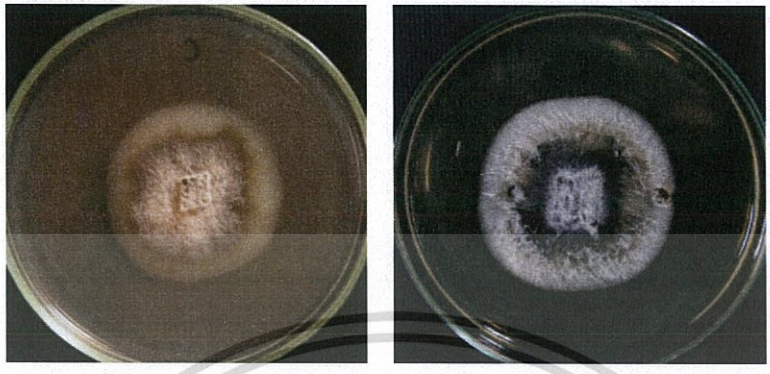
4.2 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี well diffusion method

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี well diffusion method ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 ข้าวอินทรีย์หอมนิล และข้าวอินทรีย์ไรซ์เบอรี่ จำนวน 30 ไอโซเลต ที่มีผลในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งและโรคใบไหม้ในข้าว

โดยการทดสอบบนอาหาร NA ที่มีการเจาะหลุมด้วย cork borer และหยอดสารละลายเซลล์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงลงในหลุมที่เจาะไว้ จากนั้นขีดเชื้อ *X. oryzae* ห่างจากหลุมเล็กน้อย เพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และใช้อาหาร PDA ทำการวางชิ้นวุ้นเชื้อ *P. grisea* ห่างจากหลุมเล็กน้อย เพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราก่อโรค จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 7 วันตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 30 ไอโซเลต ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี well diffusion method



ก. ข.

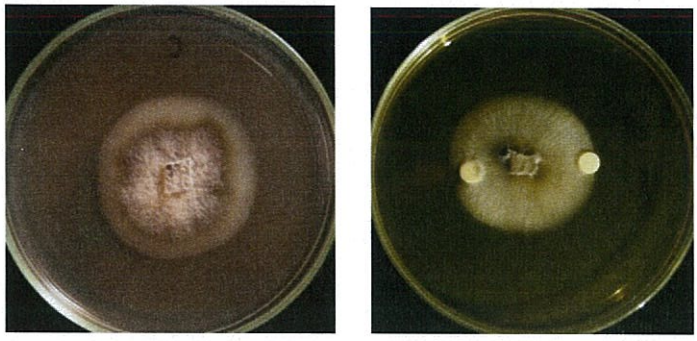
รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี well diffusion
(ก.) แสดงการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในจานควบคุม
(ข.) แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2022

4.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Disc diffusion method

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี disc diffusion method ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 ข้าวอินทรีย์หอมนิล และข้าวอินทรีย์ไรซ์เบอรี่ จำนวน 30 ไอโซเลต ที่มีผลในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งและโรคใบไหม้ในข้าว

โดยการทดสอบบนอาหาร NA นำแผ่นกระดาษที่มีสารสกัดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์วางไว้บริเวณด้านหนึ่งของจานอาหาร จากนั้นขีดเชื้อ *X. oryzae* ห่างจากแผ่นกระดาษเล็กน้อย เพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และใช้อาหาร PDA ทำการวางชิ้นวุ้นเชื้อ *P. grisea* ห่างจากแผ่นกระดาษที่มีสารสกัดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เล็กน้อย เพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราก่อโรค จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 7 วันตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 30 ไอโซเลต ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวด้วยวิธี disc diffusion method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี disc diffusion
(ก.) แสดงการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในจานควบคุม
(ข.) แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2004

4.4 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase, Protease และ Cellulase ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

จากการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 ข้าวอินทรีย์หอมนิล และข้าวอินทรีย์ไรซ์เบอรี่ จำนวน 30 ไอโซเลต ที่มีผลในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งและโรคใบไหม้ในข้าว พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ 4 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ 20 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ 16 ไอโซเลต สามารถสร้างได้ทั้งเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้ 3 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลสได้ 1 ไอโซเลต สร้างเอนไซม์โปรติเอสและเซลลูเลสได้ 12 ไอโซเลต และไอโซเลต 2017 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ Chitinase, Protease และ Cellulase ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าว

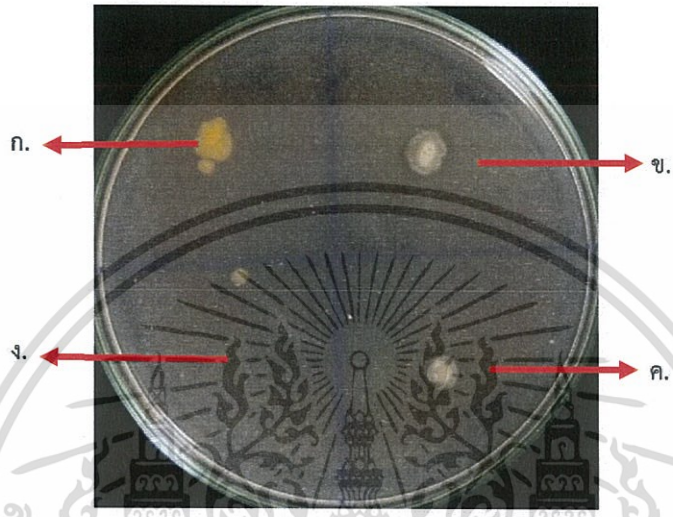
รหัสเชื้อ	การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์		
	Chitinase	Protease	Cellulase
1004	-	-	-
1015	-	-	-
1025	-	+	-
1036	+	+	-
1051	-	+	+
2004	-	+	+
2009	-	+	+
2015	-	+	+
2017	+	+	W
2018	-	+	+
2021	-	W	-
2022	+	+	-
2024	-	-	+
2027	-	+	-
3003	-	+	-
3004	-	+	+
3033	-	+	+
3038	-	+	+
3047	-	-	+
3048	-	+	+
3052	-	-	+
3077	-	+	-
3078	-	+	+
4015	-	-	W
4028	-	+	+
4035	-	+	-
4039	-	-	-
4040	-	+	-
4041	-	-	-
4045	+	+	-

ผลบวก (+) หมายถึง มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์, ผลลบ (-) หมายถึง ไม่มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ และ (W) หมายถึง มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้อาหาร NA ที่เติม 1% Colloidal Chitin สามารถตรวจสอบโดยสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสมีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ 1036, 2017, 2022 และ 4045



รูปที่ 4.7 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์
บนอาหาร NA ที่เติม 1% Colloidal Chitin

(ก.) แสดงผลลบ (-) หมายถึง เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ โดยบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อไอโซเลต 2027 ไม่เกิดบริเวณใส เพราะเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาย่อยสารไคตินในอาหารได้

(ข.) และ (ค.) แสดงผลบวก (+) หมายถึง เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ โดยบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อไอโซเลต 2017 และ 2022 เกิดบริเวณใส เพราะเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาย่อยสารไคตินในอาหารได้

(ง.) ชุดควบคุม ไม่ขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร ไม่มีเชื้อเจริญ จึงไม่เกิดบริเวณใส

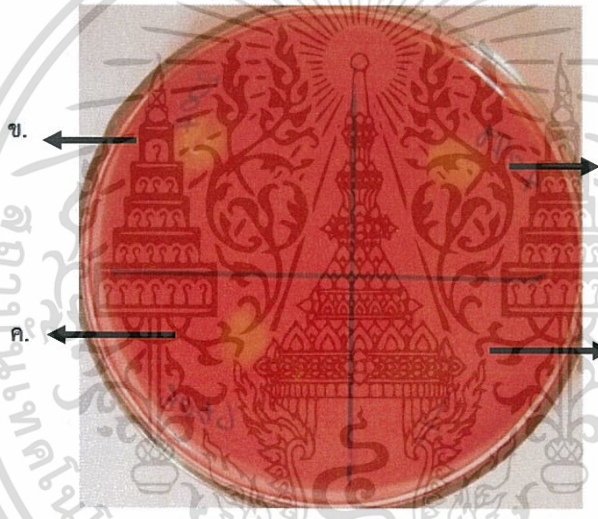
4.5.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease

การทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ใช้อาหารในการทดสอบคือ Skim Milk Agar ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยสังเกตการเกิดโซนใสบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้มีจำนวน 21 ไอโซเลต คือ 1025, 1036, 1051, 2004, 2009, 2015, 2017, 2018, 2022, 2027, 3003, 3004, 3033, 3038, 3048, 3077, 3078, 4028, 4035, 4040 และ 4045 และไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้เล็กน้อยจำนวน 1 ไอโซเลต คือ 2021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase

การทดสอบหากิจกรรมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อาหาร Carboxymethyl-Cellulose Agar (CMC) ในการทดสอบ ตรวจสอบได้โดยหยด 0.1% Congo red ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเททิ้ง และหยด 1M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เป็นเวลาไว้ 15 นาที และเททิ้ง สังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มีจำนวน 12 ไอโซเลต คือ 2004, 2015, 2018, 2024, 3004, 3033, 3038, 3047, 3048, 3052, 3078 และ 4028 และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เล็กน้อยมีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ 2017 และ 4015 จากรูปที่ 4.4 จะเห็นว่า เชื้อสายพันธุ์ 2004, 3047, 4028 สามารถย่อยเซลลูโลสได้ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณใสรอบโคโลนี และเปรียบเทียบกับบริเวณที่มีเครื่องหมายกากบาทซึ่งเป็นบริเวณควบคุม



รูปที่ 4.8 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์
บนอาหาร Carboxymethylcellulase Agar (CMC)

(ก.), (ข.) และ (ค.) แสดงผลบวก (+) หมายถึง เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อไอโซเลต 4028, 2004 และ 3047 เกิดบริเวณใส เพราะเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยเซลลูเลสในอาหาร

(ง.) ชุดควบคุม ไม่ขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร ไม่มีเชื้อเจริญ จึงไม่เกิดบริเวณใส

จากการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 30 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 จากพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี สายพันธุ์หอมนิลจากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร และสายพันธุ์ไรซ์เบอรี่จากพื้นที่จังหวัดชลบุรี (ชาญณรงค์ และคณะ, 2557) โดยทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวคือ เชื้อรา *P. grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ และเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *X. oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง ด้วยวิธี Dual Culture, Well Diffusion และ Disc Diffusion พบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chung *et al.* (2015) ศึกษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Bacillus oryzicola* sp. nov. คัดแยกได้จากรากข้าว ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นและสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ โดยทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่สำคัญ เช่น *Alternaria panax* KACC 42461, *F. fujikuroi* KACC 44022, *F. oxysporum* KCTC16909, *Sclerotinia sclerotiorum* GSCC 50501, *Pythium ultimum* GSCC50651, *Bipolaris oryzae* KACC 40853, *Botrytis cinerea* KCTC 6973, *Magnaporthe grisea* KACC 40415, *Botryosphaeria dothidea*GSCC 50201 และ *Rhizoctonia solani* KCTC 40101 และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในข้าว คือ *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10208 ด้วยวิธี Dual Culture พบว่าเชื้อ *Bacillus oryzicola* ไอโซเลต YC7707 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสารกรองจาก YC7707 ยังสามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และงานวิจัยของ Prasad *et al.* (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากใบข้าวและดิน ที่สามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่า เชื้อ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ 100% โดยวิธี Dual Culture

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้จากวิธี Dual Culture มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทดสอบต่อด้วยวิธี Well Diffusion และนำของเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกสารด้วย ethyl acetate เพื่อนำสารที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด พบว่าสารจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ในการทดสอบทั้ง 2 วิธี และไม่สามารถระบุได้ว่าสารที่สกัดได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นเป็นสารชนิดใด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Faheem *et al.* (2015) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces goshikiensis* YCXU ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* กลไกการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อ *Streptomyces* จะมีการสร้างสารปฏิชีวนะและสารอินทรีย์ระเหยต้านเชื้อราแผ่เป็นวงกว้าง มีการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น เอนไซม์เซลลูเลส, อะไมเลส และกลูคาเนส เป็นต้น และยังชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค และใช้ ethyl acetate สกัดสารที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *S. goshikiensis* YCXU ที่ก่อโรคในแตงโม ซึ่งสารสกัดที่ได้ไม่สามารถควบคุมเชื้อที่ก่อโรคในแตงโมได้ และไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารชนิดใด

งานวิจัยของ Velusamy *et al.* (2013) ศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ของดินบริเวณรอบรากของข้าว นำไปยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง คือ *X. oryzae* โดยนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้ คือ *P. fluorescens* สายพันธุ์ PDY7 ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* บนในข้าวในโรงเรือนและแปลงทดลอง สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* ได้ 58.83% และ 51.88% ตามลำดับ นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ PDY7 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดสารโดยใช้ acetone และ ethyl acetate พบว่าสารที่สกัดได้ คือ 2,4-diacetylphoroglucinol (DAPG) และนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* ด้วยวิธี Well Diffusion พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองที่ใช้สารสกัดคือ ethyl acetate เพียงชนิดเดียว ซึ่งเมื่อสกัดสารจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ สารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้ จึงสามารถนำมาปรับวิธีการสกัดสารเพื่อให้ที่สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ไคติเนส, โปรติเอส และ เซลลูเลส ที่มีผลส่งเสริมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน 4 ไอโซเลต คือ 1036, 2017, 2022 และ 4045 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 21 ไอโซเลต คือ 1025, 1036, 1051, 2004, 2009, 2015, 2017, 2018, 2022, 2027, 3003, 3004, 3033, 3038, 3048, 3077, 3078, 4028, 4035, 4040 และ 4045 ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส และไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้เล็กน้อยจำนวน 1 ไอโซเลต คือ 2021 และมีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน 12 ไอโซเลต คือ 2004, 2015, 2018, 2024, 3004, 3033, 3038, 3047, 3048, 3052, 3078 และ 4028 ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เล็กน้อยมีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ 2017 และ 4015 สอดคล้องกับงานวิจัยของ อนันต์ (2557) ศึกษาการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 232 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 6 ชนิด ได้แก่ *Pyricularia* grisea, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolarisoryzae*, *Curvularialunata* และ *Rhizoctonia solani* ด้วยวิธี dual culture พบว่า มี 12 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษานี้ พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต GR03 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้ทุกชนิดโดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 75% ไอโซเลต GR03 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (chitinase, protease และ cellulase) และผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Indole-3-Acetic Acid และการละลายฟอสเฟต) ได้ แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต GR03 มีศักยภาพในการนำมาควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธีต่อไป จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า หากเชื้อที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น chitinase, protease และ cellulose ได้ เอนไซม์เหล่านี้จะช่วยส่งเสริมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ningthoujam (2009) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวของเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีส พบว่าการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture เชื้อไอโซเลต LSCH-10C ที่คัดแยกจากทะเลสาบ Loktak สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ ซึ่งเอนไซม์ไคติเนส สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ จึงสามารถนำเชื้อไอโซเลต LSCH-10C ไปพัฒนาเป็น biocontrol agent (BCA) ในข้าวได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47 จากพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี สายพันธุ์หอมนิลจากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร และสายพันธุ์ไรซ์เบอรี่จากพื้นที่จังหวัดชลบุรี (ชาญณรงค์ และคณะ, 2557) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าว คือ เชื้อรา *P.grisea* ที่ก่อโรคไหม้ และเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้ง ด้วยวิธี Dual Culture, Well Diffusion และ Disc Diffusion พบว่าในการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน *P. grisea* ได้ 16 ไอโซเลต คือ 1025, 2015, 2017, 2018, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3048, 3052, 3078, 4015, 4028, 4035 และ 4041 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 3048 และ 3052 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด เมื่อนำไปทดสอบเชื้อราก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย และมีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 7 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 1036, 2004, 2015, 2017, 2018, 2022 และ 4045 ซึ่งไอโซเลต 2015 และ 2018 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด คือ เมื่อนำมาทดสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีอัตราการเจริญได้เพียง 22.75±7% และ 28.33±9% ตามลำดับ

และเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี Well Diffusion และ Disc Diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้จากการทดสอบด้วยวิธี Dual Culture ไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดในการทดสอบด้วยวิธี Well Diffusion และ Disc Diffusion ได้เลย

และเมื่อศึกษากิจกรรมที่ส่งเสริมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด โดยการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โคติเนส, โปรติเอส และเซลลูเลส พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 4 ไอโซเลต คือ 1036, 2017, 2022 และ 4045 ที่สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสได้ มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 21 ไอโซเลต คือ 1025, 1036, 1051, 2004, 2009, 2015, 2017, 2018, 2022, 2027, 3003, 3004, 3033, 3038, 3048, 3077, 3078, 4028, 4035, 4040 และ 4045 ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส และไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้เล็กน้อยจำนวน 1 ไอโซเลต คือ 2021 และมีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน12 ไอโซเลต คือ 2004, 2015, 2018, 2024, 3004, 3033, 3038, 3047, 3048, 3052, 3078 และ 4028 ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เล็กน้อยมีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ 2017 และ 4015

จากการทดลองทั้ง 4 ขั้นตอนดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ กข.47, สายพันธุ์หอมนิล และสายพันธุ์ไรซ์เบอรี่ ทั้ง 30 ไอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเลต ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว คือ เชื้อรา *P.grisea* ที่ก่อโรคไหม้ และเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าว ต้องมีตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์อยู่ด้วย ถึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้ แสดงให้เห็นได้จากเมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี Dual Culture ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ขีดบนอาหารที่มีเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บางไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้ แต่เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ผลิตสารออกมาในอาหารเหลว และทดสอบด้วยวิธี Well Diffusion ไม่มีเชื้อไอโซเลตใดเลยที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้ และเมื่อสกัดสารที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ผลิตได้ และนำมาทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion พบว่าไม่มีสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตใดเลยที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิดได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรพิสูจน์ให้แน่ใจว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ต้องการใช้ โดยการพิสูจน์ทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เพื่อป้องกันการผิดพลาดและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

5.2.2 ในการสกัดสารควรใช้สารที่ใช้สกัดชนิดอื่น เพราะเมื่อใช้ ethyl acetate สกัดสารจากอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ สารที่สกัดได้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 ชนิดได้

5.2.3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำเกษตร โดยเฉพาะการเพาะปลูกข้าว เพื่อลดการเกิดโรคใบไหม้ และโรคขอบใบแห้งในข้าว ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สูญเสียผลผลิตข้าวได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา มณีศรี. 2557. “การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg.) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ *P. botryosa* (Chee) โดยชีววิธี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เกษม สร้อยทอง. 2532. **การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี**. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง.

กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. 2557. **โรคขอบใบแห้ง (Bacterial Leaf Blight Disease).** กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เข็มทอง อ๋องทิพย์. 2554. “การผลิตเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

ชาญ มงคล. 2536. **ข้าว**. กรุงเทพฯ : ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ หน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการ ฝึกหัดครู.

ชาญณรงค์ เรืองช่วย, วรรณฤดี สดชื่น และอังศณา ดาราศร. 2557. “การศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว.” โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทิพวรรณ แตงสวน. 2553. “การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร.” วิทยานิพนธ์สัตวศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการรผลิตสัตว์และประมง บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธนาคารแห่งประเทศไทย. 2557. **รายงานสถานการณ์สินค้าเกษตรปี 2557 และแนวโน้มปี 2558**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/.../Yearly-2557_Trend-2558_final.pdf

นาถยา พานทอง. 2556. **เตือนการระบาดโรคไหม้ข้าว**. ปทุมธานี : กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตร จังหวัดปทุมธานี.

นงลักษณ์ แหวนวิเศษ. 2551. **อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดโรคในอ้อย**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นวมาลย์ ครีรีมา. 2548. “การผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสจากรา *Ascosphaera apis*.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นวรัตน์ ใจหอม, สุภาภรณ์ เฮ่ยมเข่ง, และนงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2557. "การประเมินความหลากหลายทาง พันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทยโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR." *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.* 32(3) : 52–60.

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2548. "เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในพืชสกุล *Garcinia.*" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พยอม ศรีจำปา, พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ และถนอมจิตร ฤทธิ์มนตรี. 2548. **การทดสอบความต้านทานของโรคไหม้.** กรมวิชาการเกษตร. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขตที่ 4.

พยอม ศรีจำปา และพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **การทดสอบความต้านทานของโรคขอบใบแห้ง.** กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขตที่ 4.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **โรคไหม้ข้าว: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้.** กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขตที่ 4.

มณฑารพ ยมาภัย. 2554. **รายงานการวิจัย การผลิตและพัฒนาเอนไซมไคติเนสเพื่อใชเปนชีววัตถุในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในพืช.**" มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุจิตตรา ปะนันโต, ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. "เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว." *แก่นเกษตร.* 41(4) : 457-468.

สุวิตา แสไพศาล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และพัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2554. "การโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนในมะเขือเทศ." *KKU Res. J.* 16(4) : 342–347.

แสงชัย ศรีประโคน. 2552. "การจำแนกและจัดกลุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแหง (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) และการบงชี้ตำแหนงยีนตานทานในขาวพื้นเมืองพันธุเชียงรุ้ง (*Oryza sativa* L.)." วิทยานิพนธวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิจัยและพัฒนาการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2559. **การควบคุมโรคพืชและการเก็บเม็ดพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรและลดต้นทุนการผลิต.** กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2554. **หลักการอารักขาข้าวอินทรีย์.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. "โรคไหม้และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือก." *Thai Journal Genetics*. 3(2) : 106–119.

อนันต์ วงเจริญ. 2557. "การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว." *แก่นเกษตร*. 42(3) : 385-396.

อภิชาต จันละคร, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และจรวัฒน์ สนิทชน. 2555. "การประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของเชื้อพันธุกรรมข้าวนาสวน." *วารสารแก่นเกษตร*. 40(4) : 48-52.

Boukaew, S. and Prasertsan, P. 2014. "Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138." *Crop Protection*. 61 : 1–10.

Chanway, C.P. 1996. "Endophyte-They're Not Just Fungi." *Canadian Journal of Botany*. 74 : 321-322.

Chung, E.A. Hossain, M.T. Khan, A. Kim, K.H. Jeon, C.O. and Chung, Y.R. 2015. "*Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice." *Plant Pathol J*. 31(2) : 152–164.

Faheem, M. Raza, W. Zhong, W. Nan, Z. Shen, Q. and Xu, Y. 2015. "Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*." *Biological Control*. 81 : 101–110.

Prasad, G.G. and Sinha, A.P. 2012. "Comparative antagonistic potential of fungal and bacterial bioagents against isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *Annals of Plant Protection Sciences*. 20 : 154-159.

Nagendran, K. Karthikeyan, G. Peeran, M.S. Raveendran, M. Prabakar, K. and Raguchander, T. 2013. "Management of Bacterial Leaf Blight Disease in Rice with Endophytic Bacteria." *World Applied Sciences Journal*. 28(12) : 2229-2241.

Naureen, Z. Price, A.H. Hafeez, F.Y. and Roberts, M.R. 2009. "Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan." *Crop Protection*. 28(12) : 1052-1060.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ningthoujam, D.S. Sanasam, S. Tamreihao, K. and Nimaichand, S. 2009. "Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens." *African Journal of Microbiology Research.* 3(11) : 737-742.

Nino-Liu, O.D. Ronald, C.P. and Bogdanove, J.A. 2006. "*Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop." *Molecular Plant Pathology.* 7(5) : 303–324.

Shyamala, L. and Sivakumaar, P.K. 2012. "Antifungal Activity of Rhizobacteria Isolated from Rice Rhizosphere Soil Against Rice Blast Fungus *Pyricularia oryzae.*" *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives.* 3(3) : 692-696.

Velusamy, P. Immanuel, E. and Gnanamanickam, S. 2013. "Rhizosphere Bacteria for Biocontrol of Bacterial Blight and Growth Promotion of Rice." *Rice Science.* 20(5) : 356-362.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient broth (NB)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Potato dextrose agar (PDA)

Potato dextrose broth	24.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 Colloidal Chitin Agar

Colloidal chitin	10.0	กรัม
Nutrient broth	13.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียม Colloidal chitin โดยชั่งไคตินบดละเอียด 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรเติมกรด *ortho*-Phosphoric ความเข้มข้น 85% 90 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและกรองด้วยกรวยกรอง Buchner ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ตักตะกอนเก็บไว้ และล้างตะกอนใหม่ประมาณ 4 ครั้ง โดนใช้น้ำครั้งละ 1 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายตะกอนสุดท้ายเท่ากับ 7.0 นำสารละลายตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.5 Skim milk Agar

Casein Enzyme Hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Skim milk powder	28.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำ skim milk powder ผสมน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อน คนให้ละลายจนหมด เติมส่วนประกอบอื่นๆ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 อาหาร Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC)

Ammonium Sulfate $(NH_4)SO_2$	1.0	กรัม
Carboxymethyl Cellulose (CMC)	5.0	กรัม
Yeast extracts	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำ Carboxymethyl Cellulose ผสมน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อน คนให้ละลายจนหมด เติมส่วนประกอบอื่น ๆ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 Congo red 0.1%

Congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมด และคนให้สารละลายเข้ากัน

2.2 Sodium Chloride 1M

Sodium Chloride	58.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	กรัม

ผสมสารทั้งหมด และคนให้สารละลายเข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข-1 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture

รหัสเชื้อ	กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว		รหัสเชื้อ	กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว	
	Dual Culture			Dual Culture	
	X. oryzae	*P. grisea*		*X. oryzae*	*P. grisea*
1004	-	-	3004	-	+
1015	-	-	3033	-	+
1025	-	+	3038	-	+
1036	+	-	3047	-	-
1051	-	-	3048	-	+
2004	+	-	3052	-	+
2009	-	-	3077	-	-
2015	+	+	3078	-	+
2017	+	+	4015	-	+
2018	+	+	4028	-	+
2021	-	-	4035	-	+
2022	+	+	4039	-	-
2024	-	-	4040	-	+
2027	-	-	4041	-	+
3003	-	-	4045	+	-

ผลบวก (+) หมายถึง มีกิจกรรมการยับยั้ง, ผลลบ (-) หมายถึง ไม่มีกิจกรรมการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture

รหัสเชื้อ	ผล	ระยะการยับยั้งเฉลี่ยเมื่อเทียบตัวควบคุม (เซนติเมตร)	ร้อยละอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
ตัวควบคุม	-	1.00±0.00	100.00±0.00
1036	+	0.77±0.01	77.00±0.70
2004	+	0.73±0.09	73.33±9.46
2015	+	0.23±0.07	22.75±7.23
2017	+	0.55±0.01	55.33±0.70
2018	+	0.28±0.09	28.33±8.63
2022	+	0.75±0.11	75.00±11.35
4045	+	0.81±0.03	81.44±2.54

หมายเหตุ ตัวควบคุม คือ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ไม่มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญอยู่ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 แสดงผลการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในต้นข้าว โดยใช้วิธี Dual Culture

รหัสเชื้อ	ผล	ระยะยับยั้งเฉลี่ยเมื่อมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญอยู่ด้วยเทียบกับจานควบคุม(เซนติเมตร)	ร้อยละอัตราการเจริญของเชื้อราก่อโรคเมื่อมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เจริญอยู่ด้วย
ตัวควบคุม	-	1.80±0.00	100±0.00
1004	-	-	-
1015	-	-	-
1025	+	0.06±0.04	5.56±5.52
1051	-	-	-
2009	-	-	-
2015	+	0.06±0.00	5.56±0.00
2017	+	0.09±0.03	9.26±2.91
2018	+	0.07±0.04	7.41±5.52
2021	+	0.31±0.03	31.48±2.91
2022	+	0.13±0.03	12.96±3.46
2024	-	-	-
2027	-	-	-
3003	-	-	-
3004	+	0.07±0.03	7.41±2.91
3033	+	0.28±0.19	27.78±19.05
3038	+	0.06±0.00	5.56±0.00
3047	-	-	-
3048	+	0.00±0.00	0.00±0.00
3052	+	0.00±0.00	0.00±0.00
3077	-	-	-
3078	+	0.06±0.00	5.56±0.00
4015	+	0.52±0.03	51.85±3.46
4028	+	0.09±0.03	9.26±2.91
4035	+	0.67±0.15	66.67±14.74
4039	-	-	-
4040	-	-	-
4041	+	0.43±0.03	42.59±2.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

1. วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.1 ดูดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในหลอด appendorf ปริมาณ 600 ไมโครลิตร

1.2 ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งใส่ลงในหลอด appendorf ที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อไว้แล้ว

1.3 ดูดกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด

1.4 นำไป vortex ให้เชื้อผสมเข้ากัน

1.5 นำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. วิธีการเก็บรักษาเชื้อราที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.1 ตัดชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อราขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร ด้วยมีดผ่าตัดที่ผ่าการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 ดูดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในหลอด appendorf ปริมาณ 600 ไมโครลิตร

1.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) จิ้มชิ้นราที่ตัดไว้ลงในหลอด appendorf ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออยู่

1.3 ดูดกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด

1.5 นำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้