รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้เพื่อทำ seed bio-priming ในข้าว

Screening of endophytic bacteria against *Pyricularia oryzae* caused blast disease for seed bio-priming of rice

รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

ดร. พจนา สีขาว

นางสาว ทักษพร ช้างม่วง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2561

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้เพื่อทำ seed bio-priming ในข้าว

Screening of endophytic bacteria against *Pyricularia oryzae* caused blast disease for seed bio-priming of rice

รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

ดร. พจนา สีขาว

นางสาว ทักษพร ช้างม่วง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2561

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้เพื่อทำ seed bio-priming ในข้าว

แหล่งเงิน รายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 70,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร พรหมมาศ คูหากาญจน์

ผู้ร่วมโครงการ ดร. พจนา สีขาว

นางสาว ทักษพร ช้างม่วง

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) จากใบ ลำต้น และรากของต้นข้าว เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมความแข็งแรงของกล้าข้าว และการยับยั้งเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ข้าว ผลการแยกเชื้อ endophytic bacteria ได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลท จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมแกรม และ 3% KOH พบว่า endophytic bacteria ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการเสริมความแข็งแรงของกล้าข้าว พบว่ามีจำนวน 41 ไอโซเลท ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าว โดยไอโซเลท BaR917 มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวสูงที่สุดคือ 128.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท SuS617 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกัน และต่อมาเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture test พบว่าทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ได้ โดยกลุ่มไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปได้แก่ ไอโซเลท Su2s217, SuR317, BaS417 และ BaR917 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 66.80, 66.66, 64.86 และ 61.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการพิจารณาคุณสมบัติทางด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโต ความแข็งแรงของกล้าข้าว ประกอบกับคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าว จึงคัดเลือกนำไอโซเลท BaR917 ไปศึกษากรรมวิธีในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวโดยการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีชีวภาพ (seed bio-priming) ผลการทดลองพบว่า การกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบทางลบต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ทั้งในด้านความชื้น และการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว แต่กลับส่งผลดีในด้านต่างๆ โดยเมล็ดที่ผ่านการกระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกในเดือนที่ 1 ถึง 3 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเมล็ดพันธุ์ปกติ (control) ส่วนในเดือนที่ 4 พบว่า กรรมวิธีกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดโดยยังคงมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 95.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ได้กระตุ้นเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอก 93 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าหลังจากการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์จนสิ้นสุดการทดลอง มีปริมาณเอนโดไฟติกแบคทีเรียลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ต่อมาเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการกระตุ้นด้วย endophytic bacteria ไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดโรคไหม้ข้าวในสภาพโรงเรือนพบว่ากรรมวิธีที่การกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria มีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับที่ 4 ซึ่งใกล้เคียงกับการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยสารเคมี (Osmo priming) ที่มีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับที่ 3 ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ทำการกระตุ้นของเมล็ดพันธุ์ (No priming) และกรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นของเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Hydro-priming) มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความรุนแรงของโรคสูงถึงระดับที่ 6 เช่นเดียวกันกับอัตราการเกิดโรคที่กรรมวิธีที่กระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria มีอัตราการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ทำการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ และกรรมวิธีที่กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria ไอโซเลท BaR917 สามารถลดการเกิดโรคไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ทำการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ และกรรมวิธีกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

คำสำคัญ : เอนโดไฟติกแบคทีเรีย การกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีชีวภาพ โรคไหม้ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Screening of endophytic bacteria against *Pyricularia oryzae* caused rice blast disease for seed bio-priming of rice

Researcher : Assoc. Prof. Dr. Prommart Koohakan
Dr. Potjana Sikhao
Ms. Taksaphorn Changmuang
Department of Plant Production Technology , Faculty of Agricultural Technology, King's Mongkut Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

This study is aimed for isolation endophytic bacteria from leaves, stems and roots of healthy rice and screening their potential to promote plant growth and inhibit *Pyricularia oryzae* causing rice blast. Forty-six isolates were obtained from this experiment. Characterization by gram staining and 3% KOH test, found that most of the isolates were gram-positive bacteria. Initially, the effect on rice seedling were tested. It was found that 41 isolates showed their ability to promote plant growth that was referred to benefit isolates. Isolate Bar917 had the highest seedling vigor index that was 128.42 %, followed by isolate SuS617. Then, the benefit isolates were also tested their efficiency to inhibit *P. oryzae* by dual culture technique. It was found that all benefit isolates could inhibit *P. oryzae*. The isolates giving 60% inhibition higher than control were SuS217, SuR317, BaS417 and BaR917, which was 66.80, 66.66, 64.86 and 61.11% respectively.

For screening the potential isolate, the qualifications of endophytic bacteria on growth promotion by seedling vigor index (%svi) combined with their antagonistic activity were considered. BaR917 was selected for further study on seed-priming to improve the efficiency of rice production. Seed priming with endophytic bacteria (Bio-priming) did not affect moisture content and seed germination along 3 months, In the fourth month, seed bio-priming had the highest germination compared with control at percentage of 95.50%, while the No priming seed had a germination rate of 93%. Detection the amount of bacteria consisted in this priming seed was slightly reduced from the beginning of bio-priming process until the end of the experiment. Bio-priming with endophytic bacteria was tested to control rice blast disease in greenhouse condition. It was show that Bio-priming treatment had disease severity index at level 4, closely to Osmo priming, while No priming treatment and Hydro priming treatment had highest level of severity disease index at level 6. Similarly result on disease incidence of Bio-priming was lower than No priming and Hydro priming treatment. Therefore, Bio-priming with endophytic bacteria BaR917 could reduce rice blast disease compared with No priming and Hydro priming.

keywords: endophytic bacteria, seed bio-priming, rice blast disease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาน 2561 รหัสโครงการ 2561-01-04-021 ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการการดำเนินโครงการวิจัย ตลอดทั้งบุคลากรและผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านในการช่วยติดต่อประสานงาน และสนับสนุนการดำเนินโครงการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**iii**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**v**
กิตติกรรมประกาศ	**vi**
สารบัญ	**viii**
สารบัญตาราง	**x**
สารบัญภาพ	**x**
บทที่1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และทดสอบการก่อโรค	9
3.2 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*	9
3.3 การทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria และทดสอบคุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ข้าว	10
3.4 การทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรคไหม้ข้าวในระยะกล้าหลังการทำ seed bio-priming	12
บทที่4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และทดสอบการก่อโรค	14
4.2 ผลการคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*	14
4.3 การทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria และทดสอบคุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ข้าว	23
4.4 การทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรคไหม้ข้าวในระยะกล้าหลังการทำ seed bio-priming	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผล สรุปผลงานวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 28

5.2 สรุปผลการวิจัย 31

5.3 ข้อเสนอแนะ 31

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 การเผยแพร่ผลงานวิชาการ 32

6.2 การผลิตบัณฑิต 32

เอกสารอ้างอิง 33

ภาคผนวก ก

- แบบรายงานการใช้จ่ายเงินในโครงการ 37

ภาคผนวก ข

- เอกสารผลผลิตงานวิจัย 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ คุณสมบัติเบื้องต้นของ endophytic bacteria	15
4.2	ผลของ endophytic bacteria ต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว	19
4.3	ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*	21
4.4	การเปลี่ยนแปลงความชื้น ในการลดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวหลังแช่เมล็ดด้วยสารแขวนลอย endophytic bacteria	24
4.5	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกระตุ้นเมล็ด หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	25
4.6	การงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกระตุ้นเมล็ด หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	26
4.7	อัตราการเกิดโรคไหม้ข้าวในกรรมวิธีต่างๆ ภายหลังทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae*	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	แสดงการเกิดโรคไหม้ข้าวภายหลังทำการทดสอบโรคเป็นเวลา 7 วัน (A=control; B=BKK55003; C=UBN195171; D= RBR55001 และBTN6001)	14
4.2	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากข้าว (A=ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, B =ลักษณะโคโลนีที่กำลังขยาย6.7 เท่าและ C = การติดสีย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังขยาย 1,000 เท่า)	17
4.3	ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการทดสอบด้วยวิธี Dual-culture (A=control, B = BarR917, C=BaS417, D=SuR317, E= SuS217และ F=Su2S217)	22
4.4	การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	23
4.5	จำนวน endophytic bacteria ภายหลังการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวเป็นระยะเวลา 4 เดือน	26
4.6	การเกิดโรคไหม้ข้าวในกรรมวิธีต่างๆ ภายหลังการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* เป็นเวลา 7 วัน (A=control; B= No priming; C=Hydro priming; D=Osmo priming E=Bio priming และ F= Bio priming+spray)	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พืชเศรษฐกิจอันดับ 1 ของไทยได้แก่ ข้าว โดยเฉพาะข้าวหอมมะลิ เป็นข้าวที่มีปริมาณการส่งออกและมูลค่ามากที่สุด (กรมการข้าว, 2555) นอกจากนี้กระทรวงเกษตรยังประกาศให้การรับรองเฉพาะข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข15 เท่านั้น ที่สามารถส่งออกได้ในนามข้าวหอมมะลิไทย (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2546) ทำให้ข้าวหอมมะลิสองพันธุ์นี้มีความสำคัญต่อการผลิตและส่งออก แต่ปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตข้าวหอมมะลิคือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความอ่อนแอต่อโรคไหม้ของข้าว ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Pyriculariaoryzae*เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะข้าวออกรวง เชื้อเข้าทำลายข้าวได้ทุกส่วนของต้นข้าว ตั้งแต่ใบ ลำต้น ข้อ และคอรวง ความเสียหายของข้าวในระยะคอรวงทำให้น้ำหนักและขนาดเมล็ดลดลง รวมถึงเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลงด้วย (พูนศักดิ์ และคณะ, 2542) การป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวส่วนใหญ่ทำโดยการใช้สารเคมี ไม่ว่าจะใช้ฉีดพ่น คลุกหรือแช่เมล็ดก่อนปลูก ซึ่งการใช้สารเคมีอาจเป็นอันตรายต่อตัวเกษตรกร และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงมีการนำวิธีการควบคุมทางชีวภาพเช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) มาใช้ในการป้องกันกำจัดมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แต่ไม่ทำให้เกิดอันตรายหรือก่อโรคต่อพืช (Hallman *et al*., 1997; สุจิตตรา และคณะ, 2556) ยังมีรายงานอีกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (de Matos Nogueira*et al*., 2001) นอกจากนี้การเตรียมกล้าข้าวยังเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะจะทำให้ได้ข้าวที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีโอกาสให้ผลผลิตสูง ซึ่งต้นกล้าที่แข็งแรงจะต้องมีการเจริญเติบโตและความสูงสม่ำเสมอทั้งแปลง ไม่มีโรคและแมลงทำลาย (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2547) จึงควรมีการจัดการที่ดีตั้งแต่เมล็ดพันธุ์

การกระตุ้นการงอกของเมล็ด (seed priming) เป็นอีกหนึ่งวิธีสำหรับการเตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนนำไปปลูก มีหลักการคือทำให้เมล็ดพันธุ์ได้รับความชื้นในปริมาณหนึ่งตามความเหมาะสมของเมล็ดพันธุ์แต่ละชนิด เพื่อชักนำให้เกิดกระบวนการงอก จนมีการสร้างเอนไซม์ (Farooq *et al*., 2006; Nasri*et al*., 2011) และกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเมล็ด แล้วยุติกระบวนการงอกของราก โดยลดความชื้นของเมล็ดกลับสู่ระดับความชื้นเดิมเพื่อให้สามารถเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ได้ตามปกติ (Ashraf and Foolad, 2005; Dezfuli*et al*., 2008; ดวงกมลวรรณ และคณะ, 2556) ทั้งนี้การกระตุ้นการงอกของเมล็ดมีหลายวิธีได้แก่ การแช่เมล็ดในน้ำ (hydropriming) หรือการใช้สารดูดซึม (osmopriming) ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม เมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการกระตุ้นการงอกไปเพาะจะทำให้เมล็ดงอกได้เร็วและสม่ำเสมอ (McDonal, 1999) นอกจากนี้ยังมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ร่วมกับการกระตุ้นการงอก (bio-priming) โดยมีการรายงานว่า bio-priming เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่เพิ่มระยะเวลาที่จะสามารถช่วยป้องกันเมล็ดพันธุ์ และต้นกล้าจากเชื้อสาเหตุโรคได้ (Callen *et al*., 1991; Callen and Mathre, 2000) การใช้ bio-priming ยังมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มมากขึ้น (Wright *et al*., 2003a.)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาการใช้เชื้อ endophytic bacteria ที่แยกได้จากข้าวร่วมกับการใช้เทคนิค seed bio-priming เพื่อลดโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyriculariaoryzae*และกระตุ้นการงอกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดพันธุ์ข้าวให้มีการงอกอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอขึ้น มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการผลิตข้าวต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyriculari aoryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าว ภายหลังการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะแยกเชื้อ endophytic bacteria จากข้าว เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ร่วมกับการทำseed bio-priming โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการโรคพืช สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ endophytic bacteria สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปใช้ในการทำ seed bio-priming รวมถึงระยะเวลาการยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ และการมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria หลังจากการทำ bio priming ตลอดจนการนำผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ (seed priming)

การกระตุ้นการงอกของเมล็ด (seed priming) เป็นเทคนิคที่เริ่มมีการใช้กันตั้งแต่สมัยกรีกโบราณ ซึ่งมีการพบว่าการนำเมล็ดพันธุ์แช่ในน้ำ น้ำผึ้ง หรือน้ำนมก่อนนำไปปลูกสามารถเร่งการงอกของเมล็ดได้ (Parera and Cantliffe, 1994) ซึ่งการกระตุ้นการงอกของเมล็ดจำเป็นต้องมีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการงอกของเมล็ด เพื่อให้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการดูดซึมน้ำของเมล็ดพันธุ์เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการงอก การดูดซึมน้ำของเมล็ดพันธุ์ในช่วงการงอกแบ่งออกเป็นระยะ 3 ตามที่ บุญมี (2546) ได้รายงานไว้ดังนี้

ระยะที่ 1 เมล็ดเริ่มดูดซึมด้วยวิธีอุ้มน้ำ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นได้ทั้งในเมล็ดที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต โดยสามารถสังเกตเห็นได้ง่าย ส่วนใหญ่น้ำจะซึมผ่านช่องเปิดของเมล็ดอย่างรวดเร็ว เช่น ทางช่องไมโครไพล์ และบริเวณขั้วของเมล็ด มากกว่าการซึมผ่านทางเปลือก เมื่อน้ำซึมผ่านเข้าสู่เมล็ดจะทำให้เมล็ดพองใหญ่ขึ้นกว่าเดิม

ระยะที่ 2 ระยะนี้เรียกว่า ระยะช้าหรือล้า (lag period) เป็นระยะที่มีกิจกรรมเมแทบอริซึมต่างๆ หรือกระบวนการย่อยสลายอาหารสะสมภายในเมล็ด โดยจะเกิดขึ้นเฉพาะภายในเมล็ดที่มีชีวิตเท่านั้น ระยะที่ 2 นี้ใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าระยะที่ 1 ระยะนี้ไม่สามารถเห็นได้ แต่ตรวจสอบได้ทางชีวเคมี

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่เมล็ดงอกออกมา ส่วนแรกที่เห็นได้คือ รากแรกเกิดที่แทงทะลุเปลือกเมล็ดออกมา ขณะที่แกนเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์ และขยายขนาดเซลล์ มีการเจริญเติบโตเห็นได้ชัดเจน การที่รากแทงทะลุออกมามีผลทำให้การดูดซึมน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมล็ดที่กำลังงอกมีพื้นที่ผิวในการดูดซับน้ำมากขึ้นกว่าเดิมนั่นเอง

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการกระตุ้นการงอกของเมล็ด มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งวิธีนี้จะทำการเพิ่มความชื้นให้เมล็ดพันธุ์ เช่น การแช่เมล็ดในน้ำ หรือสารเคมีต่างๆ ทำให้เมล็ดพันธุ์พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม และทำให้เมล็ดมีความพร้อมในการงอกแต่ยังไม่งอกเมื่อนำไปปลูกจะสามารถงอกได้อย่างรวดเร็ว และมีความสม่ำเสมอ (Bray, 1995; McDonald, 2000) โดยรูปแบบของการกระตุ้นการงอกของเมล็ดมีหลายรูปแบบได้แก่

1). Hydro-priming

เป็นการแช่เมล็ดในน้ำก่อนนำไปเพาะปลูก วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำการเกษตร เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีต้นทุนต่ำ แต่ถึงแม้ว่าการแช่เมล็ดในน้ำนี้จะเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด แต่การแช่เมล็ดในน้ำอาจทำให้เมล็ดไม่ได้รับความชื้นอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้เมล็ดงอกไม่สม่ำเสมอตามไปด้วย และอาจไม่เหมาะกับพืชบางชนิดที่ถ้าหากได้รับความชื้นมากเกิดไปจะทำให้สารอาหารที่จำเป็นต่อเมล็ดเกิดการรั่วไหลออกมา ทำให้เมล็ดเกิดความเสียหาย (Pill and Necker, 2001)

2).Osmopriming

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคการกระตุ้นการงอกของโดยการแช่เมล็ดในสารละลายที่มีค่าความต่างศักย์ของน้ำในระดับต่ำ เพื่อชะลอการดูดน้ำของเมล็ดให้ช้าลง เช่น น้ำตาล, polyethylene glycol (PEG), glycerol, sorbitol เป็นต้น จากนั้นจึงนำไปลดความชื้น เทคนิค osmoprimingยังเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ด และยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ วิธีนี้ยังสามารถควบคุมปริมาณน้ำที่เมล็ดดูดเข้าไปได้อีกด้วย (McDonal, 2000)

3). Halo priming

การแช่เมล็ดในเกลืออินทรีย์ เช่น NaCl KNO_3 $CaCl_2$ และ $CaSO_4$ เป็นต้น เป็นการปรับปรุงการงอกของเมล็ดพันธุ์ให้ทนต่อสภาวะดินเค็ม มีการศึกษาของ Khan et al. (2009) ที่ได้ศึกษาการกระตุ้นการงอกของเมล็ดร่วมกับ NaCl ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันได้แก่ 0, 3, 6 และ 9 dSm^{-1} พบว่าการกระตุ้นการงอกของเมล็ดร่วมกับ NaCl มีการงอก และความแข็งแรงของต้นกล้าดีกว่าต้นที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นการงอก (Nawaz *et al*., 2013)

4). Solid matrix priming

เป็นการกระตุ้นการงอกของเมล็ด โดยควบคุมการดูดน้ำโดยใช้วัสดุที่มีค่า matric potential ต่ำ ดูดยึดน้ำได้มาก มีพื้นที่ผิวมาก ไม่เป็นพิษกับเมล็ด เช่น ทราย พีทมอส เวอร์มิคูไลท์เป็นต้น วิธีการนี้สามารถใช้ได้ดีกับพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก แครอท ต้นหอมเป็นต้น แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือการแยกเมล็ดออกจากวัสดุสามารถทำได้ยาก (นิติภูมิ และคณะ, 2555)

5). Bio-priming

เป็นการใช้จุลินทรีย์กระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในการกระตุ้นเมล็ดที่ใช้กันเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือควบคุมป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นเทคนิคการปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดโดยวิธีบูรณาการระหว่างทางด้านสรีรวิทยา และด้านชีวภาพ เพื่อพัฒนาคุณภาพของเมล็ดให้ดียิ่งขึ้นซึ่ง bio-priming มีความแตกต่างกับเทคนิคอื่นๆ คือ จะไม่แช่เมล็ดในน้ำหรือสารดูดซึม แต่จะเป็นการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์แทน เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) หรือกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) (Callan *et al*., 1990; Raj *et al*., 2004)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 ผลของการกระตุ้นการงอกด้วยรูปแบบต่างๆ

พจนา และบุญมี (2551) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเมล็ดพันธุ์พริกหวานจากการกระตุ้นการงอกของเมล็ดด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกหวาน มากระตุ้นการงอกโดยการแช่เมล็ดด้วยสารเคมี ใช้ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน 4 กรรมวิธีได้แก่ 1. Vitamin C ความเข้มข้น 200 mg/l เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 2. Polyethylene glycol 6000 ความเข้มข้น -1.5 MPa เป็นเวลา 6 วัน 3. KNO_3 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 4. KNO_3 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแช่สารละลายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองพบว่า การกระตุ้นการงอกของเมล็ดด้วยทุกวิธีการทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดเพิ่มมากขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากที่สุดในกรรมวิธีที่ใช้ Vitamin C และ KNO_3 ร่วมกับ KH_2PO_4 คือ 15 และ 17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้กระตุ้นความงอก

พรทิพย์ และคณะ (2553) ได้ศึกษาผลของ seed priming ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าว จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ชัยนาท 1 ปราจีนบุรี 2 และเล็บนกปัตตานี ทำการทดลองโดยนำเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุหลังเก็บเกี่ยว 2 4 และ 6 เดือน มากระตุ้นการงอกด้วยการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเป็นเวลา 0 3 6 9 และ12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปลดความชื้นให้เหลือความชื้นประมาณ 11-12 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าการยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าว ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว อายุของเมล็ดพันธุ์ และการลดความชื้นหลังเก็บเกี่ยว โดยพบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวอายุ 6 เดือน ที่นำมาแช่ในน้ำเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้มากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่แช่น้ำ เป็นเวลา 1-4 เดือน

บุญมี และคณะ (2554) ได้ทำการทดลองโดยนำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม 2 พันธุ์ ได้แก่ pst-01 และ pst-02 มากระตุ้นการงอกโดยแช่ลงใน PEG6000 ร่วมกับการใช้สารเคมี 3 ชนิด คือ 1. KNO_3 2. KH_2PO_4 และ 3. Vitamin C ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นความงอกของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ pst-01 ด้วย PEG6000 ร่วมกับการใช้ KNO_3 และ KH_2PO_4 ทำให้เมล็ดพันธุ์สามารถงอกได้เร็วขึ้น ส่วนพันธุ์ pst-02 พบว่าการใช้ PEG6000 ร่วมกับ KH_2PO_4 ในการกระตุ้นการงอกทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบจำนวนต้นกล้าที่ผิดปกติลดลงอีกด้วย

พิจิตรา และคณะ (2556) ได้ศึกษาการกระตุ้นความงอกของเมล็ดพันธุ์มะตาดโดยใช้น้ำ RO, GA3 และ KNO_3 ผลการทดลองพบว่า การแช่เมล็ดในสารละลาย KNO_3 0.2% นาน 12 ชั่วโมง และแช่น้ำ RO นาน 12 ชั่วโมง มีการงอกสูงที่สุดคือ 93% ในขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้กระตุ้นความงอก (control) มีความงอกเพียง 86% ส่วนการแช่เมล็ดในน้ำ RO นาน 6 ชั่วโมง และการแช่เมล็ดในสารละลาย KNO_3 0.2% นาน 12 ชั่วโมง มีเวลาเฉลี่ยในการงอกเร็วที่สุดคือ 24 และ 24.5 ในขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้กระตุ้นความงอก (control) มีเวลาเฉลี่ยในการงอก 25.5 วัน

ดวงกมลวรรณ และคณะ (2556) ได้ทำการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำ seed priming ของแตงกวาลูกผสมพันธุ์ Super Big มี 9 กรรมวิธีคือ ที่เมล็ดไม่ได้ทำ seed priming (control) กรรมวิธีที่ทำ seed priming โดยให้ความชื้นนาน 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ชั่วโมง หรือจนรากแรกเกิดงอก และกรรมวิธีที่นำเมล็ดผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 นาที ทำการทดลองโดยให้ความชื้นแก่เมล็ด วางเมล็ดระหว่างก้อนโอเอซิส (FORACELL®) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วลดความชื้นของเมล็ดกลับระดับเดิม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการให้ความชื้น แก่เมล็ดพันธุ์แตงกวาโดยวางเมล็ดระหว่างก้อนโอเอซิสที่ชื้น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้เมล็ดได้รับความชื้นนาน 16 ชั่วโมง. สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดได้ และทำให้ต้นกล้ามีการพัฒนาของใบจริงเร็วขึ้นในสภาพแปลงปลูก

Shahzad*et.al*. (2000) ได้ทำการทดลองกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ของข้าวสาลีด้วยน้ำ ในระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0 (ควบคุม), 6, 12, และ24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเมล็ดมาลดความชื้นด้วยการอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปปลูก พบว่าการกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวสาลีที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลดีกว่าช่วงระยะเวลาอื่นๆ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ความยาวรากเท่ากับ 8.41 เซนติเมตร

Muller และ Berg, (2008) รายงานว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่เมล็ดมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้จุลินทรีย์ กระตุ้นการงอกของเมล็ดผักกาด โดยได้ทำการทดลองกับเชื้อ *Serratia plymuthica* HRO-C48 ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ พบว่าระยะการงอกของเมล็ดระยะที่ 1 (phase I) อยู่ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการแช่เมล็ด โดยมีการดูดน้ำเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด ส่วนการงอกของเมล็ดระยะที่ 2 (phase II) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่แช่เมล็ดระหว่าง 4-16 ชั่วโมง และระยะที่ 3 จะเกิดขึ้นภายหลังจากแช่เมล็ด 16 ชั่วโมง ส่วนจำนวนของเชื้อ *Serratia plymuthica* HRO-C48 พบว่าเชื้อดังกล่าวเพิ่มจำนวนมากที่สุดหลังจากการแช่เมล็ดเป็นเวลา 20 ชั่วโมง มีจำนวนของเชื้อ *S. plymuthica*เท่ากับ log10 6.3 ± 0.21 CFU ต่อเมล็ด โดยมากกว่าช่วงเวลาที่แช่เมล็ดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณของเชื้อ *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plymuthica เท่ากับ 3.4 ± 0.40 Log CFU ต่อเมล็ด และ 6.2 ± 0.26 Log CFU ต่อเมล็ด ตามลำดับ โดยการเพิ่มมากขึ้นของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก็จะมีผลทำให้การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

2.2.2 การกระตุ้นการงอกด้วยจุลินทรีย์ (Bio-priming)

Callan *et al*. (1991) ได้ศึกษาการกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวโพดโดยใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ AB254 ควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum* สาเหตุโรคเน่าคอดินของข้าวโพดหวาน เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Metalaxyl การให้ความชื้นอย่างเดียว (บ่มเมล็ดเพื่อให้ความชื้นใน vermiculite) การคลุกเมล็ดด้วย *P. fluorescens* สายพันธุ์ AB254 PCNB และMethylcellulose พบว่าการกระตุ้นการงอกของเมล็ดร่วมกับการใช้เชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ AB254 สามารถควบคุมเชื้อ *P. ultimum* ได้ดีที่สุด โดยมีการงอกของเมล็ดข้าวโพดสูงที่สุดเท่ากับ 39.4 เปอร์เซ็นต์ ลองลงมาได้แก่ Metalaxyl ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 30.1 เปอร์เซ็นต์ การทดลองพบว่า การกระตุ้นเมล็ดของข้าวฟ่าง ร่วมกับการใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดข้าวฟ่าง ต้นกล้ามีความแข็งแรง และเพิ่มผลผลิตข้าวฟ่าง 22 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างทั้งในโรงเรือน และสภาพแปลงปลูกโดยสามารถควบคุมโรคได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์

Nayaka *et al*. (2008) ได้ทำการศึกษาการกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวโพดด้วยเชื้อ *Trichoderma hazianum* ควบคุมโรคเน่าของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium verticillioides* ทำการทดสอบกับเมล็ดข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ kanchan pioneer และ sweet corn โดยนำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในสารแขวนลอยของ *T. hazianum* ที่ความเข้มข้น 10^8 cfuต่อกรัม เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำไปลดความชื้นก่อนนำไปปลูก ผลการทดลองพบว่าข้าวโพด สายพันธุ์ kanchan pioneer และ sweet corn ที่มีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดร่วมกับการใช้ *T. hazianum* มีอัตราการเกิดโรคเท่ากับ 6.12 5.84 และ 6.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีอัตราการเกิดโรคอยู่ที่ 19.4 13.2 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Begum *et al*. (2010) ได้ทำการทดลองใช้จุลินทรีย์ 3 ชนิด กระตุ้นการงอกของเมล็ด ได้แก่ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ UPN40 *Trichoderma virens* สายพันธุ์ UPM23 และ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ UPM13B8 มาใช้ในการควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วเหลือง ที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum truncatum* โดยนำถั่วเหลืองมาแช่ในสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวไว้ข้างต้นในอัตราส่วน 1:3 (w / v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปลดความชื้นด้วยเครื่อง laminar flow ซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ UPN40 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ UPM13B8 สามารถเจริญได้ดีบนเมล็ดถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดสามารถควบคุมการเกิดโรคโคนเน่าของถั่วเหลืองได้อย่างมีนัยสำคัญโดยมีอัตราการเกิดโรคอยู่ที่ 39-50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว และกรรมวิธีที่ไม่ได้มีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดที่มีอัตราการเกิดโรคสูงถึง 76-84 เปอร์เซ็นต์

2.2.3 การใช้จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ควบคุมโรคพืช

อนันต์ (2557) ได้ศึกษาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ 232 ไอโซเลต จากนั้นจึงนำมาศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 6 ชนิด ได้แก่ *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* และ *Rhizoctonia solani* ทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture assay พบว่า มี 12 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษานี้พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GR03 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน ITS1-ITS2 ของ rDNA คล้ายคลึงกับ *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้ทุกชนิดโดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 75% นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต GR03 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (chitinase, protease และ cellulase) และผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Indole-3-Acetic Acid และการละลายฟอสเฟต) ได้

กานต์ และอนันต์ (2559) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Magnaporthe oryzae* โดยแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวจำนวน 55 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *M. oryzae* ด้วยวิธี dual culture technique พบว่า ไอโซเลต FL11 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *M. oryzae* ได้อย่างมีปะสิทธิภาพ เมื่อวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1- ITS2 rDNA ของไอโซเลต FL11 พบว่า มีความเหมือนกับเชื้อ *Daldinia eschscholtzii* และพบว่าการใช้ราเอนโดไฟต์ *D. eschscholtzii* FL11, *Trichoderma harzianum* GR03 และ*T. ghanense* GR06 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ในกล้าข้าวที่พ่นราเอนโดไฟต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกล้าข้าวที่ไม่ได้พ่น และยังไม่แตกต่างกับการใช้สารกำจัดเชื้อราแบบไม่ดูดซึม Mancozeb และแบบดูดซึม Edifenphos

Chen *et al.* (1995) ได้ทำการทดลองแยกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อภายในของฝ้าย 49 สายพันธุ์ โดยได้เชื้อ endophytic bacteria ทั้งหมด 170 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของฝ้าย ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ซึ่งผลการทดลองพบว่า มี 6 ไอโซเลท ที่สามารถความรุนแรงของโรคดังกล่าวได้ ได้แก่ INR-B, JM-1128, JM-1137, CC-186, 89B-61, และ JM-869 ซึ่งต่อมาได้มีการนำมาจัดจำแนกต่อพบว่าคือเชื้อ *Aureobacterium saperdae, Bacillus pumilus, Phyllobacterium rubiacearum, Pseudomonas putida, P. putida*, และ *Burkholderia solanacearum* ตามลำดับ

Silva *et al*. (2012) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อของกาแฟ โดยเป็นแบคทีเรีย 217 ไอโซเลท และเชื้อรา 17 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดราสนิมของกาแฟที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Hemileia vastatrix* พบว่าเชื้อราทั้ง 17 ไอโซเลทไม่สามารถลดการเกิดโรคราสนิมของกาแฟได้ แต่แบคทีเรียที่นำจัดจำแนกแล้วทราบว่าเป็นสายพันธุ์ *Brevibacillu schoshinensis, Pectobacterium carotovorum, Bacillus megaterium, Microbacterium testaceum* และ *Cedeceada visae* สามารถลดการเกิดโรคราสนิมกาแฟได้ โดยเฉพาะ *Brevibacillus choshinensis* สามารถลดการเกิดโรคราสนิมได้ถึง 66 เปอร์เซ็นต์

2.2.4 การใช้จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

สุจิตรา และคณะ (2556) ได้ทำการแยกเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากรากข้าวพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี โดยใช้ 13 ไอโซเลต มาทำการทดสอบการความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวผลการทดลองพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตระหว่าง 421.7 - 465.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การผลิตออกซิน (IAA) 8.0 - 21.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการผลิตจิบเบอริลลิน143.7 - 292.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปจัดจำแนกพบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Bacillus safensis*ที่ระดับความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์ โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยเพิ่มความสูง ปริมาณการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ และผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 5.83, 42.62, 43.27 และ 38.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Adhikari*et al*. (2012) ได้ทำการแยกเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากรากและลำต้นของข้าวในแคลิฟอร์เนีย โดยพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่แยกได้คือเชื้อ *Pseudomonas fluorescens,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Pseudomonas tolaasii, Pseudomonas veronii*และ *Sphingomonastrueperi*ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มความสูงของต้นข้าว และน้ำหนักของต้นข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรีย สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้

Raweekul*et al*. (2016) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนโดไฟติกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยทำการแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตจากรากและลำต้นของข้าว พบว่าแบคทีเรียที่แยกมีความเหมือนกับ *Pedobacter, Sphingomonas, Paenibacillus*และ *Bacillus*เมื่อนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวในหลอดทดลองพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสด 2.30-3.18 เท่า และพบว่ามีการผลิต siderophore กรด indole-3-อะซิติก (IAA) ซึ่งมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การใช้ endophytic bacteria ทำ seed bio-priming เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวโดยลดการเกิดโรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* หรือช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

3.1 การแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae*สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และทดสอบการก่อโรค

3.2 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการเสริมความแข็งแรงของกล้าข้าว

3.3 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

3.4 การศึกษาการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

3.1 การแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และทดสอบการก่อโรค

แยกเชื้อรา *P. oryzae* จากข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ข้าว โดยวิธี single spore isolation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) และขอความอนุเคราะห์สายพันธุ์ที่มีการเกิดโรครุนแรงจากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. จากนั้นย้ายต่อไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ Rice Flour agar (RFA) (ยอดขวัญ และคณะ, 2552) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงบนหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลขูดให้ทั่วผิวหน้าอาหารเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ 80 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเจลาติน 2 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร โดยเจลาตินจะทำหน้าที่เป็นสารจับใบ จากนั้นนำไปฉีดพ่นลงบนต้นกล้าข้าวอายุ 30 วัน และตรวจสอบการเกิดโรค โดยประเมินขนาดของแผล 6 ระดับ (Roumen*et al*., 1997) ดังนี้

ระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏแผล

ระดับ 1 คือ แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

ระดับ 2 คือ แผลกลมหรือยาวรีเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5-1 มิลลิเมตร

ระดับ 3 คือ แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร มีจุดสีเทาตรงกลาง

ระดับ 4 คือ แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทามีขอบ แผลน้ำตาล

ระดับ 5 คือ แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

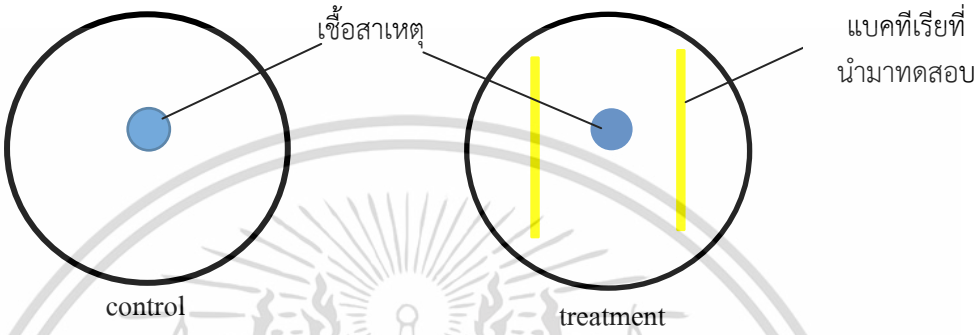
ระดับ6 คือ แผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอนเป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

3.2 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

การทดสอบ endophytic bacteria ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคข้าว (พรหมมาศ และอนัตตา, 2558) และทำการแยกใหม่จากต้นข้าวที่แข็งแรงในแปลงที่มีรายงานการเกิดโรคไหม้ โดยการนำเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาทดสอบกับต้นกล้าข้าว เพื่อหาสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ตามวิธีการของ พรหมมาศ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนัตตา (2558) จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและมาทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา*P. oryzae* บนอาการ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture test วางแผนการทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ นำเชื้อสาเหตุโรคข้าววางลงบนอาหาร PDA โดยวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม ส่วนในกรรมวิธีทดสอบ ให้วางเชื้อสาเหตุโรคข้าวตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน 4 วัน แล้วทำการstreak แบคทีเรียห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างละ 2 เซนติเมตร ดังภาพ



ภาพ Dual culture ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อสาเหตุโรคข้าว

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Growth inhibition = GI)โดยใช้สูตร

$$GI = \frac{C-T}{C} \times 100$$

C = ขนาดโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารควบคุม (control)

T = ขนาดโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารทดสอบ (treatment)

3.3 การทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria และทดสอบคุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ข้าว

3.3.1 การศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของข้าวในการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

ทำการทดลองโดยการนำ endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* จากการทดลองข้อที่ 3.2 มาทำการทดสอบ เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเชื้อดังกล่าวมาเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge 10 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น pellet มาปรับความเข้มข้นให้มีความขุ่นเท่ากับ Mcfarland เบอร์ 0.5 เพื่อให้ได้สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8cfu ต่อมิลลิลิตร แล้วนำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการแช่ sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้เมล็ดจมอยู่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปิดปากบีกเกอร์แก้วด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส วางแผนการทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยแบ่งเป็น 7 กรรมวิธีได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมวิธีที่ 1 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 0 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 2 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 3 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 4 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 5 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 6 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 7 กระตุ้นเมล็ดเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

โดยเมื่อครบเวลาในแต่ละกรรมวิธี จะนำเมล็ดพันธุ์ข้าวในกรรมวิธีนั้นๆ มาซับให้แห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักเมล็ด ก่อนอบด้วยเครื่อง Hot air oven เพื่อตรวจวัดปริมาณความชื้น (ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 17$\pm$ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโหลดูดความชื้น 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักเมล็ดอีกครั้ง แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ-น้ำหนักเมล็ดหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ}} \right) \times 100$$

3.3.2 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดความชื้นเมล็ดพันธุ์ข้าวในการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ที่ได้เวลาเหมาะสมแล้ว มาซับให้แห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักเมล็ด เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 แล้วนำมาลดความชื้นด้วยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยจะสุ่มเมล็ดครั้งละ 5 กรัม 4 ซ้ำ มาชั่งน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์ข้าวทุกชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณหาความชื้นดังสูตรข้อ 3.3.1 เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดด้วย endophytic bacteria

3.3.3 การทดสอบคุณภาพของเมล็ดหลังการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria (Bio-priming) ที่ได้ระยะเวลาการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.1 และระยะเวลาการลดความชื้นที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.2 มาทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ และความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ผ่านกระกระตุ้น (No priming) เมล็ดที่กระตุ้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro-priming) และเมล็ดที่กระตุ้นด้วยสารเคมี Carbendazim (Osmopriming)

โดยจะทำการตรวจสอบดังนี้

1. ความชื้นของเมล็ดพันธุ์

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าว 5 กรัม มาตรวจสอบความชื้นด้วยวิธีมาตรฐานโดยการอบด้วยเครื่อง Hot air oven เป็นเวลา 17$\pm$1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ-น้ำหนักเมล็ดหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ}} \right) \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ความงอกของเมล็ดพันธุ์

ทดสอบความงอกด้วยวิธีการเพาะบนกระดาษโดยใช้วิธี Top of Paper ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับครั้งแรกหลังจากเพาะเมล็ด 5 วัน และตรวจนับครั้งสุดท้ายหลังจากเพาะเมล็ด 14 วัน โดยจะตรวจนับ จำนวนต้นปกติ จำนวนต้นที่ผิดปกติ เมล็ดสดไม่งอก และเมล็ดตาย จากนั้นคำนวณความงอกของเมล็ดพันธุ์เป็นเปอร์เซ็นต์ดังสูตร

$$\text{ความงอก (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนต้นปกติที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \right) X100$$

3.3.4 การทดสอบความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteriaแล้วเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 มาทำการทดสอบโดยสุ่มตัวอย่างทุกๆเดือน เพื่อตรวจสอบการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว เป็นระยะเวลา 4 เดือน พร้อมสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 1 กรัม แช่ใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตามด้วยแช่ Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง และซับด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาบดด้วยโกร่ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายมาตรวจสอบด้วยการทำ serial dilution planting technique จากนั้นตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate technique บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบCompletely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

3.4 การทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรคไหม้ข้าวในระยะกล้าหลังการทำ seed bio-priming

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไม่กระตุ้นเมล็ดพันธุ์และไม่ปลูกเชื้อรา *P. oryzae*(control)

กรรมวิธีที่ 2 ไม่กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae*(No priming)

กรรมวิธีที่ 3 กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae* (Hydro-priming)

กรรมวิธีที่ 4 กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อนทำการปลูกเชื้อ *P. oryzae* (Osmopriming)

กรรมวิธีที่ 5 กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria ก่อนทำการปลูกเชื้อ *P. oryzae*(Bio-priming)

กรรมวิธีที่ 6 กระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria ร่วมกับการฉีดพ่นทางใบก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* (Bio-priming+spray)

การเตรียมต้นกล้าและดินปลูกข้าว โดยเตรียมดินปลูกข้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุลงในกระถางปริมาณ 5 กิโลกรัมต่อกระถาง และบ่มดินภายในสภาพน้ำขังเป็นระยะเวลา 7 วัน นำเมล็ดข้าว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกระตุ้นเมล็ดตามกรรมวิธีต่างๆ โดยกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารเคมีก่อนการปลูกเชื้อจะแช่เมล็ดข้าวในสารเคมี Carbendazim ที่อัตรา 5 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร ส่วนกรรมวิธีที่กระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria จะแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8cfuต่อมิลลิลิตร โดยทุกกรรมวิธีจะทำการแช่เมล็ดไว้ที่ระยะเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.1 แล้วลดความชื้นให้อยู่ที่ระยะเวลาตามข้อ 3.3.2 ก่อนปลูกข้าวด้วยการเพาะกล้าข้าวก่อน 14 วัน แล้วจึงนำไปปลูกกระถางละ 5 ต้น สำหรับกรรมวิธีที่ 6ฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชเป็นเวลา 2 วัน ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

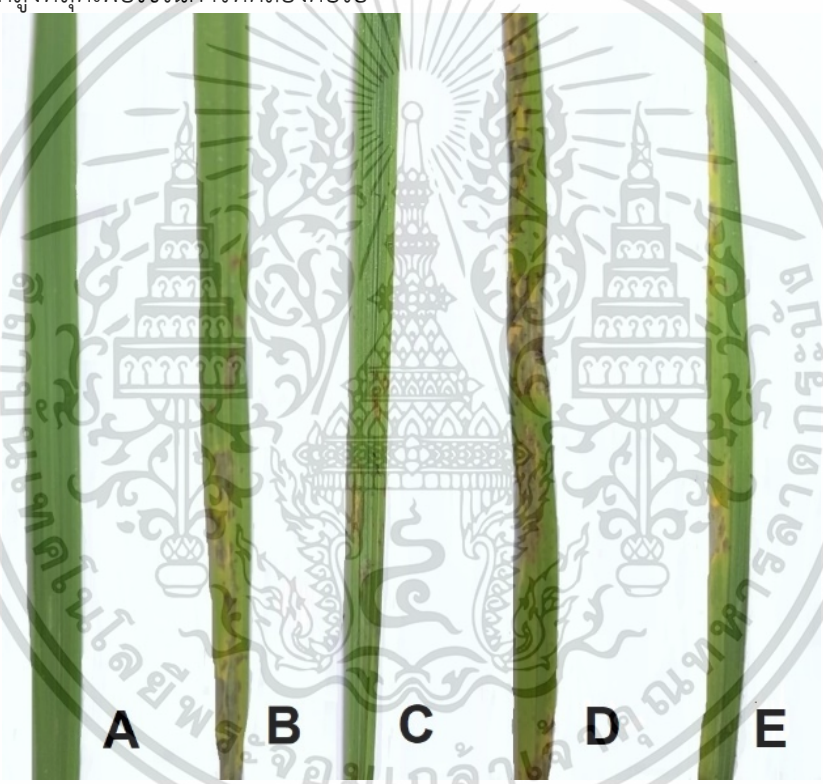
ตรวจผลโดยทำการประเมินโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* สังเกตจากลักษณะอาการและความรุนแรงของการเกิดโรค โดยประเมินจากขนาดแผลตามข้อ 3.1 ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1. ผลการแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และทดสอบการก่อโรค

จากการแยกเชื้อรา *Pyriculariaoryzae*จากข้าวที่แสดงการเกิดโรคไหม้ด้วยวิธี single spore isolation พบว่าไอโซเลทที่แยกได้นั้นได้แก่ BTN6001 และเมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคเปรียบเทียบกับไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล ทั้ง 3 ไอโซเลทคือ RBR55001 UBN195171 และBKK55003 ผลการทดสอบโรคพบว่า ไอโซเลทRBR55001 มีระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุดอยู่ในระดับ 6 รองมาได้แก่ไอโซเลทBKK55003 อยู่ที่ระดับ 5 ไอโซเลทUBN195271 และ BTN6001 อยู่ที่ระดับ 4 และ 3 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นจึงเลือกใช้ไอโซเลทRBR55001 ที่มีความรุนแรงของโรคสูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดงการเกิดโรคไหม้ข้าวภายหลังทำการทดสอบโรคเป็นเวลา 7 วัน (A=control; B=BKK55003; C=UBN195171; D= RBR55001 และBTN6001)

4.2 ผลการคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

4.2.1 ผลการคัดเลือก endophytic bacteria ต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว

จากการทดลองสามารถแยก endophytic bacteric ได้ใหม่ทั้งหมด 31 ไอโซเลท ได้แก่ SnR117, SnS217, SnS317, Sn417, SnR517, SnR617, SnS717, SnR817, SnS917, SnS1017, SuR117, SuS217, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117, Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917, BaR1017 เมื่อนำไปทดสอบทางสัณฐานเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ การย้อมแกรม และ 3 %KOH พบว่าเป็นแกรมบวก 27 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเป็นแกรมลบเพียง 4 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท SnR117, SnR617, Su2R317 และ Su2R617 โดยแกรมบวกส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น ลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นแบบ bacillus แกรมลบที่พบจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวใส ลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นแบบ coccusนอกจากนี้ยังพบว่ามีลักษณะอื่นๆ เช่น โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สี และรูปร่างของเซลล์แตกต่างกันไปตามตารางที่ 4.1และภาพที่ 4.2และยังใช้ endophytic bacteric ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวจาก พรหมมาศ และอนัตตา (2558) จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ BEdStUTI001, BEdStUTI002, BEdStUTI003, BEdStUTI004, BEdStUTI006, BEdStRBR001, BEdStRBR002, BEdStRBR003, BEdStRBR005, BEdStSPB001, BEdStSPB002, BEdStSPB003, BEdStSPB004, BEdStSPB005, BEdSTPB001_rมาศึกษาร่วมด้วย

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ คุณสมบัติเบื้องต้นของ endophytic bacteria

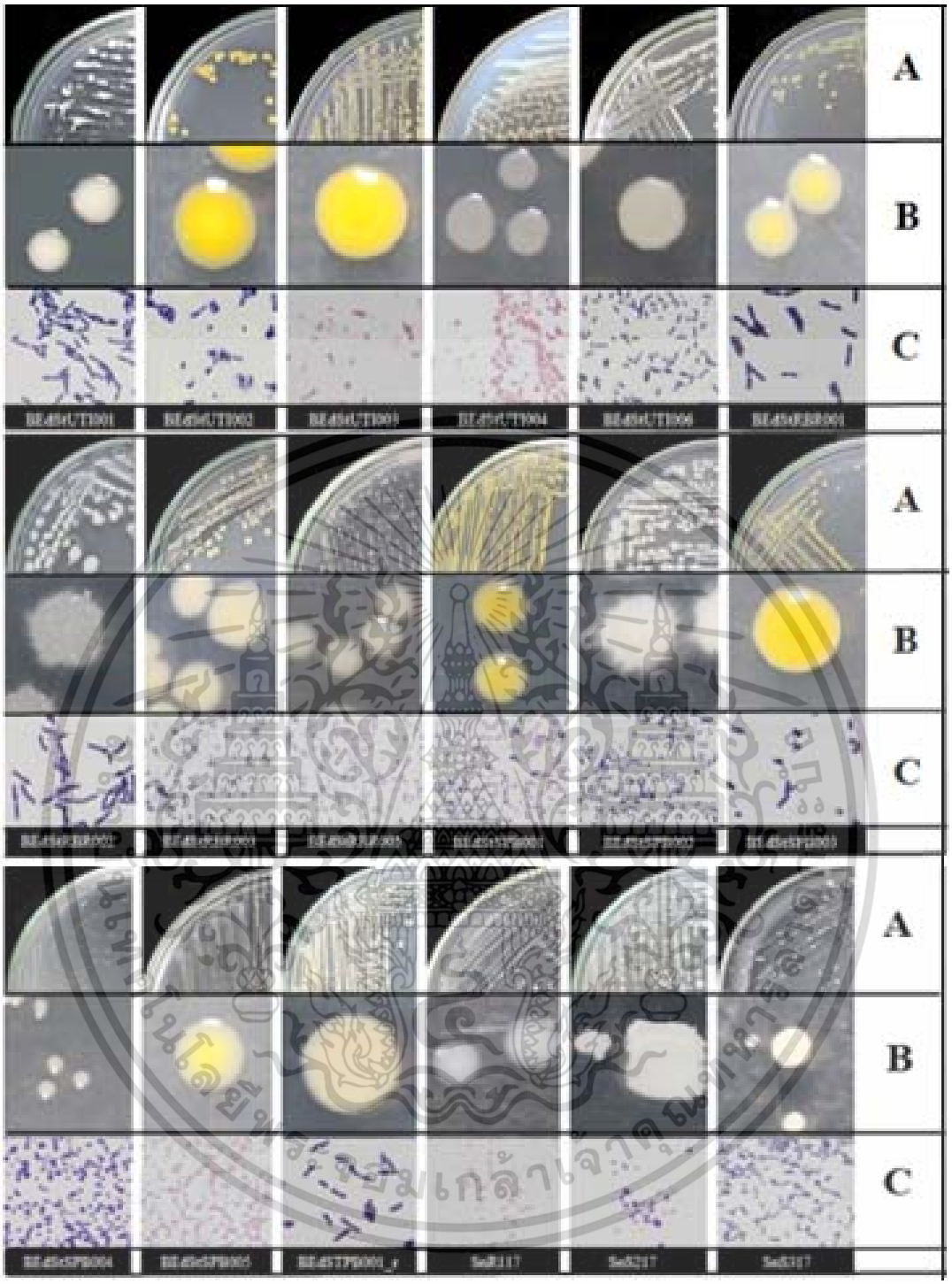
แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA				3%KO	Gram	ลักษณะ
	สี	รูปร่าง	ขอบ	ผิว	H test	staining	รูปร่าง
1.BEdStUTI001	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
2.BEdStUTI002	เหลือง	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
3.BEdStUTI003	เหลือง	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
4.BEdStUTI004	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
5.BEdStUTI006	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เรียบ	+	+	bacillus
6.BEdStRBR001	เหลืองใส	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
7.BEdStRBR002	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	ขรุขระ	+	+	bacillus
8.BEdStRBR003	เนื้อ	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
9.BEdStRBR005	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	coccobacilli
10.BEdStSPB001	เหลือง	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	coccobacilli
11.BEdStSPB002	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เรียบ	+	+	bacillus
12.BEdStSPB003	เหลือง	กลม	เรียบ	ขรุขระ	+	+	bacillus
13. BEdStSPB004	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	coccobacilli
14.BEdStSPB005	เหลืองใส	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
15.BEdSTPB001_r	เนื้อ	กลม	เรียบ	ขรุขระ	+	+	bacillus
---------- (พรหมมาศ และอนัตตา, 2558)							
16.SnR117	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
17.SnS217	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	เป็นคลื่น	เรียบ	+	+	bacillus
18.SnS317	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เรียบ	+	+	bacillus
19.SnS417	เนื้อ	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
20.SnR517	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
21.SnR617	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
22.SnS717	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
23.SnR817	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
24.SnS917	เนื้อ	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
25.SnS1017	เหลือง	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
26.SuR117	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
27.SuS217	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
28.SuR317	ขาวขุ่น	กลม	เป็นคลื่น	เรียบ	+	+	bacillus

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

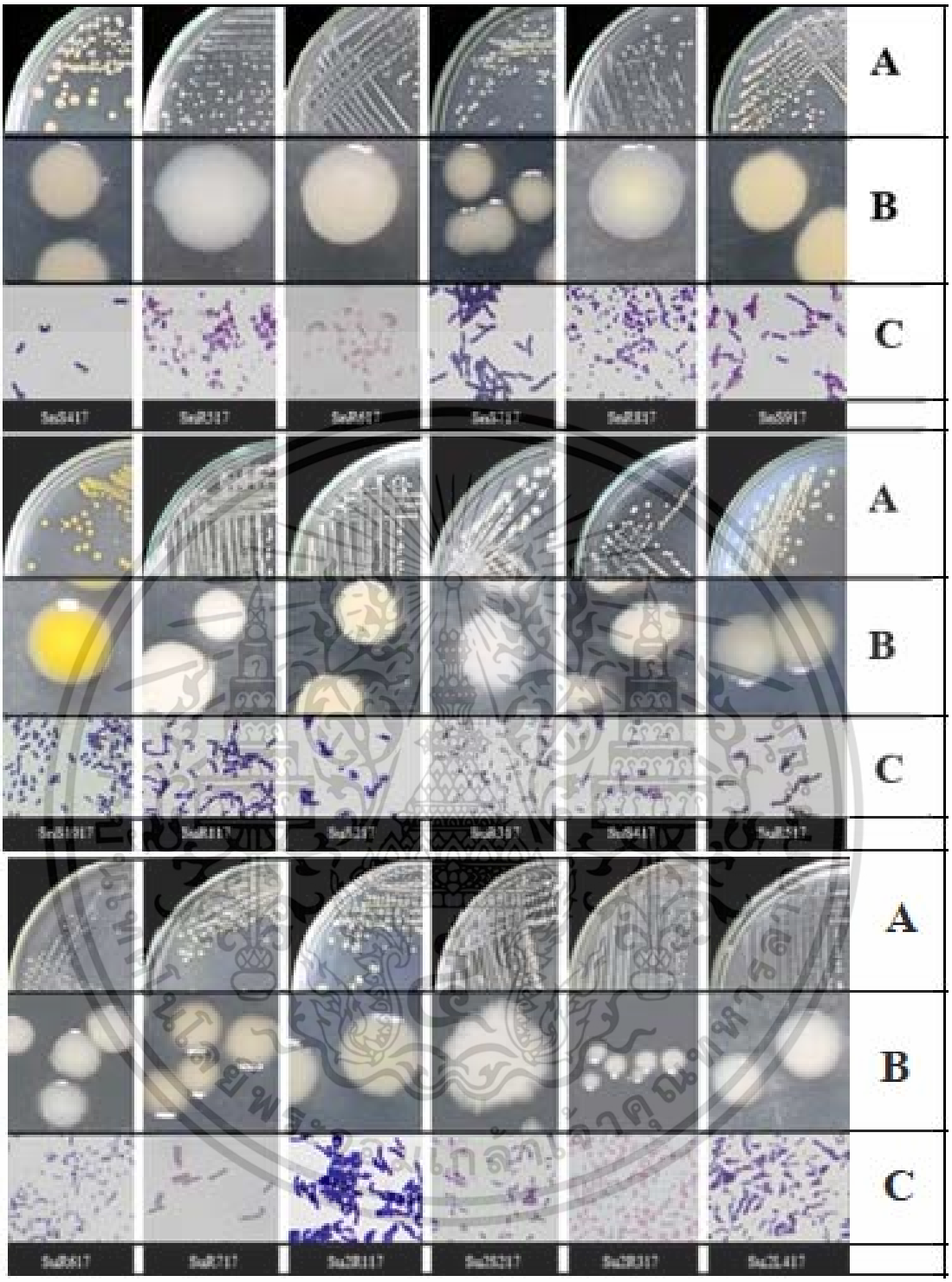
แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA				3%KOH test	Gram staining	ลักษณะรูปร่าง
	สี	รูปร่าง	ขอบ	ผิว			
29.SuS417	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
30.SuR517	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
31.SuR617	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
33.Su2R117	เนื้อ	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
34.Su2S217	ขาวขุ่น	กลม	เป็นคลื่น	ขรุขระ	+	+	bacillus
35.Su2R317	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
36.Su2L417	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	bacillus
37.Su2R517	ขาวขุ่น	กลม	เป็นคลื่น	ขรุขระ	+	+	bacillus
38.Su2R617	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	-	-	coccus
39.BaR217	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	coccobacilli
40.BaR317	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	ขรุขระ	+	+	coccobacilli
41.BaS417	ขาวขุ่น	กลม	เป็นคลื่น	ขรุขระ	+	+	bacillus
42.BaL517	เนื้อ	กลม	เรียบ	เรียบ	+	+	bacillus
43.BaR617	ขาว	กลม	เรียบ	เป็นเมือก	+	+	coccobacilli
44.BaL717	ขาวขุ่น	กลม	เป็นคลื่น	ขรุขระ	+	+	coccobacilli
45.BaR917	ขาวขุ่น	กลม	เรียบ	เรียบ	+	+	bacillus
46.BaR1017	น้ำตาล	กลม	เป็นคลื่น	เป็นเมือก	+	+	bacillus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



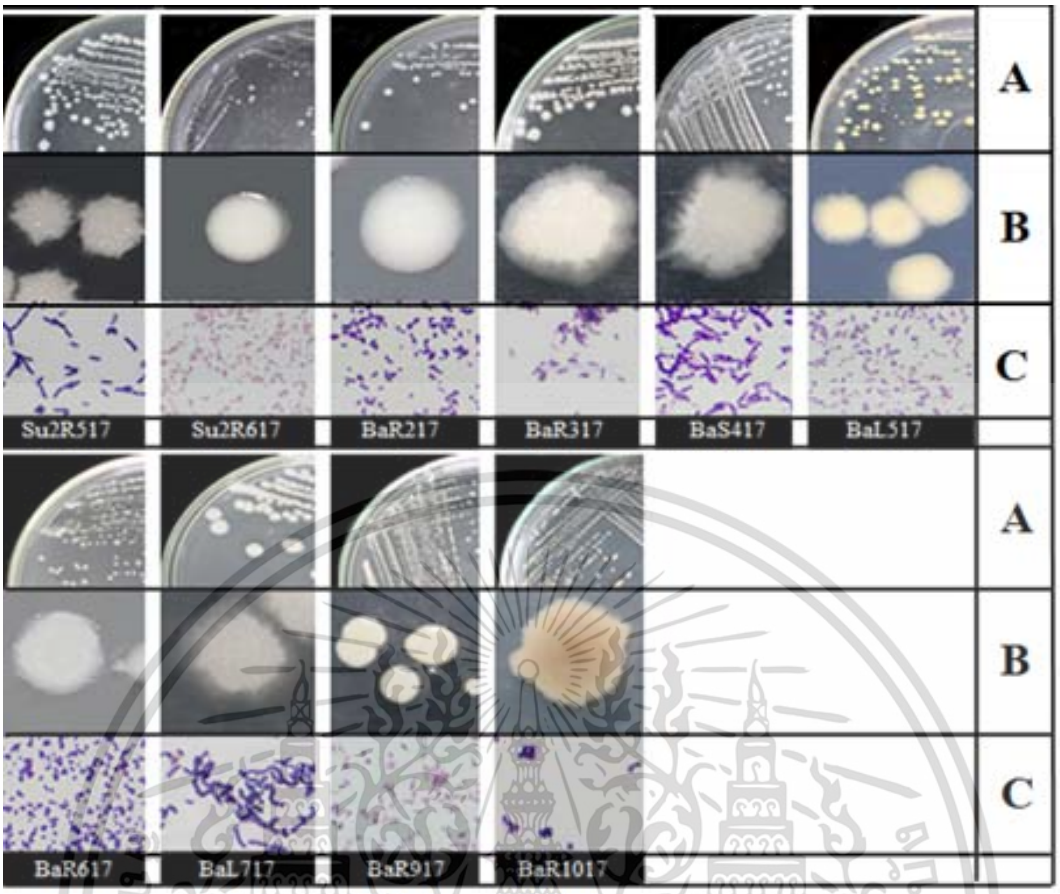
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากข้าว (A= ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, B =ลักษณะโคโลนีที่กำลังขยาย6.7เท่าและ C = การติดสีย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

นอกจากนี้การศึกษาผลของ endophytic bacteria ต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวนั้นพบว่า จำนวนใบ และการรอดชีวิตของต้นกล้าข้าวในทุกไอโซเลทไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ส่วนความสูง น้ำหนักต้น น้ำหนักราก และน้ำหนักรวมในทุกไอโซเลทมีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำมาคำนวณเป็น %sviพบว่ามีทั้งหมด 43 ไอโซเลท ที่มี %sviสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยไอโซเลทBaR917 มีค่า %sviสูงที่สุดคือ 128.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 28.9เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท BaR217 และ SuR617 โดยมีค่า %sviเท่ากับ 128.42 และ128.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลของ endophytic bacteria ต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว

แบคทีเรีย	จำนวนใบ	ความสูง (ซ.ม.)	การรอดชีวิตของต้นกล้า	น้ำหนักต้น (กรัม)	น้ำหนักราก (กรัม)	น้ำหนักรวม (กรัม)	%svi
1.control	2.2ab[1/]	13.05c	92.50ab	0.21abc	0.36cd	0.57bcd	100
2.BEdStUTI001	2.1ab	14.37abc	100a	0.19abc	0.36cd	0.56cd	107.74
3.BEdStUTI002	2.2a	13.25abc	97.50ab	0.20abc	0.38abcd	0.59abcd	111.61
4.BEdStUTI003	2b	13.00c	100a	0.18bc	0.36cd	0.54d	104.37
5.BEdStUTI004	2.15ab	13.12bc	97.50ab	0.17c	0.36cd	0.54d	101.76
6.BEdStUTI006	2.2a	13.07c	95.00ab	0.19abc	0.35cd	0.55cd	100.98
7.BEdStRBR001	2b	13.82abc	100a	0.19abc	0.38bcd	0.58abcd	111.59
8.BEdStRBR002	2b	13.90abc	100a	0.18bc	0.38abcd	0.57abcd	110.14
9.BEdStRBR003	2.15ab	13.10c	100a	0.18bc	0.36cd	0.55cd	105.82
10.BEdStRBR005	2b	14.68abc	92.50ab	0.23ab	0.37cd	0.60abcd	116.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย	จำนวนใบ	ความสูง (ซ.ม.)	การรอดชีวิตของต้นกล้า	น้ำหนักต้น (กรัม)	น้ำหนักราก (กรัม)	น้ำหนักรวม (กรัม)	%svi
11.BEdStSPB001	2b	14.52abc	97.50ab	0.19abc	0.35d	0.54cd	105.33
12.BEdStSPB002	2.05ab	15.37a	97.50ab	0.19abc	0.35cd	0.54cd	105.33
13.BEdStSPB003	2.05ab	14.11abc	100a	0.23ab	0.40abcd	0.63abcd	121.21
14. BEdStSPB004	2.05ab	14.45abc	100a	0.21abc	0.38bcd	0.59abcd	114.47
15.BEdStSPB005	2.05ab	14.60abc	100a	0.18bc	0.39abcd	0.57abcd	111.11
16.BEdSTPB001_r	2.15ab	13.76abc	97.50ab	0.19abc	0.38bcd	0.57abc	107.86
17.SnR117	2.1ab	13.01c	92.50ab	0.18bc	0.35cd	0.54d	96.54
18.SnS217	2b	15.22abc	100a	0.19abc	0.35d	0.55cd	106.30
19.SnS317	2.05ab	13.15bc	100a	0.18bc	0.36cd	0.54d	104.37
20.SnS417	2b	14.09abc	95.00ab	0.18bc	0.38abcd	0.57bcd	104.18
21.SnR517	2.05ab	14.85abc	97.50ab	0.17c	0.35cd	0.54d	104.37
22.SnR617	2.05ab	14.80abc	100a	0.20abc	0.41abcd	0.62abcd	119.76
23.SnS717	2.05ab	13.15bc	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.93
24.SnR817	2b	14.43abc	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.45
25.SnS917	2.05ab	13.42abc	97.50ab	0.22abc	0.39abcd	0.61abcd	114.89
26.SnS1017	2b	13.02c	95.00ab	0.19abc	0.35d	0.53d	98.24
27.SuR117	2b	13.00c	97.50ab	0.18bc	0.35cd	0.54cd	102.23
28.SuS217	2.1ab	15.12abc	97.50ab	0.19abc	0.35d	0.55cd	97.07
29.SuR317	2.1ab	15.32ab	100a	0.21abc	0.42abcd	0.63abcd	121.21
30.SuS417	2.15ab	13.38abc	95.00ab	0.22abc	0.42abcd	0.64abc	117.89
31.SuR517	2.15ab	13.15bc	95.00ab	0.19abc	0.37cd	0.56cd	103.72
32.SuR617	2.05ab	14.18abc	97.50ab	0.22abc	0.45a	0.66ab	128.03
33.SuR717	2.15ab	13.00c	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.93
34.Su2R117	2.15ab	13.03c	97.50ab	0.20abc	0.36cd	0.56cd	105.51
35.Su2S217	2.1ab	13.90abc	92.50ab	0.23ab	0.38abcd	0.61abcd	109.89
36.Su2R317	2.1ab	14.33abc	90.00b	0.21abc	0.38abcd	0.60abcd	103.89
37.Su2L417	2b	13.78abc	100a	0.24a	0.37cd	0.61abcd	117.84
38.Su2R517	2b	13.62abc	100a	0.20abc	0.36cd	0.57bcd	109.66
39.Su2R617	2.05ab	14.07abc	100a	0.20abc	0.37cd	0.57bcd	109.66
40.BaR217	2.05ab	14.75abc	97.50ab	0.21abc	0.45ab	0.66ab	128.42
41.BaR317	2.1ab	13.24abc	100a	0.19abc	0.35cd	0.55cd	105.82
42.BaS417	2.15ab	13.64abc	97.50ab	0.19abc	0.35cd	0.55cd	103.17
43.BaL517	2b	13.82abc	100a	0.19abc	0.40abcd	0.60abcd	115.92
44.BaR617	2b	14.47abc	95.00ab	0.21abc	0.36cd	0.58abcd	106.01
45.BaL717	2.1ab	14.70abc	100a	0.20abc	0.40abcd	0.62abcd	119.28
46.BaR917	2.1ab	13.73abc	100a	0.24a	0.43abc	0.67a	128.90
47.BaR1017	2.1ab	13.24abc	97.50ab	0.19abc	0.43abc	0.62abcd	116.30
F-test	*	*	*	*	*	*	-
C.V. (%)	4.60	6.90	5.27	14.57	10.76	9..69	-

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple range test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

จากการนำ endophytic bacteria ทั้ง 46 ไอโซเลท มาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *P .oryzae*สาเหตุโรคไหม้ข้าวด้วยวิธี dual culture test ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามี 5 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuS217, BarR917, BaS417, SuR317 และ Su2S217 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 58.74, 61.11, 64.86, 66.66 และ 66.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระหว่าง 9.72-49.02 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

แบคทีเรีย	การยับยั้งเชื้อรา*P.oryzae*	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.)[1/]	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1.BEdStUTI001	7.53	16.25
2.BEdStUTI002	7.52	16.38
3.BEdStUTI003	6.88	23.47
4.BEdStUTI004	7.15	20.55
5.BEdStUTI006	7.25	19.44
6.BEdStRBR001	5.71	36.52
7.BEdStRBR002	7.75	13.88
8.BEdStRBR003	5.71	36.52
9.BEdStRBR005	7.41	17.63
10.BEdStSPB001	8.12	9.72
11.BEdStSPB002	5.40	40.00
12.BEdStSPB003	5.18	42.36
13. BEdStSPB004	6.5	27.77
14.BEdStSPB005	4.58	49.02
15.BEdSTPB001_r	6.85	23.88
16.SnR117	5.50	38.88
17.SnS217	5.50	38.88
18.SnS317	6.18	31.25
19.SnS417	7.15	20.48
20.SnR517	5.87	34.72
21.SnR617	6.42	28.61
22.SnS717	5.35	40.55
23.SnR817	6.28	30.13
24.SnS917	6.21	30.97
25.SnS1017	7.00	22.22
26.SuR117	5.77	35.83
27.SuS217	3.73	58.47
28.SuR317	3.00	66.66
29.SuS417	5.71	36.52

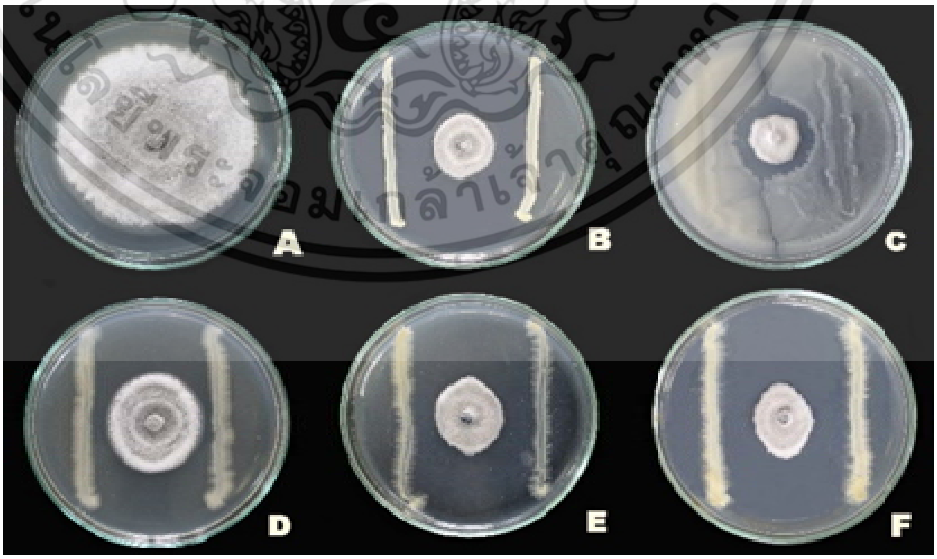
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	การยับยั้งเชื้อรา *P.oryzae*	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.)[1/]	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
30.SuR517	6.08	32.36
31.SuR617	7.78	13.47
32.SuR717	5.91	34.30
33.Su2R117	7.61	15.41
34.Su2S217	2.98	66.80
35.Su2R317	6.55	27.22
36.Su2L417	5.77	35.83
37.Su2R517	5.90	34.44
38.Su2R617	6.96	22.63
39.BaR217	6.30	30.00
40.BaR317	6.61	26.52
41.BaS417	3.16	64.86
42.BaL517	6.82	24.16
43.BaR617	8.03	10.69
44.BaL717	5.23	41.80
45.BaR917	3.50	61.11
46.BaR1017	6.60	26.66
F-test	*[2/]	*
C.V. (%)	2.23	16.04

[1/] ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ 14 วัน

[2/]* =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการทดสอบด้วยวิธี Dual-culture (A=control, B = BarR917, C=BaS417, D=SuR317, E= SuS217และ F=Su2S217)

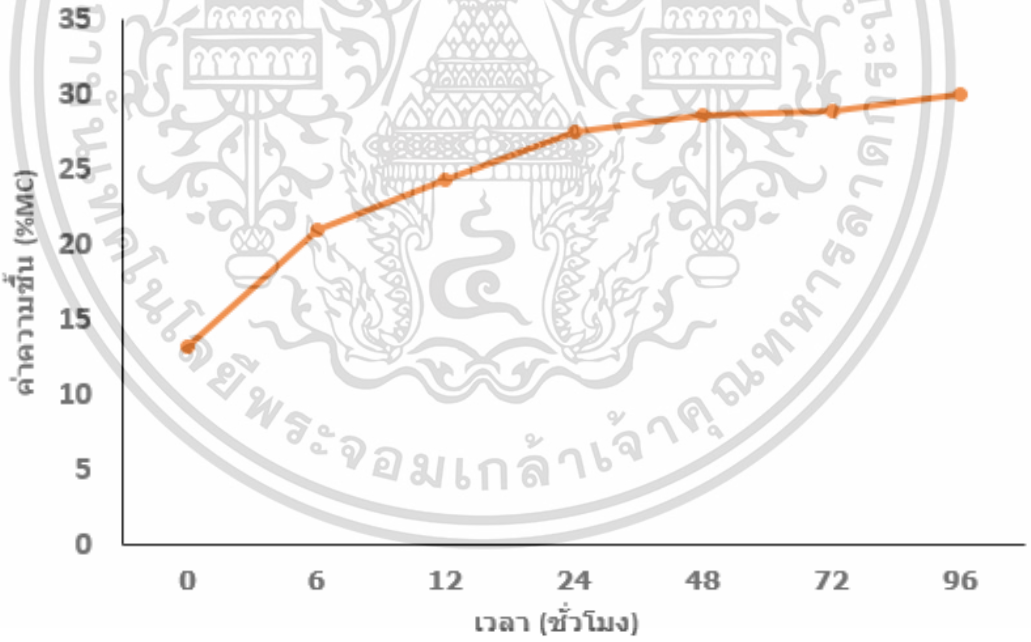
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจากการทดสอบคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีผลต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว ทำให้สามารถคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นประโยชน์ได้หลายไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีความน่าสนใจได้แก่ BaR917 เนื่องจากมีค่า %SVI สูงที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวอยู่ใน 5 อันดับแรก ไอโซเลทBaR917 จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปศึกษาต่อในการทำการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพ

4.3 การทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteriaและทดสอบคุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ข้าว

4.3.1 การศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของข้าวในการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

จากการศึกษาพบว่าการกระตุ้นเมล็ดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ได้มีรายงานไว้นั้นได้ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteriaที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากเมล็ดมีการดูดน้ำคงที่แล้วสังเกตเห็นได้จากภาพที่ 4.4 ที่ช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 12 ชั่วโมงเมล็ดมีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แล้วเริ่มช้าลงในชั่วโมงที่ 24 และคงที่ในชั่วโมงที่ 48 ก่อนจะมีการดูดน้ำเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งการดูดน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าเมล็ดเริ่มเข้าสู่ระยะการงอกของเมล็ดแล้วจึงเลือกการกระตุ้นเมล็ดในชั่วโมงที่ 48 เพื่อนำไปใช้ในการทำการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.4 การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดความชื้นเมล็ดพันธุ์ข้าวในการทำ seed bio-priming ด้วย endophytic bacteria

จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาในการลดความชื้นเมล็ดพันธุ์ข้าวในการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria ที่เหมาะสมคือที่ 10 ชั่วโมง โดยค่าความชื้นอยู่ที่ 13.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความชื้นในระดับเดิมก่อนทำการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่อยู่ที่ 13 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการลดความชื้นในการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria จะลดความชื้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงความชื้น ในการลดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวหลังแช่เมล็ดด้วย สารแขวนลอย endophytic bacteria

ชั่วโมง	ค่าความชื้น (%MC)
0	28.58
1	28.15
2	26.83
3	24.88
4	22.03
5	22.04
6	19.93
7	18.20
8	18.14
9	15.62
10	13.20
11	10.95
12	10.21
13	9.81
14	9.63
15	9.34
16	9.27
17	9.21
18	9.18
19	8.54
20	8.19
21	8.12
22	7.86
23	7.65
24	7.56
F-test	*[1/]
C.V. (%)	24.16

[1/]* =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์หลังการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ด้วยendophytic bacteria

4.3.3.1. ความชื้นของเมล็ดพันธุ์

จากการศึกษาพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของทุกกรรมวิธีภายหลังการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ข้าวในเดือนที่ 0 ถึง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเดือนที่ 4 กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารเคมี (Osmopriming) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่เมล็ดไม่ผ่านกระกระตุ้นเมล็ด (No priming) เมล็ดที่กระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro-priming) และการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria (Bio-priming) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 4.5

4.3.3.2 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว

ผลการทดลองพบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวในเดือนที่ 0 ถึง 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในเดือนที่ 3กรรมวิธีที่เมล็ดไม่ผ่านกระกระตุ้น (No priming) เมล็ดที่กระตุ้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro-priming)และเมล็ดที่กระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในเดือนที่ 4 กรรมวิธีเมล็ดที่กระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดเท่ากับ 95.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เมล็ดที่กระตุ้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro- priming) เท่า 94.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกระตุ้นเมล็ด หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยความชื้นเมล็ดพันธุ์ข้าว (%)				
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
No priming	14.52/	14.81	16.34	17.48	17.53b
Hydro priming	13.39	13.99	15.97	16.03	17.26b
Osmo priming	14.10	14.14	17.69	18.12	19.65a
Bio priming	13.80	13.84	15.89	18.32	19.13ab
F-test	ns[1/]	ns	ns	ns	*
C.V. (%)	20.12	9.39	9.39	7.02	6.63

[1/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกระตุ้นเมล็ด หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยการงอกของเมล็ด (%)				
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
No priming	92.25	93.00	92.00	92.75a	93.00b
Hydro priming	93.00	93.50	93.50	92.00ab	94.25ab
Osmo priming	92.00	93.25	93.00	90.50b	93.25b
Bio priming	94.25	93.75	93.25	93.50a	95.50a
F-test	ns	ns	ns	*	*
C.V. (%)	2.23	2.12	1.57	1.42	1.42

[1/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4.3.3.3 ผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria

จากผลการศึกษาพบว่า endophytic bacteria ภายในเมล็ดพันธุ์ข้าวภายหลังจากการกระตุ้นเมล็ดมีการลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยตั้งแต่เริ่มทำการทดลองเดือนที่ 0 ถึงเดือนที่ 4 โดยมีการลดลงจาก 4.56log cfu/ml เป็น 4.25log cfu/ml หรือลดลงไปเพียง 0.31 log cfu/ml(ภาพที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า endophytic bacteria สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในเมล็ดพันธุ์ข้าวภายหลังการกระตุ้นเมล็ดอย่างน้อยที่สุดเป็นระยะเวลา 4 เดือน

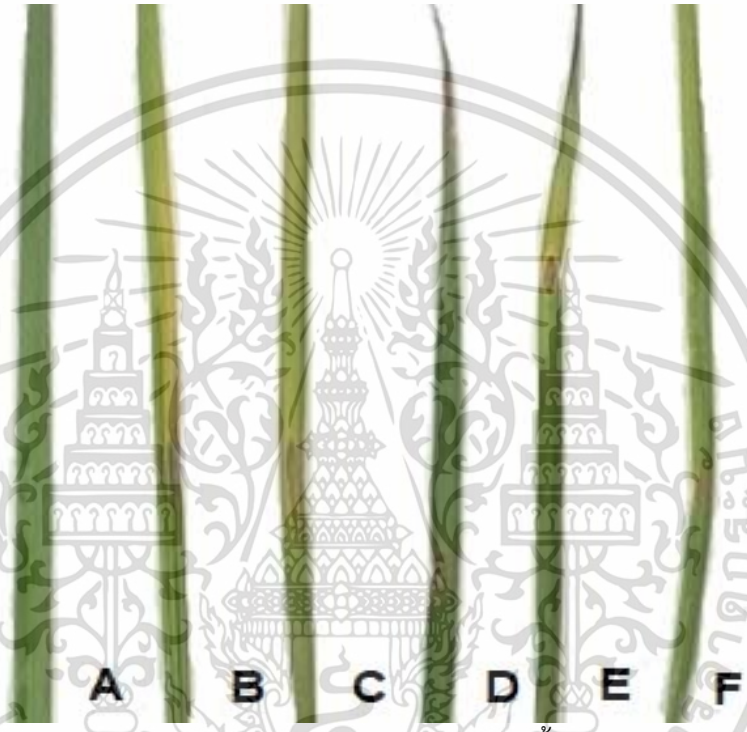
ภาพที่ 4.5 จำนวน endophytic bacteria ภายหลังการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวเป็นระยะเวลา 4 เดือน

4.4 การทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรคไหม้ข้าวในระยะกล้าหลังการทำ seed bio-priming

จากการศึกษาพบว่ากรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม (Osmo priming)ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* มีระดับความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดอยู่ที่ระดับ 3 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีกระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* และกรรมวิธีที่ใช้การกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ร่วมกับการฉีดพ่นทางใบ (Bio-priming+spray) ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* โดยระดับความรุนแรงอยู่ในระดับที่ 4 ส่วนกรรมวิธีที่ไม่กระตุ้นเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(No priming) ก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae* และกระตุ้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro-priming) ก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae* มีระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุดอยู่ในระดับที่ 6 สังเกตได้จากภาพที่ 4.6 เช่นเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดโรคที่พบว่ากรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นการงอกด้วยสารเคมี (Osmo priming) ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* มีอัตราการเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่กรรมวิธีที่ใช้การกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ร่วมกับการฉีดพ่นทางใบก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae*และกรรมวิธีกระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio priming) ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดโรคเท่ากับ 15 และ 15.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)



ภาพที่ 4.6 การเกิดโรคไหม้ข้าวในกรรมวิธีต่างๆ ภายหลังการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* เป็นเวลา 7 วัน (A=control; B= No priming; C=Hydro priming; D=Osmo priming E=Bio priming และ F= Bio priming+spray)

ตารางที่ 4.7 อัตราการเกิดโรคไหม้ข้าวในกรรมวิธีต่างๆ ภายหลังทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae*

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยอัตราการเกิดโรค (%)
No priming	21.33a
Hydro priming	20.60a
Osmo priming	11c
Bio priming	15b
Bio priming+spray	15.67b
F-test	*[1/]
C.V. (%)	0.89

[1/]* =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple range test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผล สรุปผลงานวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* จากข้าวที่แสดงการเกิดโรคไหม้ด้วยวิธี single spore isolation พบว่าไอโซเลทที่แยกได้นั้นได้แก่ BTN6001 และไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ RBR55001 UBN195171 และBKK55003 เมื่อนำมาทดสอบโรคพบว่า ไอโซเลท RBR55001 มีระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุด อยู่ในระดับ 6 รองลงมาได้แก่ไอโซเลท BKK55003 อยู่ที่ระดับ 5 ไอโซเลทUBN195171 และ BTN6001 อยู่ที่ระดับ 4 และ 3 ไอโซเลทRBR55001 เป็นไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการเกิดโรคสูงที่สุด สอดคล้องกับที่ นวรัตน์ และคณะ (2557) รายงานไว้ดังนั้นจึงเลือกเอาไอโซเลทนี้ไปใช้ในการทดลองการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria เพื่อควบคุมโรคไหม้ข้าวในการทดลองต่อไป

ในการทดลองนี้จะใช้ endophytic bacteriabacteria ที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคข้าวจาก พรหมมาศ และอนัตตา, (2558) 15 ไอโซเลทได้แก่ BEdStUTI001, BEdStUTI002, BEdStUTI003, BEdStUTI004, BEdStUTI006, BEdStRBR001, BEdStRBR002, BEdStRBR003, BEdStRBR005, BEdStSPB001, BEdStSPB002, BEdStSPB003, BEdStSPB004, BEdStSPB005 และ BEdSTPB001_r และที่สามารถแยก endophytic bacteria ได้ใหม่ 31 ไอโซเลท ได้แก่ SnR117, SnS217, SnS317, Sn417, SnR517, SnR617, SnS717, SnR817, SnS917, SnS1017, SuR117, SuS217, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117, Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917, และ BaR1017 รวมทั้งหมด 46 ไอโซเลทพบว่าส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก 39 ไอโซเลท และเป็นแกรมลบเพียง 7 ไอโซเลท โดยมีลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สี และรูปร่างของเซลล์แตกต่างกันไปตามแต่ละไอโซเลท ซึ่งการแยกและคัดเลือก endophytic bacteria เป็นการทดลองเพื่อที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์สำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโต และควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เห็นได้จากมีงานวิจัยในด้านนี้จำนวนมากในหลายๆ พื้นที่ (Hardoim*et al*., 2008; Yang *et al*., 2008 Muthukumar and Venkatesh, 2013; Koohakan and Konrangdee, 2015) จะเห็นได้ว่าการคัดเลือก endophytic bacteria ต่อการเจริญของพืชเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกมาได้นั้นอาจจะเป็นได้ทั้งแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ หรือเป็นโทษต่อพืช (Lynch, 1990) ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกไอโซเลทที่เป็นโทษออกไป เพื่อให้เหลือเพียงไอโซเลทที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชเท่านั้น และเมื่อนำ endophytic bacteria ไปศึกษาผลต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวเพื่อคัดเลือกนั้นผลการทดลองพบว่า จำนวนใบ และการรอดชีวิตของต้นกล้าข้าวในทุกไอโซเลทไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ส่วนความสูง น้ำหนักต้น น้ำหนักราก และน้ำหนักรวมในทุกไอโซเลทมีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำมาคำนวณเป็น %svi พบว่ามีทั้งหมด 43 ไอโซเลทที่มี %svi สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยไอโซเลท BaR917 มีค่า %svi สูงที่สุดคือ 128.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 28.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท BaR217 และ SuR617 โดยมีค่า %svi เท่ากับ 128.42 และ128.03 ตามลำดับ ไอโซเลท BaR917 จึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว จากนั้นเมื่อนำ endophytic bacteriaทั้ง 46 ไอโซเลทมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ข้าวด้วยวิธี dual culture test ในห้องปฏิบัติการพบว่า มี 5 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuS217, BarR917, BaS417, SuR317 และ Su2S217 โดยมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 58.74, 61.11, 64.86, 66.66 และ 66.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไอโซเลท อื่นๆ ก็ยังคงมีสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 9.72 - 49.02 เปอร์เซ็นต์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ji *et al*. (2013) ที่ได้ทำการแยกเชื้อ endophytic bacteria จากข้าว 10 สายพันธุ์ได้ทั้งหมด 576 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียที่แยกมาได้นั้นมี 12 ไอโซเลท ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ และได้ศึกษาต่อไปถึงการนำไปใช้เพื่อยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคข้าวที่สำคัญ เช่นเดียวกับอีกหลายงานวิจัยที่ได้รายงานว่าเชื้อ endophytic bacteria สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (พรหมมาศ และอนัตตา, 2558; Nejad and Johnson, 2002; Pageni*et al*., 2013) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า endophytic bacteria ไอโซเลทที่น่าสนใจได้แก่ BaR917 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นกล้า seedling vigour index หรือ %sviสูงที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* อยู่ใน5 ไอโซเลทที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด ไอโซเลทBaR917 จึงมีความเหมาะสมที่จะคัดเลือกไปใช้ในการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria เพื่อควบคุมโรคไหม้ข้าวและส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อไป

การกระตุ้นเมล็ดจะต้องมีช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเพื่อให้เมล็ดมีการดูดน้ำเข้าไปให้มากที่สุดเพื่อให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงการดูดน้ำของเมล็ดในระยะที่ 1 และ 2 และหยุดกระบวนการต่างๆ ลงก่อนเมล็ดงอก เมื่อนำไปปลูกจะช่วยให้เมล็ดมีการงอกเร็วขึ้น และมีความสม่ำเสมอ เนื่องจากลดช่วงระยะเวลาการงอกลง (Bray, 1995; McDonald, 2000) โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการกระตุ้นเมล็ดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 12 ชั่วโมงเมล็ดมีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แล้วเริ่มช้าลงในชั่วโมงที่ 24 และคงที่ในชั่วโมงที่ 48ก่อนจะมีการดูดน้ำเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งการดูดน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าเมล็ดเริ่มเข้าสู่ระยะการงอกของเมล็ดแล้ว ดังนั้นที่ 48 ชั่วโมง จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria เนื่องจากเมล็ดมีการดูดน้ำคงที่แล้ว ซึ่งเมล็ดพันธุ์พืชต่างชนิดกัน หรือสารที่นำมาใช้ในการกระตุ้นที่ต่างกันก็จะใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นแตกต่างกันไปด้วย ตัวอย่างเช่นในข้าวสาลีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดจะอยู่ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Shahzad*et. al*.,2000) ดังนั้นควรหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเมล็ดสูงที่สุด จากนั้นเมื่อได้ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดแล้วนั้น จำเป็นต้องหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดความชื้น เช่นเดียวกันโดยจากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาในการลดความชื้นเมล็ดพันธุ์ข้าวในการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria ที่เหมาะสมคือที่ 10 ชั่วโมง โดยค่าความชื้นอยู่ที่ 13.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความชื้นในระดับเดิมก่อนทำการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่อยู่ที่ 13 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria ในการศึกษาครั้งนี้จะกระทำโดยการแช่เมล็ดในสารแขวนลอย endophytic bacteria เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และลดความชื้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

โดยต่อมาเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria มาทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ทางด้านความชื้น และการงอกพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของทุกกรรมวิธีภายหลังการกระตุ้นเมล็ดในเดือนที่ 0 ถึง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเดือนที่ 4กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารเคมี (Osmopriming) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงที่สุด ส่วนกรรมวิธีอื่นๆรวมถึงการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria (Bio-priming) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 4 พบว่ากรรมวิธีเมล็ดที่กระตุ้นด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 95.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เมล็ดที่กระตุ้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Hydro-priming) เท่า 94.25 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มความชื้นของเมล็ดเมื่อเปรียบกับกรรมวิธีอื่นๆ และยังคงมีความงอกสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 4 สอดคล้องกับ Raj *et al.* (2004) ที่ได้รายงานว่าการกระตุ้นเมล็ดข้าวฟ่างด้วยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* นั้นทำให้เมล็ดข้าวฟ่างมีเปอร์เซ็นต์การงอก และความแข็งแรงของต้นกล้าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ทำการกระตุ้นเมล็ด และเมื่อศึกษาต่อไปยังความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria ภายในเมล็ดพันธุ์ข้าวภายหลังจากการกระตุ้นเมล็ด ผลการศึกษาพบว่ามีการลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยตั้งแต่เริ่มทำการทดลองเดือนที่ 0 ถึงเดือนที่ 4 โดยมีการลดลงจาก 4.56 log cfu/ml เป็น 4.25log cfu/ml หรือ แสดงให้เห็นว่า endophytic bacteria สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในเมล็ดพันธุ์ข้าวภายหลังการกระตุ้นเมล็ดซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Begum (2010) ที่ได้ทำการกระตุ้นเมล็ดถั่วเหลืองด้วย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ UPM13B8โดยพบว่า *P. aeruginosa* สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดยังคงมีเปอร์เซ็นต์การงอกดี และยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเน่าของถั่วเหลืองภายหลังเมล็ดงอกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หลังจากได้เมล็ดที่ผ่านการกระตุ้นเมล็ดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ endophytic bacteria (Bio-priming) ไอโซเลท BaR917 ได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในสภาพโรงเรือน ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วย endophytic bacteria ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae*(Bio-priming) และกรรมวิธีที่ใช้การกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ร่วมกับการฉีดพ่นทางใบก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* (Bio-priming+spray) มีความรุนแรงของการเกิดโรคแตกต่างจากกรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นด้วยสารเคมีก่อนทำการปลูก เชื้อรา *P. oryzae* (Osmo priming) เพียงเล็กน้อย โดยมีความรุนแรงอยู่ที่ระดับที่ 4 ส่วนกรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นด้วยสารเคมีก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* (Osmo priming) มีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 3 ในขณะกรรมวิธีที่ไม่กระตุ้นเมล็ดก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae* (No priming) และกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อก่อนปลูกเชื้อ *P. oryzae* (Hydro-priming) มีระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุดถึงระดับที่ 6 เช่นเดียวกับอัตราการเกิดโรคที่การกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ยังคงมีอัตราการเกิดโรคต่ำกว่า กรรมวิธีที่ไม่กระตุ้นเมล็ด และกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria (Bio-priming) นั้นสามารถลดความรุนแรงของโรคไหม้ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่กระตุ้นเมล็ด และกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Callan *et al*., 1991 ที่ได้ใช้การกระตุ้นเมล็ดข้าวโพดด้วยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens*เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Metalaxylและการกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียวพบว่าการกระตุ้นเมล็ดด้วย *P.fluorescens* สามารถลดการเกิดโรคเน่าคอดินได้ดีที่สุดและมีอีกหลายงานวิจัยที่ได้รายงานว่า endophytic bacteria สามารถควบคุมโรคพืชอื่นๆได้อีกหลายชนิดอีกด้วย (Chen *et al*, 1995; Adhik*et al*., 2012 Pagen*iet al*., 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 สรุปผลการวิจัย

1) การแยกเชื้อรา *P. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวพบว่า ไอโซเลทที่มีความรุนแรง และนำมาใช้ในการทดลองได้แก่ ไอโซเลท RBR55001 และการทดลองนี้สามารถแยก endophytic bacteria ได้ใหม่ 31 ไอโซเลท ได้แก่ SnR117, SnS217, SnS317, Sn417, SnR517, SnR617, SnS717, SnR817, SnS917, SnS1017, SuR117, SuS217, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117, Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917, และ BaR1017 พบว่าเป็นแกรมบวก 26 ไอโซเลท และเป็นแกรมลบ 5 ไอโซเลท โดยจะมีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลท

2) การคัดเลือก endophytic bacteria ต่อการเจริญของพืชที่จากการทดลองครั้งนี้ได้ใช้วิธีคำนวณเป็น %SVI เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมสำหรับการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดยจากการทดลองพบว่ามีendophytic bacteria ที่แยกใหม่ทั้งหมดถึง 23 ไอโซเลท ที่มี %svi สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม ซึ่งหนึ่งในไอโซเลทที่มีความน่าสนใจคือไอโซเลท BaR917 ที่มี%sviสูงที่สุดเท่ากับ 128.90 เปอร์เซ็นต์ โดยสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 28.90 เปอร์เซ็นต์จึงได้ทำการศึกษาต่อไปถึงการควบคุมทางชีววิธีโดยนำ endophytic bacteria ทั้งหมด 46 ไอโซเลท มาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *P. oryzae* ในห้องปฏิบัติการพบว่าทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *P. oryzae* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ดีที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ SuS217, BarR917, BaS417, SuR317 และ Su2S217 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 58.74, 61.11, 64.86, 66.66 และ 66.80 % ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทBaR917 มีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อในการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria (Bio-priming)

3) จากการศึกษาการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ไอโซเลทBaR917 พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria อยู่ที่ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และทำการลดความชื้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมงเมื่อนำไปทดสอบในด้านคุณภาพเมล็ดพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อความชื้น และการงอกของเมล็ดข้าว โดยเมล็ดที่ผ่านการกระตุ้นเมล็ดยังสามารถงอกได้สูงถึง 95.50 เปอร์เซ็นต์ในเดือนที่ 4 และจำนวนแบคทีเรียมีการลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นจากภายหลังการกระตุ้นเมล็ดจนสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคไหม้ข้าวในสภาพแปลงทดลองพบว่า การกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ไอโซเลทBaR917ทั้งในกรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นใบและไม่ได้ฉีดพ่นใบ มีความรุนแรงของโรคต่ำรองลงมาจากกรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นเมล็ดด้วยสารเคมี โดยมีระดับความรุนแรงในการเกิดโรคอยู่ในระดับที่ 4 ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ทำการกระตุ้นเมล็ด และกรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับที่ 6 เช่นเดียวกันกับอัตราการเกิดโรคที่กรรมวิธีที่ทำการกระตุ้นเมล็ดด้วยสารเคมีมีอัตราการเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่กรรมวิธีที่กระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ร่วมกับการฉีดพ่นทางใบก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae*และกรรมวิธีกระตุ้นเมล็ดด้วย endophytic bacteria ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดโรคเท่ากับ 15 และ 15.67 ตามลำดับ

5.3 ข้อเสนอแนะ

1) ศึกษาหาวิธีการเก็บรักษา endophytic bacteria ให้ยังคงมีประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและป้องกันกำจัดโรคไหม้ข้าว

2) ศึกษาหาวิธีการลดความชื้นในเมล็ดพันธุ์ข้าวหลังจากการกระตุ้นเมล็ดพันธุ์โดยเป็นวิธีที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 ผลงานที่เผยแพร่ และตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ

Changmuang, T., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. Isolation and Screening of Endophytic Bacteria against Rice Blast Pathogen. International Journal of Agricultural Technology.Vol. 13(7.1):1231-1244

[ฐานข้อมูล TCI กลุ่ม 1]

6.2 การผลิตบัณฑิต

นางสาวทักษพร ช้างม่วง

ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2550. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว 1-74.

กรมการข้าว. 2555. สถานการณ์การผลิตและการตลาดข้าวของโลก ปี 2555/2556 ณ เดือนกรกฎาคม 2555. แหล่งที่มา: http://www.ricethailand.go.th/rice%20web /Rice% 20 Situation/ Rice_Situation.html, 1 กันยายน 2556.

กรมการค้าต่างประเทศ. 2546. มาตรฐานข้าวไทยและมาตรฐานข้าวหอมมะลิ ไทย. กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, กรุงเทพฯ.

กานต์ จิตสุวรรณรักษ์. 2559. ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ของข้าว (*Oryza sativa* L.). วารสารแก่นเกษตร 44(1) ฉบับพิเศษ: 232-237.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นาคณะเกษตรกำแพงแสน 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. พืชเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 460 น.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยข้าว.

ดวงกมลวรรณ กบกันทา ศิวาพร ธรรมดี และณัฐศักดิ์ กฤติกาเมษ. 2556. ผลของการทำ seed priming ต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์แตงกวา. วารสารแก่นเกษตร 41(3): 239-246.

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และอนัตตา คนแรงดี. 2558. การแยกและคัดเลือก phyllosphere bacteria และ endophytic bacteria จากใบและลำต้นข้าวที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช. หน้า 697-706. *ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 เชียงราย.

พรทิพย์ ถาวงศ์ รอยบุญ จำรัสกาญจน์ สุวัฒน์ สายมายา และอดุลย์ อินทรประเสริฐ. 2553. ผลของ seed priming ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าว. *ใน* การประชุมทางวิชาการเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติครั้งที่ 7 โรงแรม ท๊อปแลนด์ พิษณุโลก

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลลี่ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี กุลชนา เกศสุวรรณชน สิริน กลิ่นมณี และสงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว 1(1): 52-64.

นวรัตน์ ใจหอม สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และนงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2557. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 32 (3): 52 - 60)

บุญมี ศิริ. 2546. วิทยาการเมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 224 หน้า.

ปรารถนา หงส์ฤทธิพันธุ์ 2555. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในข้าว. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปรียา แก้วนารี คณิต วิชิตพันธุ์ สุกานดา วิชิตพันธุ์ ปรีย์กมล กลั่นฤทธิ์ และบุญมี ศิริ. 2553. ผลของกระบวนการเร่งอายุและกระบวนการ osmo priming ต่อการงอกของพริกหวาน และการเกิด peroxidation product ในเมล็ดพริกหวาน. หน้า 45-49. *ใน* การประชุมวิชาการเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติ. ครั้งที่ 7. โรงแรมท๊อปแลนด์ พิษณุโลก.

ยอดขวัญ วัดอิ่ม จิรวัฒน์ สนิทชน วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ ปัทมา ศิริธัญญา. 2552. การประเมินความต้านทานโรคไหม้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน. วารสารเกษตร 30(3): 318-320.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุจิตตรา ปะนันโต ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต ศิริลักษณ์ จิตรอักษร รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารแก่นเกษตร 41 (4): 457-468.

สงกรานต์ จิตรากร และบริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2540. วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีกับข้าวไทย. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 1-155.

Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A. and Nelson, L.M., 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. Canadian Journal of Microbiology. 47(10): pp.916-924.

Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2005. Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and none-saline conditions.Advances in agronomy. 88:223-271.

Bajehbaj AA. 2010. The effects of NaCl priming on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. African. Journal Biotech.9 1764-1770.

Bewley, J.D. and Black, M. 1982. Physiology and Biochemistry of Seed in Relation to Germination Vol ll. Viability, Dormancy and Environmental Control. Springer VerBerin. 1-33.

Begum, M.M., Sariah, M., Puteh, A.B., Abidin, M.Z., Rahman, M.A., and Siddiqui, Y. 2010. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. Biological Control 53(1): 18-23.

Bray, C.M. 1995. Biochemical process during the osmopriming of seeds in seeds development and germination. USA. 767-789.

Callen, N.W., Mathre, D.E., and Miller, J.B. 1991. Field performance of sweet corn seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescens* AB254. HortScience 26: 1163–1165.

Callen, N.W. and Mathre, D.E. 2000. Biopriming Seed Treatment. Encyclopedia of Plant Pathology.

Chandra, N.S., Niranjana, S.R., Uday Shankar, A.C., Niranjan Raj, S., Reddy, M.S., Prakash, H.S. and Mortensen, C.N., 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 43(3): 264-282.

Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R. and Kloepper, J.W., 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biological Control 5(1): 83-91.

De Matos Nogueira, E., F. Vinagre, H.P. Masuda, C. Vargas, V.L.M. de Pádua, F.R. da Silva, R.V. dos Santos, J.I. Baldani, P.C.G. Ferreira, and A.S. Hemerley. 2001. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

diazotrophicus and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Genetics and Molecular Biology 24: 199-206.

Dezfuli, P.M. Sharif-zadeh, F. and Janmohammadi, M. 2008. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). Journal of Agriculture and Biological Sciences 3:22-25.

Farooq, M., Basra S.M.A., Khalid, M., Tabassum R., &Mehmood T. 2006. Nutrient homeostasis, metabolism of reserves and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice Canadian Journal of Botany 84 :1196–1202

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffe W.F. and Kloepper J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895-914.

Ji, S. H., Gururani, M. A., and Chun, S. C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological Research 169(1), 83-98.

Jie L., Gong She L., Dong Mei O., Fang Fang L and En Hua W. 2002. Effect of PEG on germination and active oxygen metabolism in wildrye (Leymu.7 chinensis) seeds. ActaPrataculturae Sinica11: 59-64.

Khan H.A., Ayub C.M., Pervez M.A., Bilal R.M., Shahid M.A. and Ziaf K. 2009. Effect of seed priming with NaCl on salinity tolerance of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) at seedling stage. Soil and Environ. 28: 81-87

McDonald, M.B. 2000. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology 27: 177- 237.

Muller H. and Berg G. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. International Organization for Biological Control 53:905–916

Nejad P. and Johnson P., A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control 18:208–215

Nasri, N., R. Kaddour, H. Mahmoudi, O. Baatour, N. Bouraoui, and M. Lachaal. 2011. The effect of osmo priming on germination, seedling growth and phosphatase activities of lettuce under saline condition. African Journal of Biotechnology 10:14366-14372.

Nawaz, J., Hussain, M., Jabbar, A., Nadeem, G.A., Sajid, M., Subtain, M.U. and Shabbir, I. 2013. Seed priming a technique. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 6(20):1373.

Nayaka, C.S., Niranjana, S. R., Shankar, U. A. C., Raj, N. S., Reddy, M. S., Prakash, H. S., and Mortensen, C. N. 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(3): 264-282.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pageni, B. B., Lupwayi, N. Z., Larney, F. J., Kawchuk, L. M., and Gan, Y. 2013. Populations, diversity and identities of bacterial endophytes in potato (*Solanum tuberosum* L.) cropping systems. Canadian Jurnal of Plant Science, 93(6), 1125-1142.

Parera, C.A. and D.J. Cantliffe. 1994. Presowing seed priming. Horticultural. Rev. 16: 109-141.

Pill WG. and Necker AD. 2001. The effects of seed treatments on germination and establishment of Kentucky bluegrass (*Poapratense* L.). Seed Science and Technology. 29: 65-72.

Raj, S.N., Shetty, N.P. and Shetty, H.S., 2004. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. International Journal of Pest Management, 50(1), pp.41-48.

Raweekul W., Wuttitummaporn S., Sodchuen W. and Kittiwongwattana C. 2016. Plant growth promotion by endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa*). Thammasat International Journal of Science and Technology 21: 7-17.

Roumen, E., Levy M. and Notteghem J. L. 1977. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis. European Journal Plant Pathology 103: 363-371.

Shahzad, M., Brasra A., Imtiaz A.P., and Irafan A. 2000. Evaluation of seedling vigor of hydro and matrix-primed wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. International Journal of Agriculture and Biology: 1560-8530

Varier, A., Vari, A.K. and Dadlani, M. 2010. The subcellular basic of seed priming. Current Science 99: 450-456

Wright, B., Rowse, H.R. and Whipps, J.M. 2003. Microbial populations on seeds during drum and steeping priming. Plant and Soil 255: 631–640.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินในโครงการ

(หน้าถัดไป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสโครงการ/รหัสสัญญา 2561-01-04-021

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการเงินครั้งสุดท้ายรอบ 12 เดือน ประจำปีงบประมาณ 2561

☐ แหล่งงบประมาณแผนดิน (แบบปกติ) ✓แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้เพื่อทำ seed bio-priming ในข้าว

(ภาษาอังกฤษ) Screening of endophytic bacteria against *Pyricularia oryzae* caused rice blast disease for seed bio-priming of rice

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือนตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 59,500 บาท 85 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) 20 กันยายน 2560

งวดที่ 2 10,500 บาท 15 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) 28 กุมภาพันธ์ 2561

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร:ค่าจ้างชั่วคราว	60,000.00	60,000.00	0.00
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย			
ค่าวัสดุ	10,00.00	10,040.00	(40.00)
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	70,000.00	70,040.00	(40.00)

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

(.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารผลผลิตงานวิจัย

(หน้าถัดไป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Agricultural Technology 2017 Vol. 13(7.1):1231-1244
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

Isolation and Screening of Endophytic Bacteria against Rice Blast Pathogen

Taksaphorn Changmuang, Potjana Sikhao and Prommart Koohakan*

Faculty of Agricultural Technology, King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand .

Taksaphorn Changmuang, Potjana Sikhao and Prommart Koohakan (2017). Isolation and Screening of Endophytic Bacteria against Rice Blast Pathogen. International Journal of Agricultural Technology 13(7.1): 1231-1244.

This study aimed for isolation endophytic bacteria from leaves, stems and roots of healthy rice and screening their potential to promote plant growth and inhibit *Pyricularia oryzae* caused rice blast disease. Forty-six isolates were obtained from this experiment. Initially, the effect on rice seedling were tested. It was found that 41 isolates showed their ability to promote plant growth that was referred to benefit isolates. Isolate Bar917 had the highest seedling vigor index that was 128.42 %, following by isolate sus617 at 128.03%. Then the benefit isolates were also tested their efficiency to inhibit *P. oryzae* by dual culture technique. It was found that all benefit isolates could inhibit *P. oryzae*. The group of isolates that was 60% inhibition higher than control including sus217, sur317, Bas417 and Bar917, which was 66.80, 66.66, 64.86 and 61.11% respectively. Characterization of benefit isolates by gram staining and 3% KOH test, found that most of them were gram-positive bacteria. From this experiment, we selected some benefit isolate for further study on seed bio-priming to improve its efficiency for rice production in the future.

Keywords: endophytic bacteria, rice blast, *Pyricularia oryzae*

Introduction

Rice is one of the most important economic crops particularly in Asia where almost half of the population relies on it as the main food (Hegde and Hedge, 2013), but rice production encountered a major problem in the field of plant disease that is rice blast disease. Rice blast disease is caused by the Ascomycetous fungus *Pyricularia oryzae* (Couch and Kohn, 2002) Rice blast symptoms can occur on all aboveground parts of the plant and is observed at earlier growing stages until the final grain production, percentage of seeds decreased causing economic damage. (Yorionori and Thurston 1974) This disease has been controlled with fungicides, though this method is the most effective control but the use of chemical frequently may affect on environment

***Coressponding Author**: Prommart Koohakan; **E-mail address**: prommart.ko@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and chemical residues that harmful to both farmers and consumers. Leading to some researcher have focused their efforts on developing alternative inputs to synthetic chemicals for controlling diseases, and biological control is an interesting alternative

Currently, biological control methods used for disease control has been more interesting. For example using of antagonistic microorganisms such as *Trichoderma hazianum* or *Bacillus subtilis*. There is also the attractions for endophytic bacteria, which are bacteria live inside the plant tissue but it does not cause plant disease. (Hallman *et al*., 1997) de Matos Nogueira *et al*., (2001) reported that endophytic bacteria could have the capacity to control plant pathogen and plant growth promotion. The purpose of this study was isolation and screening of endophytic bacteria against rice blast pathogen and growth promotion to rice and selected some benefit isolate for further study on seed bio-priming to improve its efficiency for rice production in the future.

Objectives: Isolation and screening of endophytic bacteria against rice blast pathogen and growth promotion for further study on seed bio-priming.

Materials and methods

Isolation of Pyricularia oryzae and pathogenicity tests

Cultures of *P. oryzae* used in this study were isolated from infected rice by single spore isolation and recieved from Plant Pathology Laboratory, faculty of Agricultural KMITL. The isolates were transferred to petri dishes containing rice flour agar (RFA) and incubated at 37 ˚C for 14 days. After 14 days, sporulations were induced by adding 2 ml of sterile distilled water into the petri dishes of *P. oryzae* then using L-Shape glass rod to scrap on the surface of culture media, and prepared to spore suspension at concentration of 10^5 spore / ml. Then 80 ml of the suspension was mixed with 20 ml of 2 % gelatin solution and sprayed on seedling rice. Disease severity was evaluated by scoring based on 0-9 ordinal scale (IRRI 1996) where: 0= No of lesions, 1= Small brown speaks of pin point size or large brown speak, 2= Small round dish to slightly elongated necrotic grey spots about 1-2 (mm) in diameter with distinct brown margin lesions are mostly found on lower leaves, 3= Lesion type is same in scale 2 but significant number of lesion are one on upper leaves, 4= Typical susceptible blast lesion, 3 mm or longer infecting lesions than 2% of leaf area, 5= Typical blast lesion infecting 2-10 % of the leaf area, 6= Typical blast lesion infecting 11-25 % of the leaf area, 7= Typical blast lesion infecting 26-50% of the leaf area, 8= Typical blast lesion infecting 51-75% of the leaf area many leaves are dead, and 9= More than 75% leaf are affected. The most violent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

isolate was chose for next experiments. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 replications.

Screening and selection the potential isolate

Promotion activities on rice seedling

The former isolate of endophytic bacteria that was reported on the ability to control rice disease (Koohakan and Konrangdee, 2015) and new one isolated from healthy rice were tested. All isolates were subcultured on nutrient agar (NA) and incubated for 48 hours. Then they were transferred to nutrient broth (NB) and incubated on ratary shaker for 48 hours. The culture was centrifuged at 5000 rpm for 10 minute, cell culture pellet was diluted with normal saline and adjusted the concentration by compared the turbidity with McFarland standard No. 0.5. Then the suspension was inoculated to rice seedling followed by Koohakarn and Konrangdee (2015). After 7 days of inoculation with endophytic bacteria, the growth parameter of seedlings such as seed germination, seedling height, stem weight, root weight, number of leaves and total weight were collected. Data were calculated for growth index of seedling vigor index (svi) as following formular

$$\text{svi} = \text{Average germination percentage} \times \text{Average weight per plants}$$

$$\%\ \text{svi} = \frac{\text{svi of teatment}}{\text{svi of control}} \times 100$$

Which isolate has % SVI ≥ 100% indicated the ability to promote plant growth and referred to benficial isolates for further tested.

Inhibitory activity against rice blast pathogen

The beneficial isolates of endophytic bacteria were grown on NA medium and incubated at room temperature for 24 hours. The pathogen, *P. oryzae*, was cultured on RFA for 14 days. Inhibition effect was evaluated by using dual culture test on petri dish containing PDA media. The pathogen agar plug was placed on the center of culture medium for 4 days before endophytic bacteria was streaked. Then the tested isolates were streaked 2 cm. length form the edge pararell on the left and right sides of the pathogen and incubated at room temperature. Evaluation of the mycelial growth inhibition was done when the pathogen in control grown full in the petri dish. The mycelial growth inhibition rate (IR) was calculated using the formula as follow: [(C2-C1)/ C2 x 100 where C2: diameter of the pathogen colony on control plate and C1: diameter of the pathogen colony on the inhibition plate. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 replications.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Data analysis

The results data were subjected to analysis of variance and treatment means were separated by Duncan's multiple range test to assesssignificant ($P \leq 0.05$) differences among means (Duncan, 1955)

Results

Isolation of Pyricularia oryzae and pathogenicity tests

BTN6001 isolated from infected rice was morphological study to confirm as *P. oryzae* and pathogenicity test compared with 3 former isolates RBR55001, UBN195271 and BKK55003 obtained from Plant Pathology Laboratory, KMITL. The results found that RBR55001 had the highest disease severity at level 8, followed by isolate BKK55003 at level 6 isolates, UBN195271 and BTN6001 at levels 5 and 4, respectively. (Figure 1) Therefor, RBR55001was chose for further test.

Figure 1. Rice leaves inoculated with isolated of *P. oryzae* (A=control; B=BKK55003; C=UBN195271; D=RBR55001E= BTN6001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and selection the potential isolate

Promotion activities on rice seedling

Endophytic bacteria tested in this experiment consist of the 15 previous isolates reported by Koohakan and Konrangdee (2015) for their ability to promote rice growth and inhibit rice blast pathopgen (BEdStUTI001, BEdStUTI002, BEdStUTI003, BEdStUTI004, BEdStUTI006, BEdStRBR001, BEdStRBR002, BEdStRBR003, BEdStRBR005, BEdStSPB001, BEdStSPB002, BEdStSPB003, BEdStSPB004, BEdStSPB005, BEdSTPB001) and 31 recent islolates that were isolated from healthy rice (SnR117, SnS217, SnS317, Sn417, SnR517, SnR617, SnS717, SnR817, SnS917, SnS1017, SuR117, SuS217, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117, Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917, BaR1017). Their characteristics were observed under microscope, gram staining and 3%KOH were also tested. The results showed that there were 39 isolates of Gram-positive and 7 isolates of Gram-negative and showed different colony characteristics according to Table 1 and Figure 2

Table 1. Characterization of endophytic bacteria

Isolates	Colony on NA				3%KOH test	Gram staining	Shape style
	Colors	Shape	Margin	Surface			
1.BEdStUTI001	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
2.BEdStUTI002	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
3.BEdStUTI003	yellow	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
4.BEdStUTI004	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
5.BEdStUTI006	cloudy white	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
6.BEdStRBR001	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
7.BEdStRBR002	cloudy white	circular	entire	rough	+	+	bacillus
8.BEdStRBR003	egg	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
9.BEdStRBR005	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
10.BEdStSPB001	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
11.BEdStSPB002	cloudy white	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
12.BEdStSPB003	yellow	circular	entire	rough	+	+	bacillus
13. BEdStSPB004	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
14.BEdStSPB005	light yellow	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
15.BEdSTPB001_r	egg	circular	entire	rough	+	+	bacillus
16.SnR117	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolates	Colony on NA				3%KOH test	Gram staining	Shape style
	Colors	Shape	Margin	Surface			
17.SnS217	cloudy white	irregular	undulate	smooth	+	+	bacillus
18.SnS317	cloudy white	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
19.SnS417	egg	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
20.SnR517	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
21.SnR617	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
22.SnS717	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
23.SnR817	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
24.SnS917	egg	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
25.SnS1017	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
26.SuR117	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
27.SuS217	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
28.SuR317	cloudy white	circular	undulate	smooth	+	+	bacillus
29.SuS417	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
30.SuR517	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
31.SuR617	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
32.SuR717	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
33.Su2R117	egg	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
34.Su2S217	cloudy white	circular	undulate	rough	+	+	bacillus
35.Su2R317	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
36.Su2L417	white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
37.Su2R517	cloudy white	circular	undulate	rough	+	+	bacillus
38.Su2R617	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
39.BaR217	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
40.BaR317	cloudy white	circular	entire	rough	+	+	coccobacilli
41.BaS417	cloudy white	circular	undulate	rough	+	+	bacillus
42.BaL517	egg	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
43.BaR617	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
44.BaL717	cloudy white	circular	undulate	rough	+	+	coccobacilli
45.BaR917	cloudy white	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
46.BaR1017	brown	circular	undulate	mucoid	+	+	bacillus

The 46 isolatees of endophytic bacteria were tested their effects on the growth of rice seedling. It was found that the number of leaves and survival of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

seedlings in all isolates were not significant difference compared with control, but stem height, shoot weight, root weight and total weight of seedling were significant difference. Acording to %SVI, we found that there were 43 isolates with %SVI higher than control, which referred to beneficial isolates to promote rice growth. Among the beneficial isolates, Bar917 had the highest %SVI that was 128.90 % compared with control (Table2).

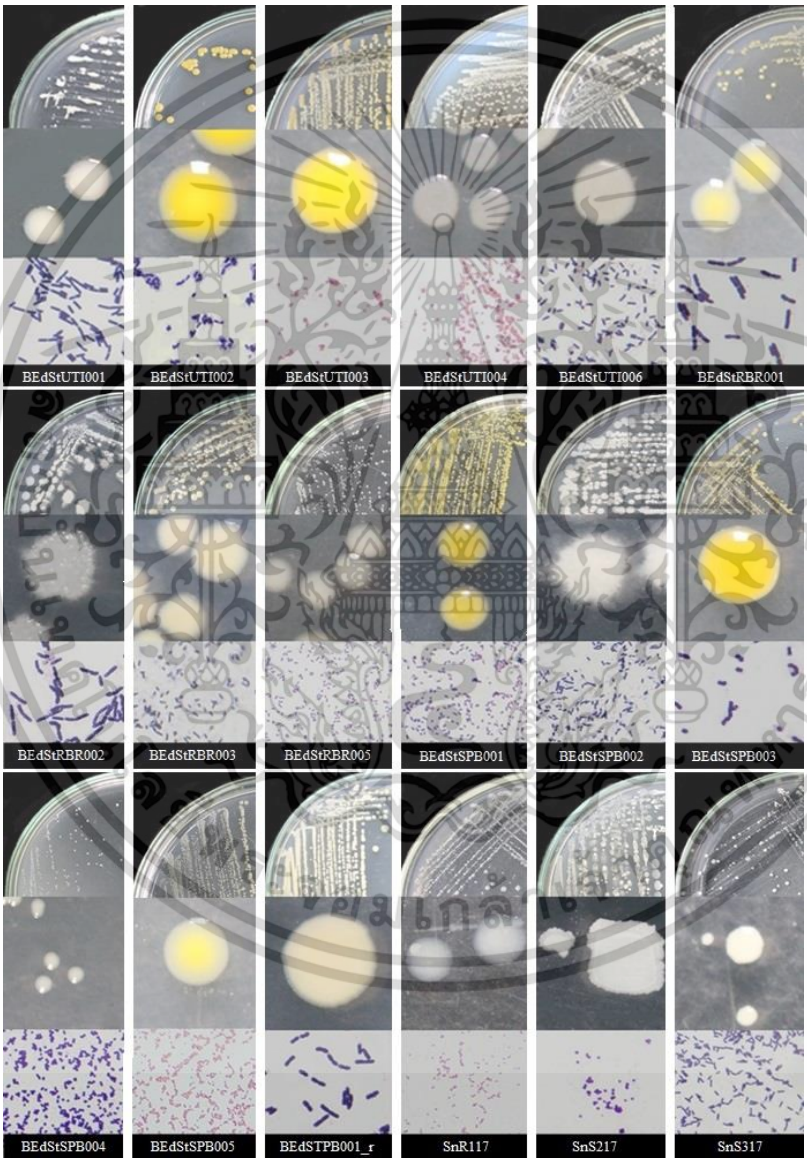


Figure 2. Morphology of endophytic bacteria from healthy rice plant **(**Above = colony on NA, Middle = colony at 6.7X and Under = gram staining)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

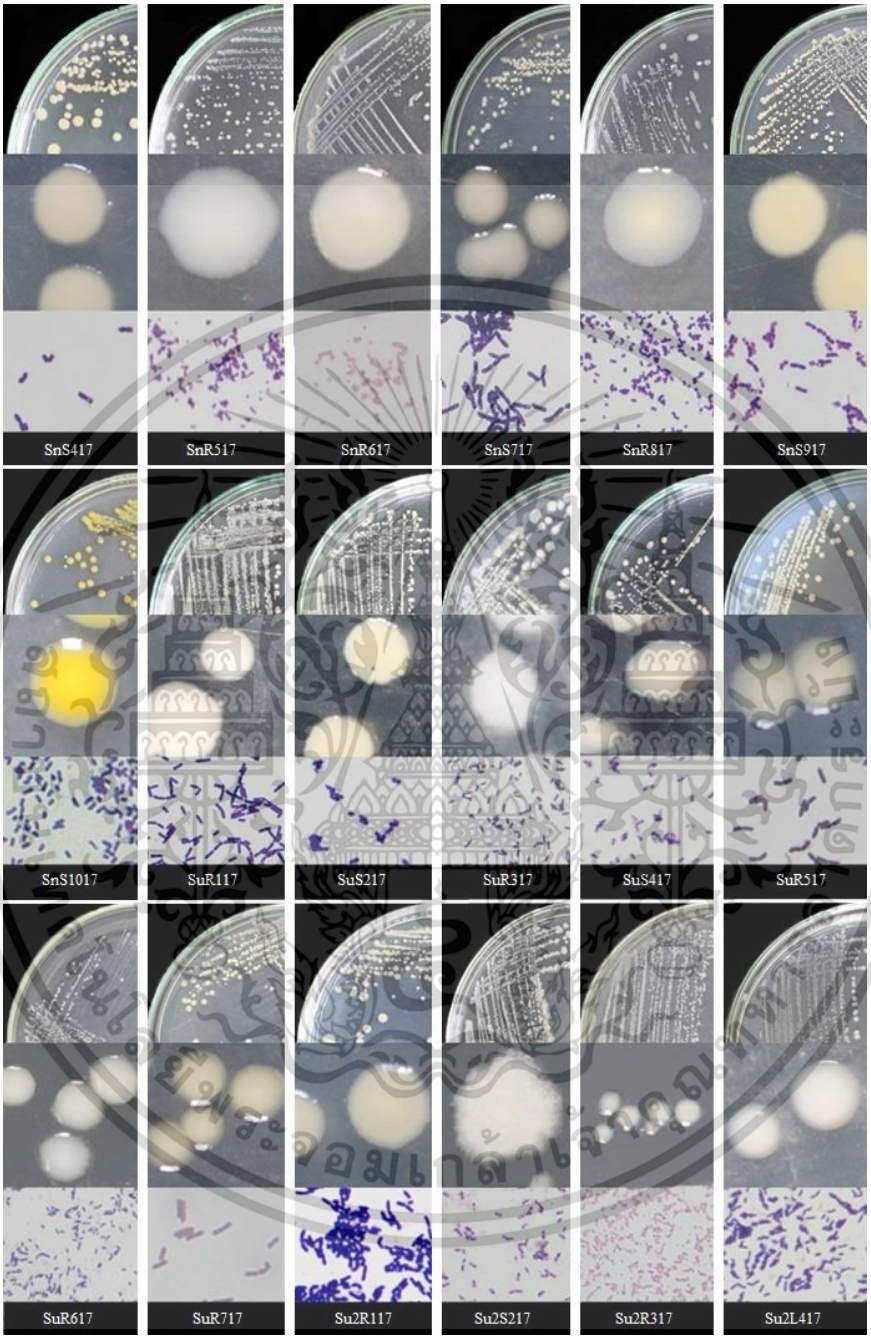


Figure 2(continue). Morphology of endophytic bacteria from healthy rice plant **(**Above = colony on NA, Middle = colony at 6.7X and Under = gram staining)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

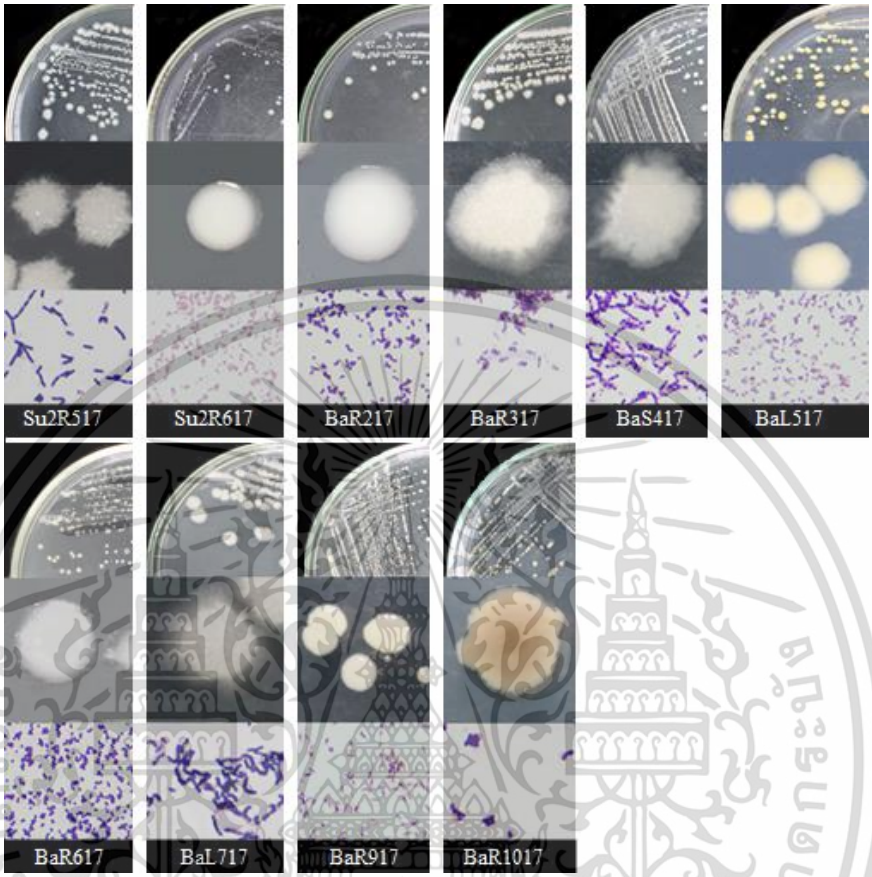


Figure 2 (continue). Morphology of endophytic bacteria from healthy rice plant **(**Above = colony on NA, Middle = colony at 6.7X and Under = gram staining)

Table 2. Effects of endophytic bacterie on the growth of rice seedlings.

Isolates	number of leave	Height	Survival of seedling	Shoot weight	Root weight	Total weight	%svi
1.control	2.2ab[1/]	13.05c	92.50ab	0.21abc	0.36cd	0.57bcd	100
2.BEdStUTI001	2.1ab	14.37abc	100a	0.19abc	0.36cd	0.56cd	107.74
3.BEdStUTI002	2.2a	13.25abc	97.50ab	0.20abc	0.38abcd	0.59abcd	111.61
4.BEdStUTI003	2b	13.00c	100a	0.18bc	0.36cd	0.54d	104.37
5.BEdStUTI004	2.15ab	13.12bc	97.50ab	0.17c	0.36cd	0.54d	101.76
6.BEdStUTI006	2.2a	13.07c	95.00ab	0.19abc	0.35cd	0.55cd	100.98
7.BEdStRBR001	2b	13.82abc	100a	0.19abc	0.38bcd	0.58abcd	111.59
8.BEdStRBR002	2b	13.90abc	100a	0.18bc	0.38abcd	0.57abcd	110.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolates	number of leave	Height	Survival of seedling	Shoot weight	Root weight	Total weight	%svi
9.BEdStRBR003	2.15ab	13.10c	100a	0.18bc	0.36cd	0.55cd	105.82
10.BEdStRBR005	2b	14.68abc	92.50ab	0.23ab	0.37cd	0.60abcd	116.40
11.BEdStSPB001	2b	14.52abc	97.50ab	0.19abc	0.35d	0.54cd	105.33
12.BEdStSPB002	2.05ab	15.37a	97.50ab	0.19abc	0.35cd	0.54cd	105.33
13.BEdStSPB003	2.05ab	14.11abc	100a	0.23ab	0.40abcd	0.63abcd	121.21
14. BEdStSPB004	2.05ab	14.45abc	100a	0.21abc	0.38bcd	0.59abcd	114.47
15.BEdStSPB005	2.05ab	14.60abc	100a	0.18bc	0.39abcd	0.57abcd	111.11
16.BEdSTPB001_r	2.15ab	13.76abc	97.50ab	0.19abc	0.38bcd	0.57abc	107.86
17.SnR117	2.1ab	13.01c	92.50ab	0.18bc	0.35cd	0.54d	96.54
18.SnS217	2b	15.22abc	100a	0.19abc	0.35d	0.55cd	106.30
19.SnS317	2.05ab	13.15bc	100a	0.18bc	0.36cd	0.54d	104.37
20.SnS417	2b	14.09abc	95.00ab	0.18bc	0.38abcd	0.57bcd	104.18
21.SnR517	2.05ab	14.85abc	97.50ab	0.17c	0.35cd	0.54d	104.37
22.SnR617	2.05ab	14.80abc	100a	0.20abc	0.41abcd	0.62abcd	119.76
23.SnS717	2.05ab	13.15bc	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.93
24.SnR817	2b	14.43abc	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.45
25.SnS917	2.05ab	13.42abc	97.50ab	0.22abc	0.39abcd	0.61abcd	114.89
26.SnS1017	2b	13.02c	95.00ab	0.19abc	0.35d	0.53d	98.24
27.SuR117	2b	13.00c	97.50ab	0.18bc	0.35cd	0.54cd	102.23
28.SuS217	2.1ab	15.12abc	97.50ab	0.19abc	0.35d	0.55cd	97.07
29.SuR317	2.1ab	15.32ab	100a	0.21abc	0.42abcd	0.63abcd	121.21
30.SuS417	2.15ab	13.38abc	95.00ab	0.22abc	0.42abcd	0.64abc	117.89
31.SuR517	2.15ab	13.15bc	95.00ab	0.19abc	0.37cd	0.56cd	103.72
32.SuR617	2.05ab	14.18abc	97.50ab	0.22abc	0.45a	0.66ab	128.03
33.SuR717	2.15ab	13.00c	100a	0.18bc	0.35d	0.53d	102.93
34.Su2R117	2.15ab	13.03c	97.50ab	0.20abc	0.36cd	0.56cd	105.51
35.Su2S217	2.1ab	13.90abc	92.50ab	0.23ab	0.38abcd	0.61abcd	109.89
36.Su2R317	2.1ab	14.33abc	90.00b	0.21abc	0.38abcd	0.60abcd	103.89
37.Su2L417	2b	13.78abc	100a	0.24a	0.37cd	0.61abcd	117.84
38.Su2R517	2b	13.62abc	100a	0.20abc	0.36cd	0.57bcd	109.66
39.Su2R617	2.05ab	14.07abc	100a	0.20abc	0.37cd	0.57bcd	109.66
40.BaR217	2.05ab	14.75abc	97.50ab	0.21abc	0.45ab	0.66ab	128.42
41.BaR317	2.1ab	13.24abc	100a	0.19abc	0.35cd	0.55cd	105.82
42.BaS417	2.15ab	13.64abc	97.50ab	0.19abc	0.35cd	0.55cd	103.17
43.BaL517	2b	13.82abc	100a	0.19abc	0.40abcd	0.60abcd	115.92
44.BaR617	2b	14.47abc	95.00ab	0.21abc	0.36cd	0.58abcd	106.01
45.BaL717	2.1ab	14.70abc	100a	0.20abc	0.40abcd	0.62abcd	119.28
46.BaR917	2.1ab	13.73abc	100a	0.24a	0.43abc	0.67a	128.90
47.BaR1017	2.1ab	13.24abc	97.50ab	0.19abc	0.43abc	0.62abcd	116.30

[1/]Means in the same column with different letters are singnificant different at P =0.05 , according to Duncan's Multiple range test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inhibitory activity against rice blast pathogen

All isolates of endophytic bacteria in this experiment was also tested for their efficiency to inhibit *P.oryzae* by dual culture technique. There were 5 isolates could inhibit more than 50%, those were SuS217, BarR917, BaS417, SuR317 and Su2S217, which referred to antagonistic isolates. Their percentage of inhibition was 58.74, 61.11, 64.86, 66.66 and 66.80, respectively. The rest of isolates had percentage of inhibition between 9.72-49.02%. (Figure 3 and Table 3)

Table 3. Effects of endophytic bacterie on growth of rice seedlings.

Isolates	Inhibitory against *P.oryzae*	
	Diameter of colony (cm.)	Growth inhibition (%)
1.BEdStUTI001	7.53	16.25
2.BEdStUTI002	7.52	16.38
3.BEdStUTI003	6.88	23.47
4.BEdStUTI004	7.15	20.55
5.BEdStUTI006	7.25	19.44
6.BEdStRBR001	5.71	36.52
7.BEdStRBR002	7.75	13.88
8.BEdStRBR003	5.71	36.52
9.BEdStRBR005	7.41	17.63
10.BEdStSPB001	8.12	9.72
11.BEdStSPB002	5.40	40.00
12.BEdStSPB003	5.18	42.36
13. BEdStSPB004	6.5	27.77
14.BEdStSPB005	4.58	49.02
15.BEdSTPB001_r	6.85	23.88
16.SnR117	5.50	38.88
17.SnS217	5.50	38.88
18.SnS317	6.18	31.25
19.SnS417	7.15	20.48
20.SnR517	5.87	34.72
21.SnR617	6.42	28.61
22.SnS717	5.35	40.55
23.SnR817	6.28	30.13
24.SnS917	6.21	30.97
25.SnS1017	7.00	22.22
26.SuR117	5.77	35.83
27.SuS217	3.73	58.47
28.SuR317	3.00	66.66
29.SuS417	5.71	36.52
30.SuR517	6.08	32.36
31.SuR617	7.78	13.47
32.SuR717	5.91	34.30
33.Su2R117	7.61	15.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolates	Inhibitory against *P.oryzae*	
	Diameter of colony (cm.)	Growth inhibition (%)
34.Su2S217	2.98	66.80
35.Su2R317	6.55	27.22
36.Su2L417	5.77	35.83
37.Su2R517	5.90	34.44
38.Su2R617	6.96	22.63
39.BaR217	6.30	30.00
40.BaR317	6.61	26.52
41.BaS417	3.16	64.86
42.BaL517	6.82	24.16
43.BaR617	8.03	10.69
44.BaL717	5.23	41.80
45.BaR917	3.50	61.11
46.BaR1017	6.60	26.66

[1/]Diameter of colony*P.oryzae* at 14 day

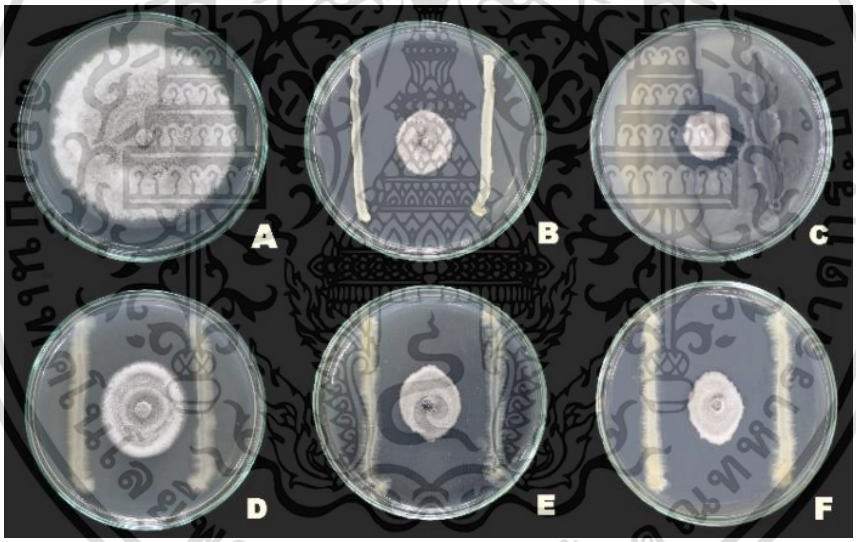


Figure 3 Dual-culture of five isolates inhibit more than 50 percentage (A=control, B = BarR917, C=BaS417, D= SuR317, E= SuS217 and F= Su2S217

Therefore, the screening of endophytic bacteria that promote plant geowth and inhibit rice blast pathogen was considered among beneficial isolates and antagonistic isolates.The most interesting isolates were BaR917 because of the highest %SVI and the highest percentage of inhibition of rice blast disease. Therefor, BaR917 has been selected as a potential isolate for further study on seed bio-priming.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Discussion

Isolation and screening of endophytic bacteria to select beneficial bacteria for growth promotion and control plant pathogens is an interesting topic, because there are a lot of research in several areas. (Hardoim *et. al*., 2008; Yang *et. al*., 2008; Muthukumar and Venkatesh, 2013; Koohakan and Konrangdee, 2015). In this study, we obtained 31 recent isolate from healthy rice, those were SnR117, SnS177, SnS177, Sn417, SnR1717, SnR177, SnS717, SnR817, SnS917, SnS1017, SuR117, SuS217, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117. Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917, and BaR1017. Base on ordinary study, most isolates were gram-positive (27 isolates) and the other was gram-negative (4 isolates) and showed different in morphological characteristics.

Selection of endophytic bacteria for plant growth promotion is important, because associated bacteria could be interact to plant either positive or negative. Therefore, we have to select only the positive isolate that benefit to plant in the category of growth promotion to plant and suppression to the pathogen. This experiment used %SVI to screen the growth promotion isolates and found that it had 23 recent isolates that was highest % SVI, which higher than control between 2.23-28.90% they were includings; SnS217, SnS317, Sn417, SnR517, SnR617, SnS717, SnR817, SnS917, SuR117, SuR317, SuS417, SuR517, SuS617, SuR717, Su2R117, Su2S217, Su2R317, Su2L417, SuS2R517, Su2R617, BaR217, BaR517, BaL517, BaS417, BaR617, BaL717, BaR917 and BaR1017. According to Ji *et al.* (2014) reported 576 isolates of endophytic bacteria from 10 rice cultivars were isolated.The athor found that it has 12 isolates that can promote the growth of rice and inhibited *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*, a major rice pathogen. It can be seen that endophytic bacteria are not only useful in promoting plant growth. Some isolates may also have the ability to control plant pathogens.

Therefore, this study was conducted to study the bio-activity of 46 endophytic bacteria examined for growth promotion on rice that mentioned above and antagonist against *P. oryzae*. This results found that all isolates could be inhibit the growth of pathogen. The best 5 isolates were SuS217, BarR917, BaS417, SuR317 and Su2S217, which the percentage of inhibition was 58.74, 61.11, 64.86, 66.66 and 66.80%, respectively. Several studies have reported that the use of endophytic bacteria can inhibit pathogens. (Nejad and Johnson, 2002; Pageni *et al.*, 2014; Koohakan and Konrangdee, 2015) In conclusion, the results of this study show that endophytic bacteria are interesting for use in biological control and promote plant growth and could be possible for study on seed bio-priming to develop rice production in the future.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acknowledgement

This research was supported by Geduate Research Fund from Faculty of Agricultural Technology, King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

References

Couch, B. C., and Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia, 94(4), 683-693.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. Biometrics. 11(1): 1-42.

De Matos Nogueira, E., F. Vinagre, H.P. Masuda, C. Vargas, V.L.M. de Pádua, F.R. da Silva, R.V. dos Santos, J.I. Baldani, P.C.G. Ferreira, and A.S. Hemerley. (2001). Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Genetics and Molecular Biology. 24: 199-206.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffe W.F. and Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43: 895-914.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in microbiology, 16(10): 463-471.

Hegde, S., and Hegde, V. (2013). Assessment of global rice production and export opportunity for economic development in Ethiopia. International Journal of Science and Research (IJSR). 2:257-260.

IRRI. (1996) Standard Evaluation System for Rice. Ed. 4. International Rice Research Institute. Manila, Philippines

Ji, S. H., Gururani, M. A., & Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological research. 169(1): 83-98.

Koohakan, P. and Konrangdee, A. (2015). Isolation and screening of phyllosphere bacteria and endophytic bacteria from leaf and stem of rice for controlling certain plant pathogen. The 10th National Plant Protection Conference. 697-706.

Muthukumar, A., Annamalainagar, C., and Venkatesh, A. (2015). Exploitation of Fungal and Endophytic Bacteria for the Management of Leaf Blight of Ribbon Plant. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 4:209.

Pageni, B. B., Lupwayi, N. Z., Akter, Z., Larney, F. J., Kawchuk, L. M., and Gan, Y. (2014). Plant growth-promoting and phytopathogen-antagonistic properties of bacterial endophytes from potato (Solanum tuberosum L.) cropping systems. Canadian Journal of Plant Science. 94(5): 835-844.

Nejad, P., and Johnson, P. A. (2000). Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological control. 18(3): 208-215.

Yang J-H, Liu H-X, Zhu G-M, Pan Y-L, Xu L-P & Guo J-H (2008). Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. Journal Appl Microbiol 104: 91.

Yorionori, J.T. and Thurston, H.D. (1974). Fitopathologia 9:24-27.

(Received: 24 October 2017; accepted: 25 November 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้