SUT3-304-55-12-40

รายงานการวิจัย

การปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงภายใต้สถานการณ์น้ำท่วม

(Improvement of rhizobial inoculant for enhance growth and control root rot disease in peanut under flooding situation)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานการวิจัย

การปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงภายใต้สถานการณ์น้ำท่วม

(Improvement of rhizobial inoculant for enhance growth and control root rot disease in peanut under flooding situation)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

นางสาวอาภากร หล่องทองหลาง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง เครื่องมือวิเคราะห์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปุ๋ยชีวภาพ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เชื้อราเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การผลิตถั่วลิสงเกิดการสูญเสียผลผลิต เชื้อราที่สำคัญ คือ *Aspergillus niger* เป็นเชื้อราที่อยู่กับเมล็ด และก่อให้เกิดโรครากเน่า ทั้งนี้ความรุนแรงของโรคมีมากขึ้นภายหลังภาวะน้ำท่วมขัง หรือมีฝนตกชุก ทำให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรมากขึ้น ทำให้เกษตรกรใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรามากขึ้น เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมี พบว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมากจากเชื้อรา *A. niger* ได้ ในขณะที่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ได้มีการทดสอบว่าเป็นเชื้อที่สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วมได้ ดังนั้นเชื้อทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการลดการใช้สารเคมี โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงภายใต้สถานการณ์น้ำท่วม จากผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการเจริญร่วมกันได้โดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน และมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับรากถั่วลิสงได้ดีแม้ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขัง โดยปริมาณของเชื้อไรโซเบียมที่ระดับมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายสภาวะน้ำท่วมขังได้ และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง พบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีเทียบเท่ากับการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับสารเคมี carbendazim ที่เป็นสารกำจัดเชื้อรา โดยสามารถควบคุมเชื้อราในช่วง 10^2-10^4 สปอร์ต่อเมล็ด การพัฒนาในรูปแบบหัวเชื้อผสมพบว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้โดยใช้อาหารพื้นฐาน YEM ที่มีการเติม buffer และสาร PVP ซึ่งสามารถทำให้เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณอยู่รอดได้มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ณ ที่อายุการเก็บรักษา 4 – 5 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเชื้อรา *A. niger* และมีการเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้กับเกษตรกรที่มีการปลูกถั่วลิสงแบบอินทรีย์ ซึ่งจะเป็นการลดการใช้สารกำจัดเชื้อรา ซึ่งมีความปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Molds, especially *Aspergillus niger* is an important reason that drastically reduce the yield of peanut production, since this fungus is seed borne pathogen and create root rot disease. The disease usually occurs under waterlog condition or in the raining area. Nowadays, farmers use high amount of fungicide to control this disease problem. To reduce the using of fungicide, it has been reported that *Bacillus megaterium* A20 could inhibit the growth of *A. niger*, while *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 could nodulate and promote peanut growth under waterlog condition. Therefore, these two bacteria could be a new choice to reduce fungicide usage for peanut production. The objective of this study was to improve rhizobial inoculant for enhance growth and control root rot disease in peanut under flooding situation. The results showed that *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and *B. megaterium* A20 could be co-cultured without any antagonistic effect between each other, and both bacteria could colonize peanut root under waterlog condition. The number of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 higher than 10^8 cells/seed could enhance the growth of peanut under waterlog condition. The efficiency of co-culture SUTN9-2 with A20 was investigated and it was found that these bacteria could control the root rot disease when the amount of *A. niger* was in range of 10^2-10^4 spores/seed, which showed similar efficiency when compared with carbendazim as fungicide. The inoculant of co-culture bacteria has been formulated. Supplement of PVP in YEM medium with buffer could enhance the shelf-life of inoculant. The cell number of SUTN9-2 and A20 remained higher than 10^8 cells/ml at 4-5 months after storage with still maintain the antagonistic activity against *A. niger* as well as nodulation and nitrogen fixation on peanut along with the storage time. Therefore, this invented inoculant in form of co-culture would be useful for farmers who want to grow peanut under organic farming or who want to reduce the fungicide usage to safe people and environment.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล	3
2.1 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (antagonistic activity) ระหว่างเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกันสำหรับถั่วลิสง	3
2.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการเข้ายึดเกาะกับรากของถั่วลิสง	3
2.3 การทดสอบปริมาณของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง	3
2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง	4
2.5 การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20	5
2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	5
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	6
3.1 คุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกันสำหรับถั่วลิสง	6
3.1.1 การเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (antagonistic activity) ระหว่างเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วม	6
3.1.2 ความสามารถของเชื้อในการเข้ายึดเกาะกับรากของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม	6
3.2 ปริมาณของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง	7
3.3 ประสิทธิภาพของการใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง	12
3.4 สูตรอาหารที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อบาซิลลัส	19
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	25

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความรุนแรงการเกิดโรค (%) ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน) ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะปกติ..... 15
ตารางที่ 2 ตาราง ANOVA แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant) ค่าจำนวนปม (nodule/plant) ค่าน้ำหนักปมแห้ง (mg/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะปกติ..... 16
ตารางที่ 3 ตาราง ANOVA แสดงค่าความรุนแรงการเกิดโรค (%) ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน) ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะน้ำท่วม..... 17
ตารางที่ 4 ตาราง ANOVA แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant) ค่าจำนวนปม (nodule/plant) ค่าน้ำหนักปมแห้ง (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะน้ำท่วม..... 18

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ความสามารถในการยึดเกาะรากของถั่วลิสง (root colonization ability) ของเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 และเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ภายใต้สภาวะน้ำท่วม..... 7
รูปที่ 2 ภาพรวมการเจริญของถั่วลิสงที่ทำการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 8
รูปที่ 3 ภาพรวมระบบรากของถั่วลิสงที่ทำการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 8
รูปที่ 4 น้ำหนักต้นแห้ง (Plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 9
รูปที่ 5 น้ำหนักรากแห้ง (Root dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 10
รูปที่ 6 จำนวนปม (nodule number) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 10
รูปที่ 7 น้ำหนักปมแห้ง (nodule dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 11
รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของเชื้อไรโซเบียมภายในปมของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 11

รูปที่ 9 แสดงถั่วลิสงที่อายุ 45 วันหลังการปลูกทดลองในสภาวะปกติ (1) ถั่วลิสงไม่ใส่เชื้อ; (2) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *Aspergillus niger* ที่ 10^2 spore/seed; (3) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^3 spore/seed; (4) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^4 spore/seed; (A) ชุดไม่ใส่เชื้อ; (B) ชุดใส่เชื้อ *A. niger*; (C) ชุดใส่สารเคมี carbendazim; (D) ชุดใส่เชื้อ*Bacillus* A20; (E) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim; (F) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2; (G) ชุดใส่เชื้อ*Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20; (H) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20..... 13

รูปที่ 10 แสดงถั่วลิสงที่อายุ 45 วันหลังการปลูกทดลองในสภาวะน้ำท่วม (1) ถั่วลิสงไม่ใส่เชื้อ *Aspergillus niger*; (2) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^2 spore/seed; (3) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^3 spore/seed; (4) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^4 spore/seed; (A) ชุดไม่ใส่เชื้อ; (B) ชุดใส่เชื้อ *A. niger*; (C) ชุดใส่สารเคมี carbendazim; (D) ชุดใส่เชื้อ *Bacillus* A20; (E) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim; (F) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2; (G) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20; (H) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี carbendazim ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20..... 14

รูปที่ 11 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในหัวเชื้อรูปแบบผสม ณ อายุการเก็บรักษาที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้สูตรอาหาร YEM+buffer (ไม่มีการเติม PVP)..... 20

รูปที่ 12 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในหัวเชื้อรูปแบบผสม ณ อายุการเก็บรักษาที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้สูตรอาหาร YEM+buffer (มีการเติม PVP)..... 21

รูปที่ 13 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* โดยหัวเชื้อรูปแบบผสม (SUTN9-2 + A20) ณ ที่อายุการเก็บรักษา 5 เดือน; (A) เชื้อรา *A. niger* (control); (B) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่ไม่เติม PVP; (C) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่เติม PVP..... 22

รูปที่ 14 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* โดยหัวเชื้อรูปแบบผสม (SUTN9-2 + A20) ณ ที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน; (A) เชื้อรา *A. niger* (control); (B) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่ไม่เติม PVP; (C) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่เติม PVP..... 23

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) เป็นพืชตระกูลถั่วที่ปลูกมากในหลาย ๆ ประเทศ ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนสูง จึงถูกนำมาแปรรูปเป็นอาหาร และผลิตน้ำมันถั่วลิสง ในประเทศที่กำลังพัฒนามีการปลูกถึง 80% แต่ผลผลิตน้อยกว่าประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิต คือ การขาดธาตุอาหารในดิน และการเกิดโรคของถั่วลิสงที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มากกว่า 55 ชนิด เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ไมโคพลาสมา นีมาโทด รวมทั้งเชื้อรา (Podile and Kishore, 2002) โดยเชื้อราเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การผลิตถั่วลิสงเกิดการสูญเสียผลผลิตในระดับเศรษฐกิจ เชื้อราที่สำคัญ คือ *Aspergillus niger* เป็นเชื้อราที่สามารถก่อโรคแก่รากพืช และเกาะติดเมล็ดพืชได้ โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว (Pass and Griffin, 1972) เช่น ถั่วลิสงซึ่งมีส่วนของผลผลิตหรือฝักอยู่ใต้ดินจึงพบการเกิดโรคมากเนื่องจากเชื้อราอาศัยอยู่ในดิน (Horn, 1996) พบว่าความเสียหายที่เกิดจากเชื้อราดังกล่าว จะทวีความรุนแรงมากขึ้น ภายหลังภาวะน้ำท่วมขัง หรือมีฝนตกชุก ทำให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรมากขึ้น ดังนั้นเกษตรกรจึงใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้ ยกตัวอย่างเช่น Carbendazim, Benomyl และ Sulfur เป็นต้น โดยทำการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรานี้กับเมล็ดถั่วลิสงโดยตรง ซึ่งพบว่าสารเคมีบางชนิดส่งผลกระทบต่อจำนวนเชื้อไรโซเบียมที่ใช้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ นอกจากนี้สารเคมีกำจัดเชื้อราเหล่านี้ยังอาจมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์แก่พืชด้วยเช่นกัน (Castro et al., 1997; Hashem et al., 1997) ส่งผลให้เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพกับเมล็ดพันธุ์เหล่านี้จึงไม่เกิดประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการใช้เชื้อไรโซเบียมคลุกกับเมล็ดถั่วลิสงก่อนทำการปลูกซึ่งทำให้เชื้อไรโซเบียมที่ใช้สัมผัสต่อสารเคมีโดยตรง

ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพได้ถูกนำมาใช้ควบคุมโรคพืชอย่างมีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เชื้อ *Bacillus megaterium* A20 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมากจากเชื้อรา *A. niger* ได้ (Yuttavanichakul et al., 2012) โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้จดทรัพย์สินทางปัญญา (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2554) เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ในขณะที่เชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ได้มีการทดสอบว่าเป็นเชื้อที่สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วมได้ ซึ่งได้จดทรัพย์สินทางปัญญา (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2556) เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วลิสง ดังนั้นหากสามารถพัฒนารูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียม ให้มีคุณสมบัติทั้งการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ รวมทั้งมีความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง ที่เกิดจากเชื้อรา *A. niger* ได้ ก็จะสามารถใช้หัวเชื้อไรโซเบียมดังกล่าวทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา โดยคลุกหัวเชื้อไรโซเบียมนี้กับเมล็ดถั่วลิสงก่อนทำการปลูกเพื่อเป็นการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ อีกทั้งหัวเชื้อไรโซเบียมยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืชได้ ทำให้ถั่วลิสงสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น นอกจากนี้การใช้หัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการควบคุมทางชีวภาพสามารถใช้ได้ในระบบการเกษตรแบบเกษตรอินทรีย์ที่กำลังเป็นที่นิยม รวมทั้งเป็นการลดการใช้สารเคมีในระบบการเกษตรเพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและตัวเกษตรกรเอง ดังนั้นการใช้หัวไรโซเบียมลักษณะนี้จะเป็นการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมให้เกิดประโยชน์ 2 ทาง คือ เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นถั่วลิสงจากการตรึงไนโตรเจนในอากาศ และเพื่อการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราซึ่งเป็นการควบคุมทางชีวภาพ เพื่อเป็นการช่วยเหลือให้ผู้บริโภคได้รับความปลอดภัย รวมทั้งช่วยให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนในการผลิต และสามารถเผชิญหน้ากับสถานการณ์น้ำท่วมได้ โครงการวิจัยนี้จะทำการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วลิสงให้มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสง รวมทั้งควบคุมโรครากเน่าในพืชแม้ประสบสภาวะน้ำท่วมเพื่อลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน และสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อให้ทราบคุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกันสำหรับถั่วลิสง

1.2.2 เพื่อให้ทราบปริมาณของเชื้อไรโซเบียมที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

1.2.3 เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง

1.2.4 เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อบาซิลลัส

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการตรวจสอบการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัส และคุณสมบัติในการยึดเกาะรากถั่วลิสงของเชื้อทั้งสองชนิด จากนั้นทดสอบหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่น้อยที่สุดที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม แล้วเลือกใช้ปริมาณไรโซเบียมที่เหมาะสมในการเป็นหัวเชื้อร่วมกับเชื้อบาซิลลัสแล้วตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญ และการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า (*A. niger*) ที่ปนเปื้อนในวัสดุปลูกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วม ในขณะเดียวกันทำการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อไรโซเบียมร่วมกับบาซิลลัส แล้วตรวจสอบอายุการเก็บรักษาเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้รูปแบบของหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมในรูปแบบผสมที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน และยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในพืช รวมทั้งได้กระบวนการผลิต สูตรอาหารที่สามารถในใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป ซึ่งการเผยแพร่งานวิจัยนี้ทำให้เกษตรกรสนใจที่จะใช้หัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบหัวเชื้อผสมนี้แทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทั้งนี้ได้ทำการเผยแพร่โดยการทำแปลงสาธิตในพื้นที่ของเกษตรกรในกลุ่มสหกรณ์การเกษตรลำพระเพลิง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 1 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (antagonistic activity) ระหว่างเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกันสำหรับถั่วลิสง

เชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ได้รับจากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี ทั้งนี้ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ในอาหาร Yeast Extract and Mannitol medium (YEM; องค์ประกอบใน 1 ลิตร, 10 กรัม Mannitol, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 กรัม NaCl, 0.5 กรัม Yeast extract, ปรับ pH 6.8) (Somasegaran and Hoben, 1994) ในขณะที่เลี้ยงเชื้อบาซิลลัส A20 ในอาหาร Nutrient broth (NB; องค์ประกอบใน 1 ลิตร, 5 กรัม Peptone, 3 กรัม Beef extract, 5 กรัม NaCl, ปรับ pH 6.8) โดยเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 กับเชื้อบาซิลลัส A20 (การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน) โดยเลี้ยงเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 บนอาหารวุ้น NA ก่อน 3-4 วัน แล้วทำการปลูกเชื้อ *B. megaterium* A20 ลงไป จากนั้นนำไปบ่มประมาณ 2 วัน แล้วตรวจสอบ Inhibition Zone

2.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการเข้ายึดเกาะกับรากของถั่วลิสง

นำเมล็ดถั่วลิสงนำมาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิว แล้วเพาะในภาชนะปิด เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำเมล็ดที่งอกรากแล้วเล็กน้อยไปเพาะต่อในหลอดทดลอง ขนาด 2 × 15 นิ้ว โดยภายในหลอดบรรจุสารละลายแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Hoagland plant nutrient solution) โดยวางเมล็ดบนตาข่ายโดยให้บริเวณรากแช่อยู่ในสารละลาย แล้วทำการหยดเชื้อที่ต้องการทดสอบ (*Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 หรือ *Bacillus megaterium* A20) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (10^8 เซลล์) ลงไปบนเมล็ด แล้วปลูกในห้องทึบแสง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อจำลองการเข้ายึดเกาะรากถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วม โดยทำการตัดรากแก้วขนาด 1 เซนติเมตร มาตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะราก ณ วันที่ 0, 3, 5, 7 วัน โดยวิธี Total Plate Count

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 2 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.3 การทดสอบปริมาณของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

ทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ในอาหารเหลว YEM จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นล้างเซลล์และละลายในสารละลาย 0.85% NaCl เพื่อปรับให้เชื้อมีจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยทำการนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารละลายเริ่มต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemocytometer จากนั้นจึงทำการเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเชื้อไรโซเบียมในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับถั่วลิสงที่ปลูกใน Leonard's jar ที่บรรจุเวอร์มิคูไลท์ผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก ภายใต้สภาวะควบคุมการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

โดยปลูกถั่วลิสงร่วมกับการปลูกเชื้อ (inoculation) ไรโซเบียมที่ปริมาณเซลล์ 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด เทียบกับถั่วลิสงที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (un-inoculated plant) ในสภาวะปกติ และสภาวะที่มีน้ำท่วมขัง โดยจัดให้มีน้ำท่วมขังระดับโคนต้นเริ่มในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการปลูกจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส น้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักรากแห้ง จำนวนปม และน้ำหนักปม เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ ปริมาณของเชื้อไรโซเบียมที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการทดสอบร่วมกับเชื้อ *B. megaterium* A20 ซึ่งได้ทดสอบในงานวิจัยก่อนหน้านี้แล้วว่าต้องใช้ในปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ดจึงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าได้ (Yuttavanichakul et al., 2012)

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 3 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง

นำเมล็ดถั่วลิสงมาทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด แล้วให้เชื้อรา *A. niger* ในปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ 10^4, 10^5 และ 10^6 สปอร์ต่อเมล็ด ปลูกลงใน Leonard's jar ดังที่อธิบายในการทดลองที่ผ่านมา แล้วทำการปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ที่เลี้ยงไว้จนมีความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตรา 1:1 ให้กับเมล็ดถั่วลิสงที่ติดเชื้อรา ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด โดยปลูกในวัสดุปลูก 2-3 เมล็ดต่อกระถางทดสอบ สังเกตการเจริญของถั่วลิสงและการควบคุมโรคของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 โดยปลูกทดสอบใน 2 สภาวะ คือ สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วม ดังที่อธิบายในการทดลองที่ผ่านมา ทั้งนี้ในแต่ละสภาวะได้แบ่งการทดสอบออกเป็น 10 ตำรับ ดังนี้

ก. ถั่วลิสงที่ไม่ใส่เชื้อรา หรือเชื้อไรโซเบียมเลย
ข. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2
ค. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bacillus megaterium* A20
ง. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *A. niger*
จ. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อรา *A. niger*
ฉ. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 และเชื้อรา *A. niger*
ช. ถั่วลิสง เติมสาร Carbendazim 0.02% (w/v)
ซ. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสาร Carbendazim 0.02 % (w/v)
ฌ. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสาร Carbendazim 0.02% (w/v) ร่วมกับ *A. niger*
ญ. ถั่วลิสง ปลูกเชื้อด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับ *Bacillus megaterium* A20 และเชื้อรา *A. niger*

โดยทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละตำรับ แล้วจดบันทึกความสามารถในการยับยั้งอาการของโรคที่ติดมากับเมล็ดที่เกิดจากเชื้อรา *A. niger*

รวมทั้งตรวจสอบน้ำหนักพืชแห้ง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมในแต่ละสภาวะโดยใช้วิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1994) หลังพืชมีอายุครบ 45 วัน โดยการให้คะแนนการเกิดโรคจะปฏิบัติตามวิธีของ Ziedan (2000) ดังนี้

0 = ไม่แสดงการเป็นโรคใดๆ (No symptoms (healthy plant)),
1 = ใบพืชมีสีเหลือง ¼ ของใบ
2 = ใบพืชมีสีเหลือง ½ ของใบ
3 = ใบพืชมีสีเหลือง ¾ ของใบ และ มีจุดสีน้ำตาลไหม้บนใบ
4 = พืชเหี่ยวแห้งและตาย

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 4 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.5 การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20

ทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ในอาหารเหลว YEM broth เป็นเวลา 5 วัน และทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในอาหาร Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งเซลล์เจริญเต็มที่จนมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เซลล์ที่ได้นำมาผสมกันในรูปของหัวเชื้อผสมในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้น้ำเกลือ 0.85% (w/v) เป็นตัวทำละลาย แล้วใช้หัวเชื้อผสมนี้ในเพื่อเป็น starter (10% inoculum) ในการปลูกเชื้อทดสอบการเจริญ และการมีชีวิตอยู่รอดในอาหารทดสอบสูตรอาหารต่าง ๆ ที่มีการผสมสารโพลิเมอร์ Polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อผสม (Tittabutr et al., 2007) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับสภาพให้เป็นบัฟเฟอร์โดยการเติม K_2HPO_4 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ KH_2PO_4 0.15 กรัมต่อลิตร โดยตรวจสอบอายุการเก็บรักษาทุกเดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน ทั้งนี้ในแต่ละเดือนได้มีการตรวจสอบความสามารถในการเข้าสร้างปม และจำนวนไรโซเบียมที่มีชีวิตเหลืออยู่ด้วยวิธี Plant Infection Test (Somasegaran and Hoben, 1994) และตรวจสอบความสามารถของหัวเชื้อผสมนี้ในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ของเชื้อบาซิลลัสด้วยวิธีการ dual culture test ทั้งนี้สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา คือ

1. YEM + buffer
2. YEM + buffer + PVP

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ที่ได้จากแต่ละการทดลอง ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) โดยวิเคราะห์ Anova และ Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 คุณสมบัติของเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกันสำหรับถั่วลิสง

3.1.1 การเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (antagonistic activity) ระหว่างเชื้อไรโซเบียมและเชื้อบาซิลลัสในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วม

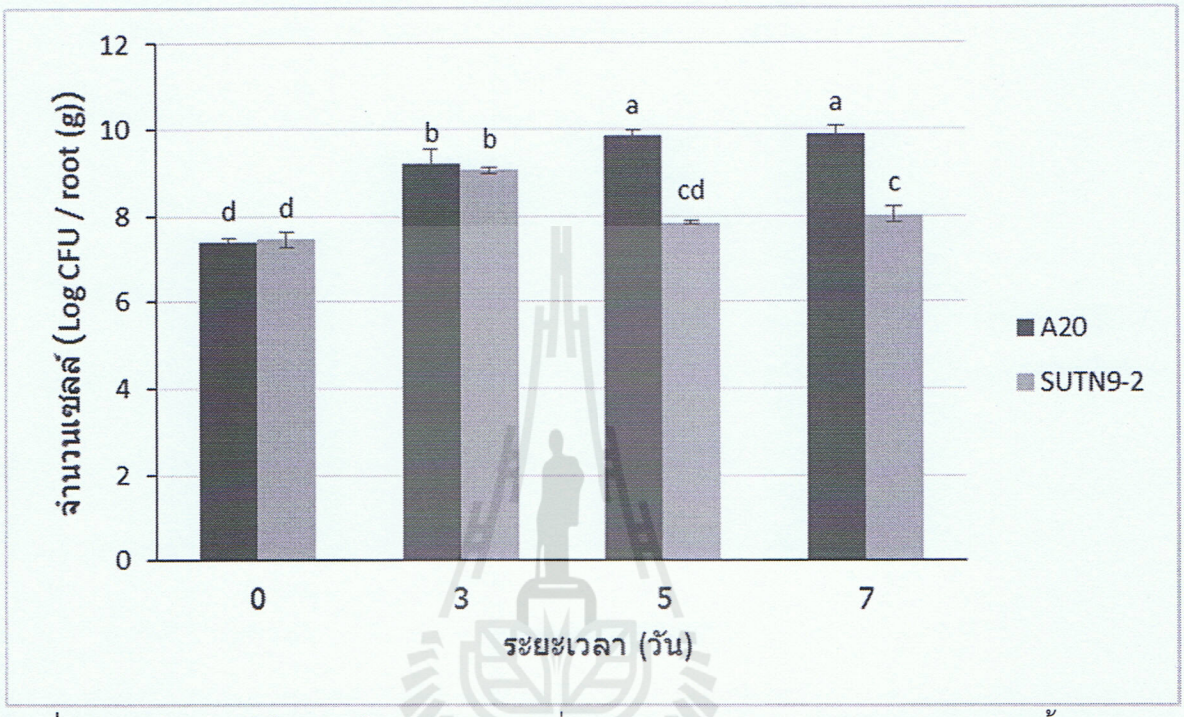
จากการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันระหว่างเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 กับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ผลการทดสอบพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถเจริญร่วมกันบนอาหารทดสอบได้ โดยไม่มีการยับยั้งการเจริญซึ่งกันและกัน โดยการทดสอบนี้จำเป็นต้องมีการยืนยันก่อนการนำไปผลิตในรูปหัวเชื้อร่วมเนื่องจากเชื้อบาซิลลัส A20 มีรายงานที่นอกจากจะสร้างสารยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity) แล้วยังมีการสร้าง lytic pretease enzyme ที่อาจส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ (Yuttavanichakul et al., 2012) อย่างไรก็ตามไม่พบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 โดยเชื้อบาซิลลัส A20 ดังนั้นสามารถนำเชื้อทั้งสองชนิดนี้ไปทดสอบในรูปของหัวเชื้อร่วมต่อไป

3.1.2 ความสามารถของเชื้อในการเข้ายึดเกาะกับรากของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม

ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในการยึดเกาะรากของถั่วลิสงโดยจำลองการทดสอบภายใต้สภาวะน้ำท่วมในหลอดทดลอง ผลการทดลองพบว่าที่วันแรกของการปลูกเชื้อลงบนเมล็ดถั่วลิสงที่มีรากงอกแล้วพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถยึดจับรากได้ในปริมาณไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณเซลล์มากกว่า 10^7 เซลล์ต่อกรัมราก และจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ยึดเกาะรากถั่วลิสงมีเพิ่มขึ้นในระดับมากกว่า 10^9 เซลล์ต่อกรัมราก ในวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถใช้สารอาหารจากรากพืช (root exudates) ในการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยมีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะรากได้น้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อกรัมราก ในวันที่ 5 และ 7 หลังการปลูกเชื้อ ในขณะที่จำนวนของเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญมากกว่า 10^9 เซลล์ต่อกรัมราก (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเชื้อบาซิลลัส A20 มีความสามารถในการยึดเกาะรากได้ดี ผลการทดสอบนี้เป็นการยืนยันความสามารถของเชื้อบาซิลลัส A20 ในการยึดเกาะราก โดยงานวิจัยของ Yuttavanichakul et al. (2012) พบว่าเชื้อ A20 สามารถยึดเกาะรากได้อยู่ในช่วง 7.17–9.84 log cfu ต่อกรัมรากหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน ในขณะที่การทดสอบในงานวิจัยนี้พบว่ายังมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับมากกว่า 10^9 เซลล์ต่อกรัมราก แม้วันที่ 7 หลังการปลูกเชื้อ ทั้งนี้เคยมีรายงานว่าเชื้อในกลุ่มบาซิลลัสที่มีความสามารถในการยึดเกาะกับรากพืชอยู่ในช่วง 10^4-10^9 เซลล์ต่อกรัมราก พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ดี โดยความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะรากมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดบนราก (Idris et al., 2007) โดยเชื้อที่มีความสามารถในการยึดเกาะรากได้ดีมักจะสามารถสร้าง biofilm ที่ช่วยในการยึดเกาะราก ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีในการแข่งขันกับเชื้อราในการเข้ายึดเกาะรากพืชซึ่งอาจเป็นกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมเชื้อราก่อโรครากเน่าโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Haggag and Timmusk, 2008; Lugtenberg et al., 1991) ดังนั้นในงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อบาซิลลัส A20 มีความสามารถในการยึดเกาะรากถั่วลิสงได้ดีแม้ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขัง จึงมีแนวโน้มที่เชื้อบาซิลลัส A20 จะมีความสามารถในการป้องกันพืชจากโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *A. niger* ได้ต่อไป สำหรับเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ถึงแม้จะพบว่าความสามารถในการยึดเกาะกับรากถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมจะลดลงในวันที่ 5 และ 7 หลังจากการปลูก

เชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีผลต่อการสร้างปมรากในการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิสัมพันธ์ในการเข้าสร้างปมระหว่างเชื้อไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้เชื้อไรโซเบียมที่ยึดเกาะรากได้ในช่วงแรกหลังการปลูกเชื้อให้กับถั่วลิสงสามารถเข้าสู่เซลล์รากของถั่วลิสงเพื่อตรึงไนโตรเจนต่อไป

ดังนั้นจากการทดลองในหัวข้อนี้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อบาซิลลัส A20 มีคุณสมบัติในการใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกับเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 1 ความสามารถในการยึดเกาะรากของถั่วลิสง (root colonization ability) ของเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 และเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ภายใต้สภาวะน้ำท่วม

3.2 ปริมาณของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

โดยทั่วไปการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมโดยการคลุกเมล็ดถั่วในสภาวะปกติต้องให้มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมอย่างน้อย 10^6 เซลล์ต่อเมล็ดเพื่อทำให้แน่ใจว่ามีปริมาณไรโซเบียมเพียงพอที่จะเข้าสร้างปม ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง ผลการทดลองพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมในสภาวะน้ำท่วมขังสามารถทำให้ถั่วลิสงเจริญได้ดีขึ้นกว่าการไม่ใช้เชื้อไรโซเบียม แต่อย่างไรก็ตามการเจริญของถั่วลิสงยังไม่ดีเทียบเท่ากับการปลูกในสภาวะปกติ ทั้งนี้ภาพรวมของการทดสอบเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ในระดับความเข้มข้นของเซลล์ต่าง ๆ กับการปลูกถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง แสดงในภาพที่ 2 ในขณะที่ภาพที่ 3 แสดงภาพรวมของระบบรากถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วม ซึ่งพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8-10^9 เซลล์ต่อเมล็ดมีแนวโน้มทำให้ระบบรากถั่วที่เจริญภายใต้สภาวะน้ำท่วมมีการเจริญและมีความแข็งแรงมากกว่าถั่วที่ไม่ได้มีการใช้เชื้อไรโซเบียม (un-inoculation)

Un-inoculated 10^6 10^7 10^8 10^9

ระดับความเข้มข้นของเชื้อไรโซเบียม (เซลล์ต่อเมล็ด)

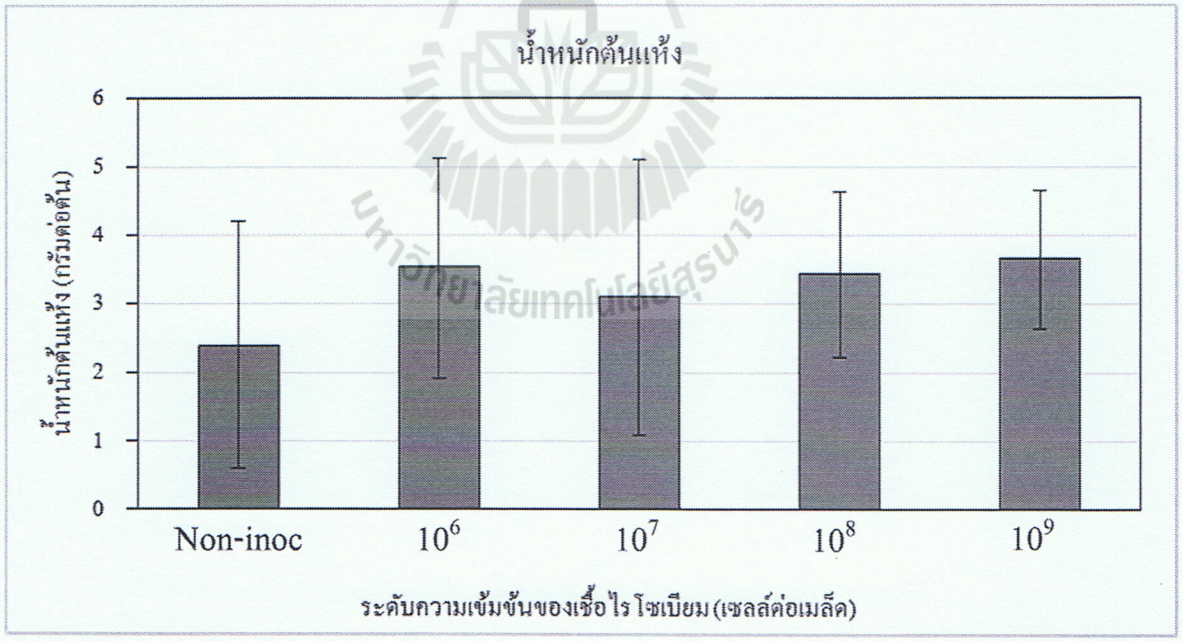
รูปที่ 2 ภาพรวมการเจริญของถั่วลิสงที่ทำการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

Un-inoculation 10^6 10^7 10^8 10^9

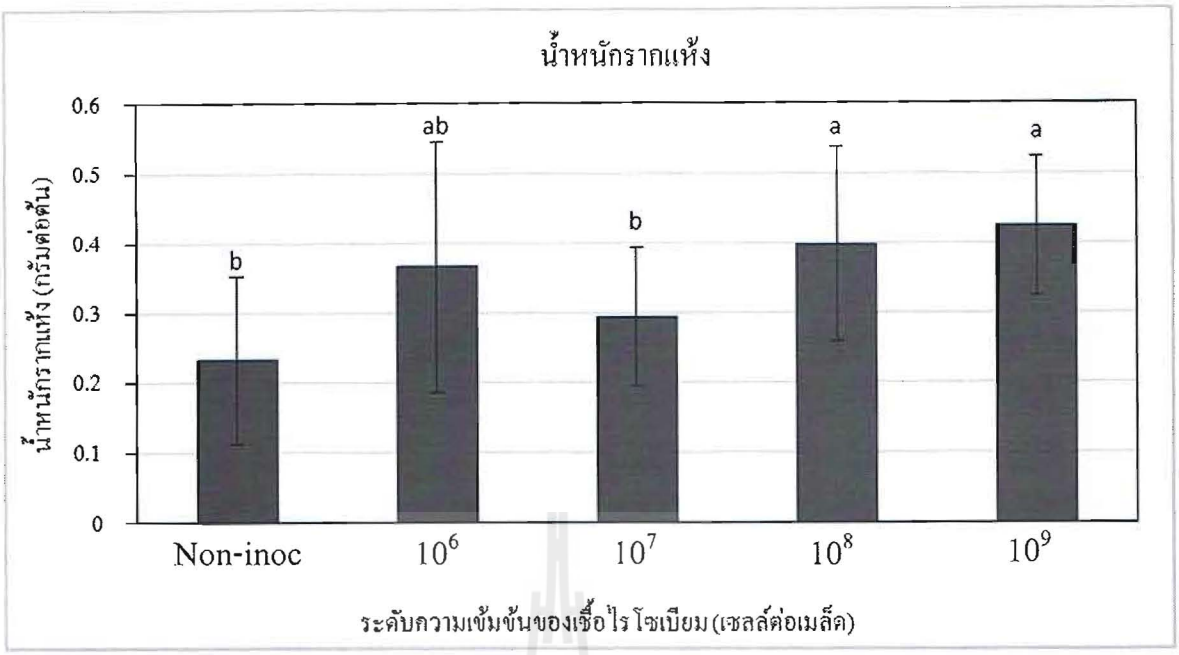
ระดับความเข้มข้นของเชื้อไรโซเบียม (เซลล์ต่อเมล็ด)

รูปที่ 3 ภาพรวมระบบรากของถั่วลิสงที่ทำการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

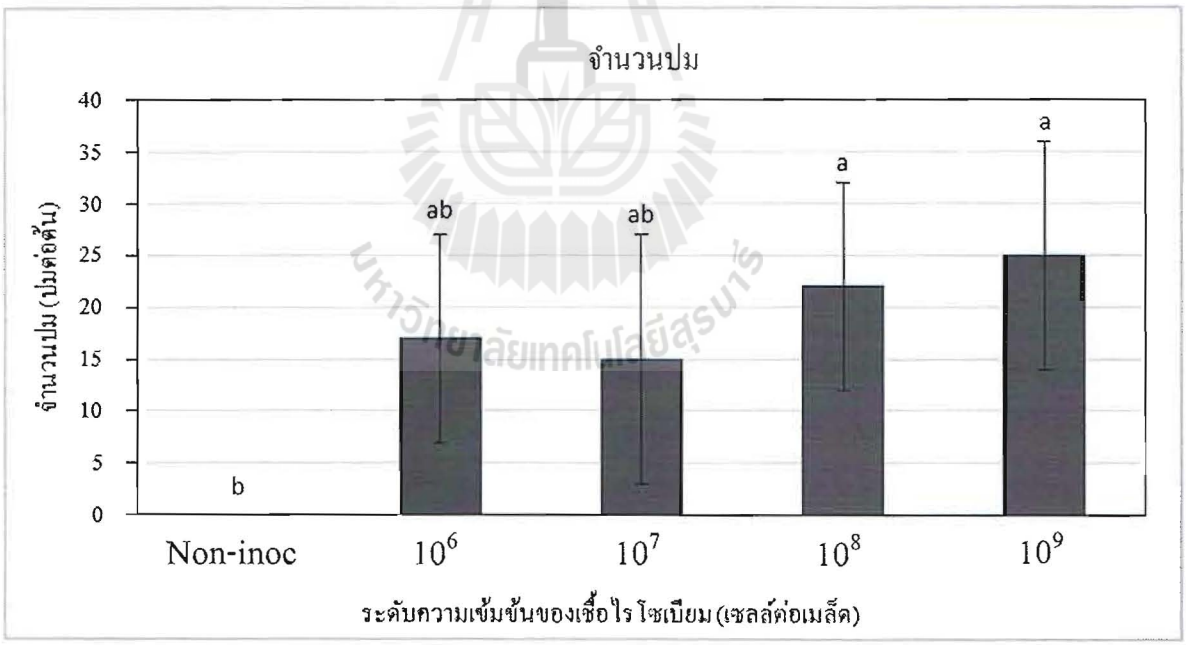
จากการตรวจสอบน้ำหนักต้นแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ความเข้มข้นของเซลล์ในระดับต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับการปลูกถั่วลิสงมีแนวโน้มทำให้ต้นพืชมีการเจริญได้ดีกว่าการไม่ใช้ไรโซเบียมในสภาวะน้ำท่วมขัง (รูปที่ 4) และเมื่อตรวจสอบน้ำหนักรากแห้งพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมที่ระดับความเข้มข้น 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถส่งเสริมให้รากถั่วลิสงมีการเจริญได้ดีและมีน้ำหนักมากกว่ารากถั่วลิสงที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อไรโซเบียม (non-inoculation) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์จำนวนปมที่สร้างโดยเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 พบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมที่ระดับความเข้มข้น 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ดให้ผลการสร้างปมได้สูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อไรโซเบียมที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^7 เซลล์ต่อเมล็ด (รูปที่ 6) แต่พบว่าน้ำหนักปมที่ได้จากการใช้เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด มีน้ำหนักมากกว่าน้ำหนักปมที่ได้จากการใช้เชื้อไรโซเบียมที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^7 เซลล์ต่อเมล็ด (รูปที่ 7) ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงสุดเมื่อใช้เชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด แต่ไม่แตกอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อไรโซเบียมที่ระดับความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด (รูปที่ 8) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด มีผลทำให้ถั่วลิสงสามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้ ดังนั้นในการทดสอบต่อไปจึงเลือกใช้ระดับของเชื้อไรโซเบียมที่ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด ซึ่งเป็นระดับของเชื้อไรโซเบียมน้อยที่สุดที่สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในสภาวะน้ำท่วมขังได้



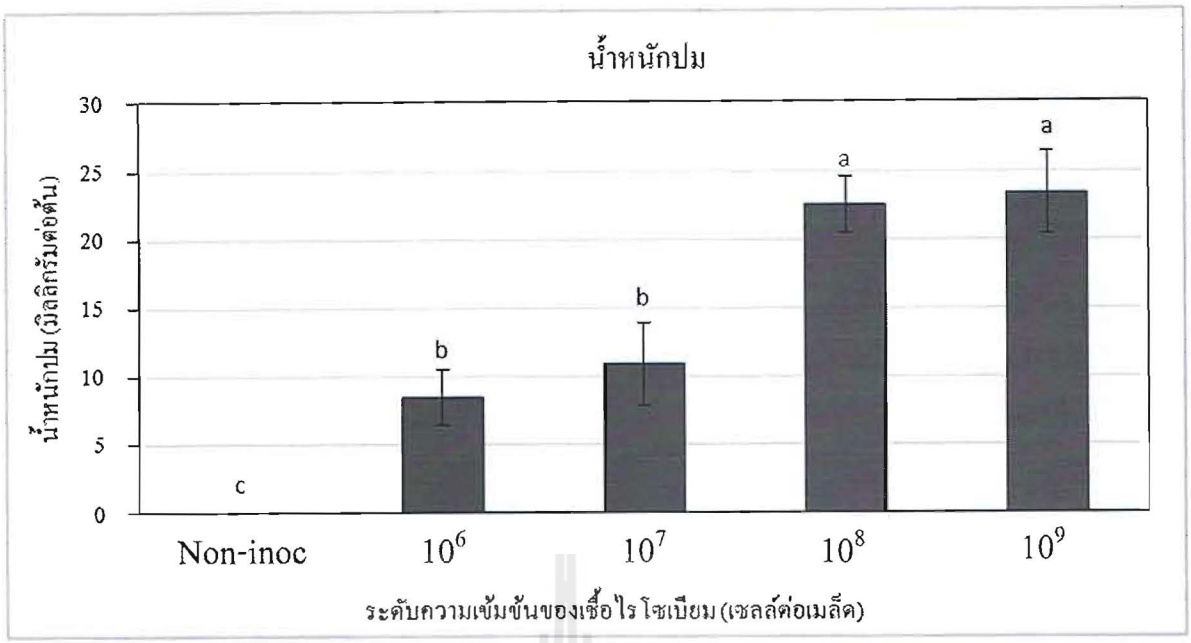
รูปที่ 4 น้ำหนักต้นแห้ง (Plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



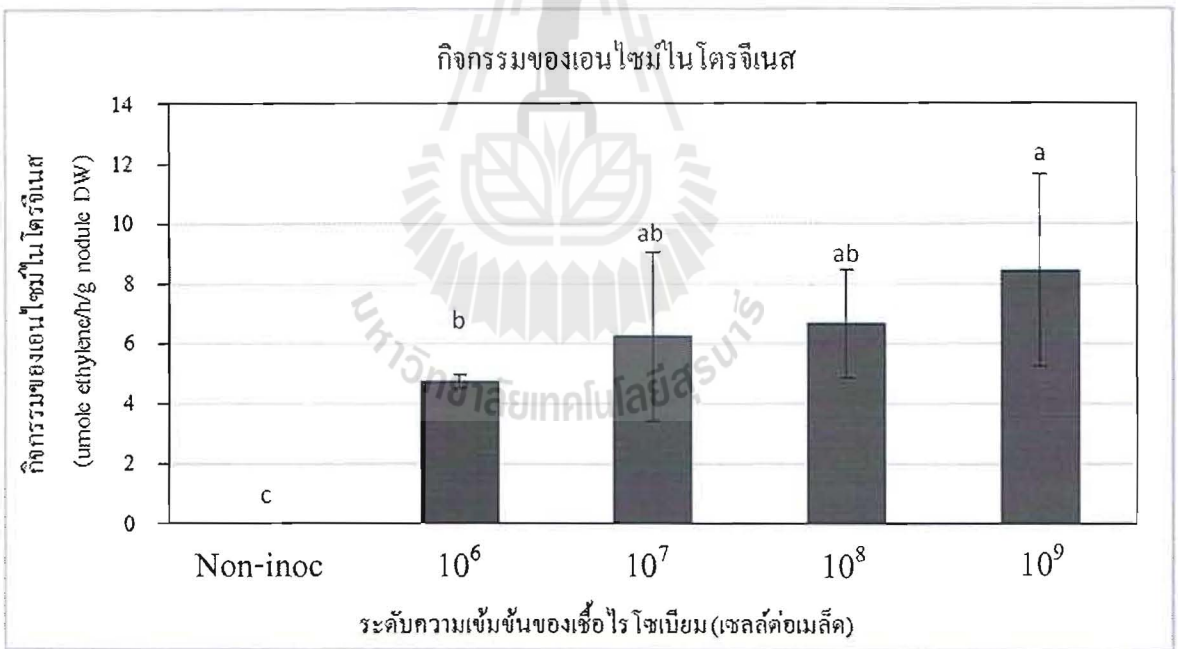
รูปที่ 5 น้ำหนักรากแห้ง (Root dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 6 จำนวนปม (nodule number) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 7 น้ำหนักปมแห้ง (nodule dry weight) ของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



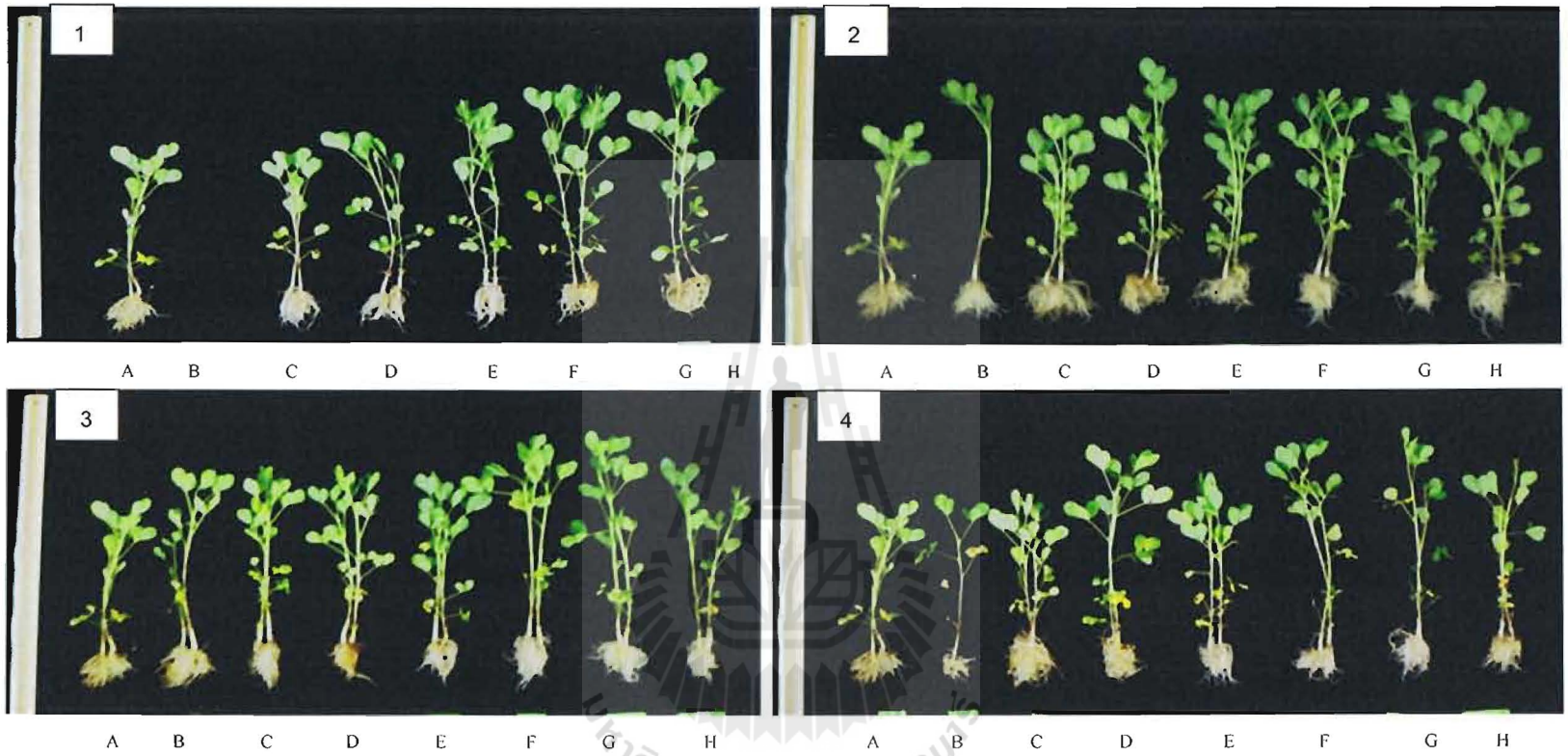
รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของเชื้อไรโซเบียมภายในปมของถั่วลิสงที่ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

3.3 ประสิทธิภาพของการใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ดขึ้นไป สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด ในการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า ซึ่งมักส่งผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง โดยในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าของเชื้อบาซิลลัส A20 กับการใช้สารเคมี carbendazim โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา *A. niger* ที่ระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^2, 10^3 และ 10^4 สปอร์ต่อเมล็ด และทำการทดสอบทั้งการปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง (รูปที่ 9 และ 10) จากภาพรวมผลการทดลองพบว่าถั่วลิสงที่มีการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 มีการเจริญจากการได้ปุ๋ยไนโตรเจนจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ได้ดีกว่าถั่วลิสงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไรโซเบียมซึ่งแสดงอาการเหลืองและขาดธาตุอาหารทั้งในการปลูกภายใต้สภาวะปกติและสภาวะน้ำท่วมขัง อย่างไรก็ตามถั่วลิสงยังคงมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าในการปลูกภายใต้สภาวะปกติ นอกจากนี้ระดับความความรุนแรงของโรคมีมากขึ้นเมื่อจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ต่อเมล็ดเพิ่มมากขึ้น และความรุนแรงของโรคจะเกิดมากขึ้นเมื่อปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและคะแนนความรุนแรงการเกิดโรคของถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ พบว่าเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^4 สปอร์ต่อเมล็ด ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคต่อถั่วลิสงมากที่สุด คือเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 50% และคะแนนการเกิดโรคเท่ากับ 2 โดยที่ความเข้มข้นของเชื้อราในระดับนี้ พบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการใช้สารเคมี carbendazim ให้ผลในการป้องกันการเกิดโรครากเน่าได้ดีกว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจสอบน้ำหนักต้นโดยรวมพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับ A20 หรือการใช้ร่วมกับสารเคมี carbendazim สามารถส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 หรือร่วมกับ carbendazim โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อระดับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 มีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 หรือร่วมกับสารเคมี carbendazim (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในสภาวะปกติ การใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับสารเคมี carbendazim ถึงแม้จะให้ผลดีที่สุด แต่หากระดับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา *A. niger* เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 10^2-10^4 สปอร์ต่อเมล็ด สามารถใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 ในการป้องกันการเกิดโรครากเน่าและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลิสงได้ดีไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมีเช่นกัน

รูปที่ 9 แสดงถั่วลิสงที่อายุ 45 วันหลังการปลูกทดลองในสภาวะปกติ (1) ถั่วลิสงไม่ใส่เชื้อ; (2) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *Aspergillus niger* ที่ 10^2 spore/seed; (3) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^3 spore/seed; (4) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^4 spore/seed; (A) ชุดไม่ใส่เชื้อ; (B) ชุดใส่เชื้อ *A. niger*; (C) ชุดใส่สารเคมี carbendazim; (D) ชุดใส่เชื้อ *Bacillus* A20; (E) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim; (F) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2; (G) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20; (H) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20



รูปที่ 10 แสดงถั่วลิสงที่อายุ 45 วันหลังการปลูกทดลองในสภาวะน้ำท่วม (1) ถั่วลิสงไม่ใส่เชื้อ *Aspergillus niger*; (2) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^2 spore/seed; (3) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^3 spore/seed; (4) ถั่วลิสงใส่เชื้อ *A. niger* ที่ 10^4 spore/seed; (A) ชุดไม่ใส่เชื้อ; (B) ชุดใส่เชื้อ *A. niger*; (C) ชุดใส่สารเคมี carbendazim; (D) ชุดใส่เชื้อ*Bacillus* A20; (E) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี cabendazim; (F) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2; (G) ชุดใส่เชื้อ*Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20; (H) ชุดใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ร่วมกับสารเคมี carbendazim ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* A20

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าการเกิดโรค (%) ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน) ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะปกติ

ชุดการทดลอง	ค่าการเกิดโรค (%)				ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน)				ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม (g/plant)			
	A. niger (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)			
	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4
ชุดควบคุม(ไม่ใส่เชื้อ)	0 ± 0.00^{c}	–	–	–	0 ± 0.00^{c}	–	–	–	0.96 ± 0.04^{b}	–	–	–
ชุดควบคุม(*A.niger*)	–	41.67 ± 2.08^{ab}	25.00 ± 0.00^{a}	50.00 ± 1.00^{a}	–	1.33 ± 2.08^{ab}	1.67 ± 0.00^{a}	2.00 ± 1.00^{a}	–	1.09 ± 0.05^{b}	1.29 ± 0.30^{ab}	1.29 ± 0.30^{ab}
Sut9-2	0 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{bc}	0.00 ± 0.00^{bc}	25.00 ± 0.00^{abc}	0 ± 0.00^{c}	0.33 ± 0.00^{bc}	0.33 ± 0.00^{bc}	1.33 ± 0.00^{ab}	1.70 ± 0.11^{ab}	2.01 ± 0.96^{a}	1.49 ± 0.03^{ab}	0.9 ± 0.03^{b}
A20	0 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	25.00 ± 0.00^{abc}	0 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	1 ± 0.00^{abc}	1.20 ± 0.14^{ab}	1.24 ± 0.02^{ab}	1.46 ± 0.15^{ab}	1.28 ± 0.05^{ab}
Sut9-2+A20	0 ± 0.00^{c}	8.33 ± 0.58^{bc}	25.00 ± 0.00^{abc}	25.00 ± 0.58^{abc}	0 ± 0.00^{c}	0.33 ± 0.58^{bc}	1.00 ± 0.00^{abc}	1.00 ± 0.58^{abc}	1.19 ± 0.14^{ab}	1.36 ± 0.30^{ab}	1.52 ± 0.13^{ab}	1.36 ± 0.10^{ab}
Carbendazim	0 ± 0.00^{c}	8.33 ± 0.58^{bc}	25.00 ± 0.00^{abc}	25.00 ± 0.00^{abc}	0 ± 0.00^{c}	0.33 ± 0.58^{bc}	1.00 ± 0.00^{abc}	1.00 ± 0.00^{abc}	1.44 ± 0.02^{ab}	1.16 ± 0.16^{ab}	1.73 ± 0.03^{ab}	1.19 ± 0.08^{ab}
Sut9-2+Carbendazim	0 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.39^{c}	0.00 ± 0.39^{c}	0.00 ± 0.39^{c}	0 ± 0.00^{c}	0.22 ± 0.39^{c}	0.22 ± 0.39^{c}	0.22 ± 0.39^{c}	1.06 ± 0.15^{b}	1.66 ± 0.21^{ab}	1.38 ± 0.36^{ab}	1.09 ± 0.12^{b}
Sut9-2+Carbendazim+A20	–	8.33 ± 0.58^{bc}	8.33 ± 0.58^{bc}	8.33 ± 0.58^{bc}	–	0.33 ± 0.58^{bc}	0.33 ± 0.58^{bc}	0.33 ± 0.58^{bc}	–	1.40 ± 0.21^{ab}	1.36 ± 0.25^{ab}	1.40 ± 0.21^{ab}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 ตาราง ANOVA แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant) ค่าจำนวนปม (nodule/plant) ค่าน้ำหนักปมแห้ง (mg/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะปกติ

ชุดการทดลอง	ค่าการกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant)				ค่าจำนวนปม (nodule/plant)				ค่าน้ำหนักปมแห้ง (g/plant)			
	A. niger (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)			
	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4
ชุดควบคุม(ไม่ใส่เชื้อ)	0 ± 0.00^{h}	–	–	–	0.00 ± 0.00^{h}	–	–	–	0 ± 0^{g}	–	–	–
ชุดควบคุม(*A.niger*)	–	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	–	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	–	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}
Sut9-2	3.3 ± 1.53^{def}	4 ± 2.64^{def}	1.67 ± 0.58^{fg}	4.33 ± 2.52^{def}	107.17 ± 21.64^{a}	85.83 ± 35.48^{abc}	26.33 ± 6.84^{fgh}	9.17 ± 2.19^{gh}	0.06 ± 12.02^{bc}	0.06 ± 23.09^{bc}	0.011 ± 3.33^{fg}	0.013 ± 3.33^{efg}
A20	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}
Sut9-2+A20	2.00 ± 0.00^{fg}	1.00 ± 1.00^{fg}	5.00 ± 1.00^{de}	12.00 ± 6.00^{ab}	59.17 ± 5.09^{bcdef}	81.67 ± 0.88^{abcd}	49.67 ± 1.64^{defg}	63.67 ± 9.33^{bcdef}	0.07 ± 3.33^{a}	0.04 ± 14.53^{cde}	0.033 ± 6.67^{cdef}	0.043 ± 8.22^{cd}
Carbendazim	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}	0.00 ± 0.00^{g}
Sut9-2+Carbendazim	$4.67\pm.58^{de}$	9.00 ± 3.00^{bc}	12.33 ± 1.16^{ab}	11.67 ± 1.16^{ab}	26.83 ± 3.17^{fgh}	27.50 ± 3.28^{fgh}	41.00 ± 4.37^{efg}	69.50 ± 15.66^{bcde}	0.02 ± 3.33^{defg}	0.02 ± 3.33^{defg}	0.03 ± 3.33^{cdefg}	0.04 ± 5.77^{cde}
Sut9-2+Carbendazim+A20	–	15.00 ± 5.19^{a}	6.33 ± 5.51^{cd}	13.00 ± 3.46^{ab}	–	89.17 ± 21.64^{ab}	86.00 ± 25.72^{abc}	49.67 ± 21.17^{cdef}	–	0.05 ± 12.02^{bc}	0.07 ± 23.33^{a}	0.04 ± 12.02^{cde}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3 ตาราง ANOVA แสดงค่าการเกิดโรค (%) ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน) ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะน้ำท่วม

ชุดการทดลอง	ค่าการเกิดโรค (%)				ค่าความรุนแรงการเกิดโรค (คะแนน)				ค่าน้ำหนักต้นโดยรวม(g/plant)			
	A. niger (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)			
	ไม่ใส่ *A. niger*	10^{2}	10^{3}	10^{4}	ไม่ใส่ *A. niger*	10^{2}	10^{3}	10^{4}	ไม่ใส่ *A. niger*	10^{2}	10^{3}	10^{4}
ชุดควบคุม(ไม่ใส่เชื้อ)	0 ± 0.00^{d}	–	–	–	0 ± 0.00^{d}	–	–	–	0.95 ± 0.46^{cd}	–	–	–
ชุดควบคุม(*A.niger*)	–	16.66 ± 0.00^{bcd}	16.66 ± 0.00^{bcd}	33.33 ± 0.58^{abcd}	–	0.67 ± 0.00^{bcd}	0.67 ± 0.00^{bcd}	1.33 ± 0.58^{abcd}	–	1.39 ± 0.17^{abcd}	1.20 ± 0.24^{bcd}	1.09 ± 0.04^{bcd}
Sut9-2	0 ± 0.00^{d}	0.00 ± 0.00^{d}	0.00 ± 0.58^{d}	8.33 ± 0.00^{cd}	0 ± 0.00^{d}	0.00 ± 0.00^{d}	0.00 ± 0.58^{d}	0.33 ± 0.00^{cd}	1.70 ± 0.11^{abcd}	2.16 ± 0.87^{a}	1.49 ± 0.03^{abcd}	0.90 ± 0.03^{d}
A20	0 ± 0.00^{d}	50.00 ± 0^{abcd}	50.00 ± 0^{abc}	50.00 ± 0.00^{abcd}	0 ± 0.00^{d}	1.67 ± 0.00^{abc}	1.67 ± 0.00^{abc}	1.67 ± 0.00^{abc}	1.20 ± 0.14^{bcd}	1.47 ± 0.21^{abcd}	1.40 ± 0.19^{abcd}	1.10 ± 0.12^{abcd}
Sut9-2+A20	0 ± 0.00^{d}	8.33 ± 0.58^{cd}	16.66 ± 0.58^{bcd}	25.00 ± 0.00^{abcd}	0 ± 0.00^{d}	0.33 ± 0.58^{cd}	0.67 ± 0.58^{bcd}	1.00 ± 0.00^{abcd}	1.46 ± 0.22^{abcd}	1.86 ± 0.14^{ab}	1.27 ± 0.18^{bcd}	1.36 ± 0.10^{bcd}
Carbendazim	0 ± 0.00^{d}	16.55 ± 0.58^{bcd}	16.55 ± 0.58^{bcd}	8.33 ± 0.00^{cd}	0 ± 0.00^{d}	0.66 ± 0.58^{bcd}	0.66 ± 0.58^{bcd}	0.33 ± 0.00^{cd}	1.44 ± 0.02^{abcd}	1.48 ± 0.19^{abcd}	1.73 ± 0.03^{abc}	1.38 ± 0.15^{abcd}
Sut9-2+Carbendazim	0 ± 0.00^{d}	25.00 ± 1.73^{abcd}	25.00 ± 1.73^{abcd}	33.33 ± 1.53^{abcd}	0 ± 0.00^{d}	1.00 ± 1.73^{abcd}	1.00 ± 1.73^{abcd}	1.33 ± 1.53^{abcd}	1.06 ± 0.16^{bcd}	1.72 ± 0.16^{abc}	1.38 ± 0.25^{abcd}	1.09 ± 0.12^{bcd}
Sut9-2+Carbendazim+A20	–	50.00 ± 1.73^{abc}	58.33 ± 1.53^{ab}	66.67 ± 1.15^{a}	–	1.67 ± 1.73^{abc}	2 ± 1.53^{ab}	2.34 ± 1.15^{a}	–	1.39 ± 0.15^{abcd}	1.36 ± 0.25^{abcd}	1.40 ± 0.21^{abcd}

ตารางที่ 4 ตาราง ANOVA แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant) ค่าจำนวนปม (nodule/plant) ค่าน้ำหนักปมแห้ง (g/plant) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง CRD ที่ความเชื่อมั่น 95% ในสภาวะน้ำท่วม

ชุดการทดลอง	ค่าการกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmol C_2H_4/hour/plant)				ค่าจำนวนปม (nodule/plant)				ค่าน้ำหนักปม (mg/plant)			
	A. niger (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)				*A. niger* (spores/ml/seed)			
	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4	ไม่ใส่ *A. niger*	10^2	10^3	10^4
ชุดควบคุม(ไม่ใส่เชื้อ)	0 ± 0.00^{f}	–	–	–	0 ± 0.00^{g}	–	–	–	0 ± 0.00^{g}	–	–	–
ชุดควบคุม(*A.niger*)	–	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	–	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	–	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}
Sut9-2	3.67 ± 0.58^{bc}	2 ± 1^{bcdef}	2.33 ± 2.31^{bcde}	1.67 ± 0.57^{def}	107.16 ± 21.64^{a}	78.50 ± 40.83^{abcd}	26.33 ± 6.84^{efg}	9.16 ± 2.18^{fg}	56.77 ± 12.02^{abc}	53.33 ± 29.06^{abcd}	6.77 ± 3.33^{g}	13.33 ± 3.33^{efg}
A20	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}
Sut9-2+A20	6.67 ± 1.53^{a}	3.33 ± 0.58^{bcd}	2.67 ± 1.16^{bcde}	$3.33\pm.58^{bcd}$	73.33 ± 17.38^{abcd}	100.00 ± 11.54^{ab}	39.00 ± 5.61^{defg}	63.66 ± 9.33^{bcde}	70.00 ± 10.00^{a}	70.00 ± 10.00^{a}	$30.0\pm10.00^{cd-g}$	$43.33\pm8.82^{ab-e}$
Carbendazim	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{f}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}	0 ± 0.00^{g}
Sut9-2+Carbendazim	3.33 ± 1.53^{bcd}	6.67 ± 2.31^{a}	2.33 ± 1.53^{bcde}	4 ± 1.73^{b}	26.83 ± 3.16^{efg}	24.50 ± 5.63^{efg}	41.00 ± 4.36^{defg}	69.50 ± 15.66^{abcd}	23.33 ± 3.33^{cefg}	20.00 ± 5.77^{efg}	$26.77\pm3.33^{cd-g}$	$40.00\pm5.77^{ab-e}$
Sut9-2+Carbendazim+A20	–	3.33 ± 1.53^{bcd}	1 ± 1^{ef}	1 ± 0^{ef}	–	89.16 ± 17.36^{abc}	86.00 ± 25.72^{abc}	49.66 ± 21.16^{cdef}	–	53.33 ± 12.02^{abcd}	63.33 ± 23.33^{ab}	$36.7\pm12.02^{bc-f}$

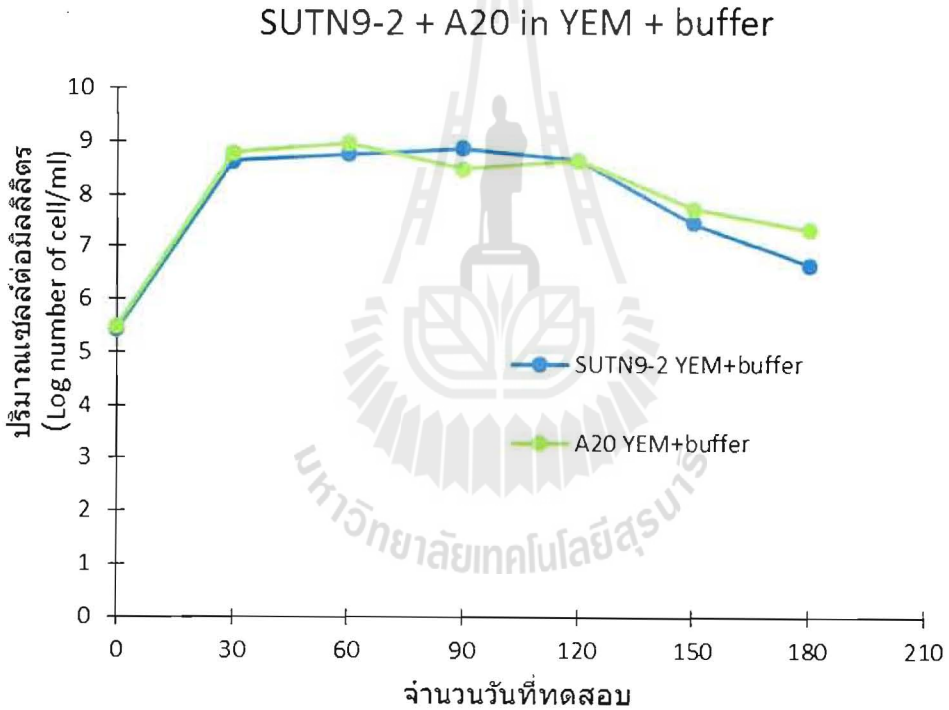
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 สูตรอาหารที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อบาซิลลัส

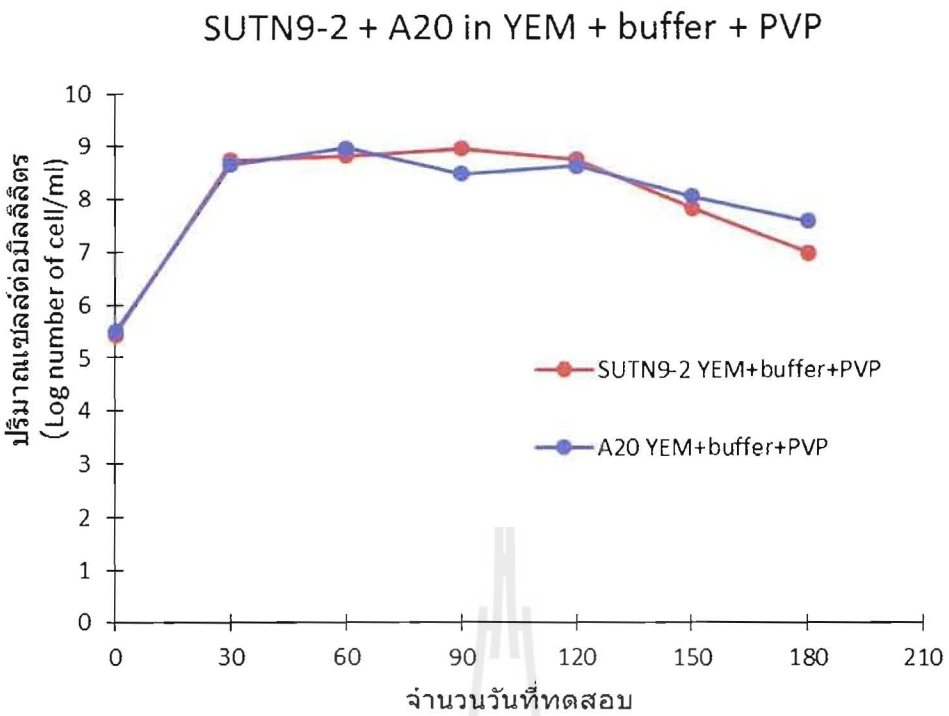
จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเชื้อบาซิลลัส A20 เมื่อใช้ร่วมกับเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าจากเชื้อรา *A. niger* และเชื้อไรโซเบียมสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีภายใต้สภาวะน้ำท่วม ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงภายใต้สถานการณ์น้ำท่วม โดยการผลิตในลักษณะ co-inoculation ซึ่งเป็นการนำเชื้อ 2 ชนิดมาผสมกันเพื่อให้สะดวกต่อเกษตรกรในการนำไปใช้จริงในสภาพไร่ โดยทำการทดสอบการเจริญ การมีชีวิตอยู่รอดในอาหารเหลว และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* เพื่อตรวจสอบอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อเป็นระยะเวลา 6 เดือน ที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้ได้ทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ในอาหาร YEM และเลี้ยงเชื้อบาซิลลัส A20 ในอาหาร NB จนกระทั่งเซลล์เจริญมีปริมาณถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำเชื้อทั้งสองชนิดนี้ไปล้างในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) แล้วผสมกันในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็น starter ในการ inoculate ลงในอาหารทดสอบ ซึ่งใช้อาหาร YEM เป็นพื้นฐาน เนื่องจากเชื้อบาซิลลัส A20 สามารถเจริญในอาหาร YEM ได้ดี โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเติมสาร K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เพื่อเป็น buffer ในการรักษาระดับ pH ของอาหารในระหว่างการเก็บรักษาจะช่วยให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มมากขึ้น (นันทกร และคณะ, 2552) ในขณะที่เปรียบเทียบสูตรอาหารระหว่างการใช้และไม่ใช้สาร PVP ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ช่วยในการดูดซับสารพิษที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเชื้อ รวมทั้งมีคุณสมบัติ colloidal เพื่อช่วยให้เชื้อแบคทีเรียจับกันและแขวนลอยในอาหารได้มากขึ้นโดยไม่ตกตะกอนอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลดีในระยะยาวที่ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและออกซิเจนระหว่างอาหารสู่เซลล์ดีขึ้น และทำให้อายุการเก็บรักษาของเซลล์นานมากขึ้น (Tittabutr et al., 2007) ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่าเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 และเชื้อบาซิลลัส A20 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี YEM เป็นสูตรพื้นฐาน โดยมีปริมาณเซลล์ของเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นที่ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และยังคงรักษาระดับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไว้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ถึง 4 เดือน เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อผสมนี้ไว้ ณ อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ของทั้งเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 และเชื้อบาซิลลัส A20 ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อมีอายุการเก็บรักษาที่ 5 เดือน และเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 มีปริมาณลดลงเหลือน้อยกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน ในอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสาร PVP (รูปที่ 11) ในขณะที่ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีแนวโน้มดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสาร PVP โดยยังคงรักษาปริมาณเซลล์ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้เมื่อมีอายุการเก็บรักษา 5 เดือน (รูปที่ 12) อย่างไรก็ตามทั้งสองสูตรอาหารไม่สามารถรักษาระดับของเซลล์ที่มีชีวิตไว้ได้มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 เดือน

ในระหว่างการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละเดือน ได้นำหัวเชื้อผสมมาตรวจสอบความสามารถในการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 กับถั่วลิสง โดยเทคนิค Plant Infection Count และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ของเชื้อบาซิลลัส A20 ในรูปแบบของหัวเชื้อผสม โดยเทคนิค Dual culture test ซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ยังมีความสามารถในการเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ดี โดยจำนวนปมที่เกิดขึ้นลดลงไปตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อไรโซเบียม ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา A.

niger ของเชื้อบาซิลลัส A20 ยังคงทำงานได้ดีแม้จำนวนเซลล์ของเชื้อบาซิลลัส A20 ในอาหารสูตรต่าง ๆ ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอายุการเก็บรักษา ณ เดือนที่ 5 และ เดือนที่ 6 (รูปที่ 13 และ รูปที่ 14) โดยความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีหรือไม่มีการเติมสาร PVP ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหัวเชื้อที่ผลิตในรูปแบบหัวเชื้อผสมนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 และเชื้อบาซิลลัส A20 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสง และการยับยั้งการเกิดโรครากเน่าภายใต้การปลูกในสภาวะน้ำท่วม ทำการทดสอบเชื้อในระดับ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด ดังนั้นการนำหัวเชื้อผสมที่ทำการเก็บรักษาในสูตรอาหารที่ได้จากงานวิจัยนี้จะต้องนำไปใช้ภายในระยะเวลา 4 เดือน เพื่อให้แน่ใจว่ายังมีปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด เมื่อนำไปใช้และอาจต้องเผชิญกับสภาวะน้ำท่วม



รูปที่ 11 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในหัวเชื้อรูปแบบผสม ณ อายุการเก็บรักษาที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้สูตรอาหาร YEM+buffer (ไม่มีการเติม PVP)



รูปที่ 12 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ในหัวเชื้อรูปแบบผสม ณ อายุการเก็บรักษาที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้สูตรอาหาร YEM+buffer (มีการเติม PVP)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 13 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* โดยหัวเชื้อรูปแบบผสม (SUTN9-2 + A20) ณ ที่อายุการเก็บรักษา 5 เดือน; (A) เชื้อรา *A. niger* (control); (B) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่ไม่เติม PVP; (C) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่เติม PVP

รูปที่ 14 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* โดยหัวเชื้อรูปแบบผสม (SUTN9-2 + A20) ณ ที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน; (A) เชื้อรา *A. niger* (control); (B) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่ไม่เติม PVP; (C) เชื้อรา *A. niger* และเชื้อหัวเชื้อรูปแบบผสมในสูตรอาหารที่เติม PVP

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุปการทดลอง

จากการทดลองเพื่อปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรครากเน่าในถั่วลิสงภายใต้สถานการณ์น้ำท่วม ได้นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมและส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม และเชื้อ *Bacillus megaterium* A20 ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* มาทดสอบคุณสมบัติในการเจริญร่วมกัน โดยผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดเจริญร่วมกันได้โดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน และเชื้อทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับรากถั่วลิสงได้ดีแม้ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขัง โดยปริมาณของเชื้อไรโซเบียมที่ระดับมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายสภาวะน้ำท่วมขังได้ และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในสภาวะน้ำท่วมขัง พบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ร่วมกับเชื้อบาซิลลัส A20 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีเทียบเท่ากับการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับสารเคมี carbendazim ที่เป็นสารกำจัดเชื้อรา โดยปริมาณเชื้อราที่เชื้อบาซิลลัสสามารถควบคุมได้จะอยู่ในช่วง 10^2-10^4 สปอร์ต่อเมล็ด นอกจากนี้ยังได้พัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบหัวเชื้อผสม ซึ่งพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้โดยใช้อาหารพื้นฐาน YEM ที่มีการเติม buffer และสาร PVP ซึ่งสามารถทำให้เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณอยู่รอดได้มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ณ ที่อายุการเก็บรักษา 4 – 5 เดือน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการยับยั้งการเชื้อรา A. niger ยังคงมีอยู่แม้จำนวนเซลล์จะลดลงเหลือน้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ณ ที่อายุการเก็บรักษา 5 และ 6 เดือน อย่างไรก็ดีเพื่อให้เกิดความแน่ใจในการเข้าสร้างปม การส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสง และการป้องกันการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วม ควรใช้หัวเชื้อที่พัฒนาในรูปแบบหัวเชื้อผสมนี้ภายในอายุการเก็บรักษาที่ 4 เดือน โดยงานวิจัยนี้มีประโยชน์มากในการนำไปใช้กับเกษตรกรที่มีการปลูกถั่วลิสงแบบอินทรีย์ ซึ่งจะเป็นการลดการใช้สารกำจัดเชื้อรา ซึ่งมีความปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

นันทกร บุญเกิด, หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง. 2552. การพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2554, ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อ PGPR (*Bacillus megaterium* สายพันธุ์ A20) ต่อการใช้กับหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Aspergillus flavus* สำหรับถั่วลิสง, หนังสือรับรองการแจ้งข้อมูลความลับทางการค้า. เลขที่ อก. 5833.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2556, หัวเชื้อไรโซเบียม SUT9-2 สำหรับปลูกถั่วลิสงในสถานการณ์น้ำท่วมขัง, หนังสือรับรองการแจ้งข้อมูลความลับทางการค้า. เลขที่ พก. 970.

Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Mol Plant Microbe Interact 20:619–626.

A.R. Podile, G.K. Kishore, "Biological control of peanut diseases". S.S. Gnanamanickam (Ed.), Biocontrol of major crop diseases, Marcel Dekker, USA (2002), pp. 131–160.

B.W. Horn, R.L. Greene, V.S. Sobolev, J.W. Dorner, J.H. Powell, R.C. Layton, 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups *in Aspergillus flavus, A. parasiticus*, and *A. tamari*. Mycologia, 88, pp. 574–587.

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

Castro, S., Vinocur, M., Permigiani, M., Halle, C., Taurian, T., Fabra, A., 1997. Interaction of the fungicide mancozeb and *Rhizobium* sp. in pure culture and under field conditions. Biol. Fertil. Soils 25, 147–151.

Hashim M., Roberts J.A., Rossall S., Dickinson M.J., 1997. Leaflet abscission and phytoalexin production during the response of two faba bean breeding lines to Botrytis infection. Plant Pathology 46:
989-996.

Idris EES, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, 20(6): 619-626.

Haggag, W.M. and S. Timmusk, 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. J. Applied Microbiol., 104: 961-969.

Lugtenberg, B. J. J., de Weger, L. A., and Bennett, J. W. 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. Curr. Opin. Biotechnol. 2:457-464.

Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, NewYork. pp. 7-23

T. Pass, G. J. Griffin, 1972. Exogenous carbon and nitrogen requirements for conidial germination by *Aspergillus flavus*, Canadian Journal of Microbiology, 18(9): 1453-1461.

Tittabutr, P., Payakapong, Teaumroong, W. N., Singleton, P. W., & Boonkerd, N. (2007). Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. Science Asia, 33, 69-77.

Watcharin Yuttavanichakul, Pruksa Lawongsa, Sopone Wongkaew, Neung Teaumroong, Nantakorn Boonkerd, Nobuhiko Nomura,and Panlada Tittabutr, 2012. Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger* Biological Control, 87-97

Zeidan, M. Noga Sikron, Cohen, J. and Gera, A. (2000). Improved detection of petunia vein clearing *Caulimovirus. HotScience* 35 (7), 1279-1282.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี