



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 2

เรื่อง การประเมินเชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย

เพื่อการควบคุมแบบชีววิธีและป้องกันโรคใบขาวอ้อย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.ดร.ชลิดา เล็กสมบูรณ์

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รศ.สุภาพร กลิ่นคง

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รศ.ดร.เรวัต เลิศฤทัยโยธิน

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดโครงการ นวัตกรรมตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สัญญาเลขที่ RDG5750035
โครงการย่อยที่ 2 “การประเมินเชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย
เพื่อการควบคุมแบบชีววิธีและป้องกันโรคใบขาวอ้อย”

รายงานฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การประเมินเชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย
เพื่อการควบคุมแบบชีววิธีและป้องกันโรคใบขาวอ้อย
(ภาษาอังกฤษ) Assessment of sugarcane root colonizing and endophytic
bacteria for biocontrol and prevention of sugarcane white
leaf disease

ชื่อผู้วิจัย นางสาวชลิดา เล็กสมบูรณ์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 034-351890/034-351890 **E-mail** agrchl@ku.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

งบประมาณที่ได้รับ 396,000 บาท **ระยะเวลาทำการวิจัย** 12 เดือน

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ เดือนสิงหาคม 2557 ถึง เดือนกรกฎาคม 2558

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2558

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1.1 เพื่อแยกแบคทีเรียอ้อย ที่เป็นแบคทีเรียครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย

2.1.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืช และ
การผลิตสารกลุ่มที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา

2.1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการสร้างความต้านทานโรคใบขาว
ให้กับอ้อย

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่แท้จริง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลา ตามแผน	ช่วงระยะเวลา ที่แท้จริง	ข้อชี้แจง
1. เพื่อแยก แบคทีเรียอ้อย ที่เป็นแบคทีเรีย ครอบครอง บริเวณรากและ ภายในอ้อย	1.1 เก็บดินและต้นอ้อย จากแหล่งปลูกอ้อย ภาคกลาง ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ส.ค.57-ก.ค.58	ส.ค.57-ก.ค.58	
	1.2 แยกแบคทีเรียจากดิน และต้นอ้อย	ส.ค.57-ก.ค.58	ส.ค.57-ก.ค.58	

2. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ	2.1 ทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียอ้อย ดังนี้ - การผลิต IAA (indole 3-acetic acid) - การละลายโพแทสเซียมและฟอสเฟต - การตรึงไนโตรเจน	ก.ย.57-ก.ค.58	ก.ย.57-ก.ค.58	
3. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการผลิตสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ	3.1 คัดเลือกเชื้อที่จะใช้เป็นเชื้อทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น tetracycline 3.2 ทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียอ้อยในการสร้างสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา	ก.ย.57-ก.ค.58	ก.ย.57-ก.ค.58	

2.3 ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริงในรายงานครั้งก่อนหน้า
สรุปงานก่อนหน้า (6 เดือน)

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100% ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ)
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
ได้ตัวอย่างดินและต้นอ้อยจาก 11 จังหวัด รวมแล้วจำนวน 220 ตัวอย่าง (6 เดือนที่ 1 = 120 ตัวอย่าง 6 เดือนที่ 2 = 100 ตัวอย่าง)	100% (6 เดือน เก็บได้ 130 ตัวอย่าง)	-
ได้แบคทีเรียจากดินและต้นอ้อย ไม่น้อยกว่า 660 ไอโซเลท (6 เดือนที่ 1 ไม่น้อยกว่า 360 ไอโซเลท 6 เดือนที่ 2 ไม่น้อยกว่า 300 ไอโซเลท)	100% (6 เดือน แยกได้ 629 ไอโซเลท)	-

ความก้าวหน้าในงวดนี้ (12 เดือน)

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100% ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ)
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
1. ได้ตัวอย่างดินและต้นอ้อยจาก 11 จังหวัด รวมแล้วจำนวน 220 ตัวอย่าง	100	-
ได้แบคทีเรียจากดินและต้นอ้อย ไม่น้อยกว่า 660 ไอโซเลท	100	-

ทดสอบและรวบรวมแบคทีเรียที่มี คุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช ไม่น้อยกว่า 15 ไอโซเลต	100	-
ทดสอบและรวบรวมแบคทีเรียที่มี คุณสมบัติผลิตสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ ยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา ไม่น้อยกว่า 2 ไอโซเลต	100	-

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี)

.....-

2.5 งบประมาณที่ได้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 355,500 บาท

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ (งวดที่ 1)	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณที่ได้จ่าย (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	9,000	9,000.00
หมวดค่าจ้าง	0	0
หมวดค่าใช้สอย	170,200	121,710.00
หมวดค่าวัสดุ	41,300	49,578.40
รวมทั้งสิ้น	220,500	180,288.40

เงินคงเหลือ $220,500 - 180,288.4 = 40,211.6$ บาท (ขอเกินไปใช้รวมงวดที่ 2)

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ (งวดที่ 2)	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณที่ได้จ่าย (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	4500	4,500.00
หมวดค่าจ้าง	0	0
หมวดค่าใช้สอย	78,200	131,234.00
หมวดค่าวัสดุ	52,300	39,477.60
รวมทั้งสิ้น	135,000	-
ยอดยกมาจากงวดที่ 1	40,211.60	-
รวมทั้งสิ้น	175,211.60	175,211.60

2.6 งานตามแผนโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป -

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข -

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว. -

(ลงนาม)

.....

(รองศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 30 กันยายน 2558

รายละเอียดของผลการดำเนินงาน

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทสรุปผู้บริหาร	7
บทคัดย่อ	8
ABSTRACT	9
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	10
การตรวจเอกสาร	11
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	14
เอกสารอ้างอิง	23

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนตัวอย่าง และจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน บริเวณรากอ้อยและต้นอ้อย จากพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดต่างๆ	17
2	จำนวนแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อย และต้นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดต่างๆ ที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจน (N) การละลายฟอสเฟต (P) และโพแทสเซียม(K)	18
3	เปอร์เซ็นต์การพบแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อย และต้นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อย จังหวัดต่างๆ ที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจน (N) การละลายฟอสเฟต (P) และโพแทสเซียม(K)	20

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของต้นอ้อยและดินบริเวณรากอ้อย ในพื้นที่ปลูกอ้อยที่เก็บตัวอย่าง จังหวัด	7 15
2	ลักษณะของต้นอ้อย (ก) และดินบริเวณรากอ้อย จากพื้นที่ปลูกอ้อยภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ พบดิน 2 ลักษณะ (ข และ ค)	15
3	ลักษณะของต้นอ้อย จากพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดลพบุรี เขตอำเภอโคกสำโรง (ก และ ข) อำเภอชัยบาดาล (ค และ ง) และ อำเภอลำลูกเกด (จ และ ฉ)	16
4	การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับ ห้องปฏิบัติการบนอาหารทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ข) การ ละลายฟอสเฟต (ค) และโพแทสเซียม (ง) เมื่อเทียบกับการเจริญของเชื้อในชุด ควบคุมบนอาหาร nutrient glucose agar (ก)	21
5	การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole 3-acetic acid (IAA) โดยเกิดสีชมพู เมื่อเติมสารทดสอบ	21
6	การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจากดินและต้นอ้อยในการผลิตสารที่มี คุณสมบัติในการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการโดย ใช้เชื้อทดสอบที่ไวต่อสารเตตราซัยคลิน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion	22

การประเมินเชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย
เพื่อการควบคุมแบบชีววิธีและป้องกันโรคใบขาวอ้อย
Assessment of sugarcane root colonizing and endophytic bacteria for biocontrol
and prevention of sugarcane white leaf disease

ชลิดา เล็กสมบุญ สุภาพร กลั่นคง และ เรวัต เลิศฤทัยโยธิน
Chalida Leksomboon, Supaporn Klinkong and Rewat Lertsrutaiyotin

บทสรุปผู้บริหาร

โรคใบขาวอ้อยจัดว่าเป็นโรคที่สำคัญอันดับหนึ่งของอ้อย เนื่องจากระบาดทำความเสียหายมาก และกว้างขวาง โรคใบขาวสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย ซึ่งการควบคุมโรควิธีที่ดีที่สุดได้แก่การใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย แต่ยังไม่มียางานถึงความสำเร็จ ดังนั้น การสร้างความต้านทานให้กับพืช จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ การใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตามธรรมชาติ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยครอบครองอยู่บริเวณรากพืช หรือภายในต้นพืช และสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค กระตุ้นให้พืชผลิตสารที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การใช้แบคทีเรียในการสร้างความต้านทานให้กับพืชเป็นวิธีการที่ยั่งยืนตั้งแต่การเพาะปลูกจนเก็บเกี่ยว และเป็นมิตรกับ สิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ภายในต้นอ้อยและบริเวณรากอ้อยที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญ รวม 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร นครราชสีมา อุดร ขอนแก่น และบุรีรัมย์ รวมทั้งหมด 220 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียภายในอ้อย จำนวน 401 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากอ้อย เป็นจำนวน 558 ไอโซเลท รวมแยกได้เชื้อแบคทีเรียอ้อย 959 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต และมีคุณสมบัติในการละลายโพลีแซคคาไรด์ จำนวน 503, 480 และ 230 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่แสดงผลเป็นบวกมาทดสอบพบว่า 43 ไอโซเลทสามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion โดยใช้เชื้อที่ไวต่อสารเตตราไซคลินเป็นเชื้อทดสอบแทนเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จากแบคทีเรียทั้งหมด 959 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลท ที่แยกจากดินบริเวณรากพืช แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเตตราไซคลิน และไม่มีแบคทีเรียจากต้นที่แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ไปตรวจสอบการผลิตสารเตตราไซคลิน โดยวิธี high performance liquid chromatography พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารเตตราไซคลิน จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทำการตรวจสอบการสร้างสาร surfactin ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* และเป็นชีวภัณฑ์ลดแรงตึงผิวที่สามารถยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมา จากการตรวจสอบ เบื้องต้นกับแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค drop-collapse พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสาร surfactin ทั้งนี้ จะต้องนำไอโซเลทที่แสดงศักยภาพไปทดสอบต่อกับอ้อย เพื่อทราบประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคใบขาวของอ้อยต่อไป

บทคัดย่อ

โรคใบขาวอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา (*Candidatus Phytoplasma*) เป็นโรคอ้อยที่มีความสำคัญมากที่สุดในประเทศไทย และยังคงเป็นปัญหากับผู้ปลูกอ้อยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือก และตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียบริเวณรากที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช และแบคทีเรียภายในพืชเพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย โดยทำการแยกแบคทีเรียได้จำนวน 558 และ 401 จากดินบริเวณราก และจากต้นอ้อยใน 11 จังหวัด ได้แก่ ลพบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร นครราชสีมา อุดรธานี ขอนแก่น และชัยภูมิ นำแบคทีเรียทุกไอโซเลตทดสอบความสามารถในการผลิตสาร ปลูกชีวนะเตตราซัยคลิน และการส่งเสริมการเจริญของพืช จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 959 ไอโซเลต พบว่า 503 ไอโซเลต สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนได้ แบคทีเรียจำนวน 480 และ 230 ไอโซเลต สามารถละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลตที่แสดงผลเป็นบวกมาทดสอบพบว่า 43 ไอโซเลต สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารปลูกชีวนะใช้วิธี paper disc agar diffusion พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลตที่แยกจากดินบริเวณรากพืช แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเตตราซัยคลิน และไม่มีแบคทีเรียจากต้นที่แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ไปตรวจสอบการผลิตสารเตตราซัยคลินโดยวิธี high performance liquid chromatography พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ไม่สามารถผลิตสารเตตราซัยคลิน จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทำการตรวจสอบการสร้างสาร surfactin ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์ลดแรงตึงผิวที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อไฟโตพลาสมา จากการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค drop-collapse พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตสาร surfactin อย่างไรก็ตาม จะต้องนำไอโซเลตที่แสดงศักยภาพไปทดสอบต่อกับพืชเพื่อทราบประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคใบขาวอ้อย

คำสำคัญ: โรคใบขาวอ้อย แบคทีเรียบริเวณรากที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช แบคทีเรียภายในพืช

ABSTRACT

Sugarcane white leaf (SCWL) disease caused by plant pathogenic phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma*) consider to be the most important disease of sugarcane in Thailand and continue to be severe problems to sugarcane grower, especially in northeastern Thailand. The objective of this research was to screen and determine the ability of plant growth promoting rhizobacteria and endophytic bacteria to control SCWL disease. The 558 and 401 bacteria were isolated from rhizospheric soil and sugarcane stalks in eleven provinces of Thailand, Lop Buri, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Ratchaburi, Kanchanaburi, Nakhon Sawan, Kamphaeng Phet, Nakhon Ratchasima, Udon Thani, Khon Kaen and Chaiyaphum. All isolates were screened for the ability to produce tetracyclines and growth promoting activity *in vitro*. A total of 959 isolates, 503 isolates were able to grow on nitrogen free medium. The 480 and 230 isolates indicated as solubilizer of phosphorus and potassium, respectively. Forty three of which positively isolates exhibited phytohormone (IAA) synthesis. To screen for *in vitro* antibiotic activity, the tested bacteria (tetracyclines sensitive strain) were conducted by paper disc agar diffusion. Only eighteen rhizospheric bacterial isolates showed *in vitro* antagonism against the tetracyclines sensitive strain, whereas none of stalk endophytes isolated inhibited growth of the tester. Among these, twelve isolates were determined tetracyclines production by high performance liquid chromatography. The result revealed that all twelve isolates could not produce tetracyclines. Furthermore, 25 isolates of *Bacillus subtilis*-like colony were used to screen the surfactin production. Surfactin is produced by *B. subtilis* and known as one of the most powerful biosurfactants with antimicrobial properties, including anti-phytoplasma activity. The surfactin production assays was performed by drop-collapse method. The results showed that three isolates could produce surfactin. However, potential isolates needs further test *in vivo* to uncover their efficacy as effective bacteria to control SCWL disease.

Keywords: sugarcane white leaf disease, plant growth promoting rhizobacteria, endophytic bacteria

บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย พื้นที่ปลูก ส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคเหนือ ภาคกลางและ ตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้อมูลจากสำนักงาน เศรษฐกิจการเกษตร พบว่าในปี 2555 มีเนื้อที่เก็บเกี่ยวทั้งประเทศประมาณ 8 ล้านไร่ ผลผลิตมากกว่า 95 ล้านตัน (<http://www.oae.go.th/>) ประเทศไทยมีการส่งออกน้ำตาลดิบคิดเป็นมูลค่า 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี ปัจจุบันการผลิตอ้อยนอกจากใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมน้ำตาล ยังมีการนำไปใช้ผลิต เอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน การเพิ่มผลผลิตโดยไม่เพิ่มพื้นที่ปลูก ทำได้โดยการจัดการระบบการ ปลูกและการใช้พันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตสูง ปัญหาด้านโรคที่เกิดกับอ้อยเป็นปัญหาสำคัญในการผลิต เนื่องจากอ้อยมีโรคมมากกว่า 30 โรค (ธนากร และคณะ, 2526) โรคหลายชนิดมีความสำคัญและทำให้

สูญเสียผลผลิต ดังนั้น จะต้องเฝ้าระวังการระบาดของโรคประเภทนี้ โรคใบขาวอ้อยจัดว่าเป็นโรคที่สำคัญอันดับหนึ่งของอ้อย เนื่องจากระบาดทำความเสียหายมาก และกว้างขวาง โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ยากที่จะทำการป้องกันกำจัด หลังจากที่ยพบโรคนี้ 1 ปี (พ.ศ. 2499) มีรายงานว่าที่จังหวัดลำปางมีโรคใบขาวระบาดทำความเสียหาย 500 ไร่ อีก 6-7 ปีต่อมา (พ.ศ. 2505-2506) ระบาดเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า ในปัจจุบันความเสียหายเพิ่มขึ้น โดยในปี 2554 มีพื้นที่โรคระบาดกว่า 100,000 ไร่ ผลผลิตเสียหายกว่า 1700 ล้านบาท โรคใบขาวสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย โดยอาการจะปรากฏให้เห็นได้ชัดเจนในระยะกล้า อ้อยแตกกอฝอยมีหน่อเล็ก ๆ ที่มีใบสีขาวจำนวนมาก คล้ายกอหญ้า หน่อไม่เจริญเป็นลำ หากอาการโรครุนแรงอ้อยจะแห้งตายทั้งกอในที่สุด หาก หน่ออ้อยในกอเจริญเป็นลำได้ ลำอ้อยที่ได้จะไม่สมบูรณ์ อาจมีใบขาวที่ปลายยอด หรือมีหน่อขาวเล็ก ๆ งอกจากตาข้างของลำ บางครั้งอาการของโรคจะมีลักษณะแฝง พบเสมอในอ้อยปลูกปีแรก โดยอ้อยเป็นโรคเจริญเติบโตเป็นลำ และมีใบสีเขียวคล้ายอ้อยปกติ มีเพียงหน่อขาวเล็ก ๆ ที่โคนกอ แต่อาการโรคจะปรากฏให้เห็นได้ชัดเจนในอ้อยต่อในระยะเวลาต่อมา รวมทั้งแหล่งระบาดที่สำคัญของโรค เมื่อนำอ้อยที่มีอาการแฝงคล้ายอ้อยปกติดังกล่าวไปปลูกต่อก็จะทำให้โรคระบาดต่อไปได้อย่างกว้างขวาง อาการของโรคปรากฏทั้งบนอ้อยปลูก และอ้อยต่อบางครั้งพบว่าอ้อยเป็นโรคตั้งแต่เริ่มปลูก (<http://oldweb.ocsb.go.th/udon/Udon12/03/03.08.htm>) โรคใบขาวของอ้อยแพร่ระบาดโดยมีเชื้อติดไปกับท่อนพันธุ์อ้อย นอกจากนี้ ยังมีแมลงเป็นพาหะ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ *Epitetix hiroglyphicus* หรือ *Matsumuratettix hiroglyphicus* และ *Cicadulina bipunctella* เป็นแมลงพาหะ ที่ถ่ายทอดเชื้อจากกออ้อยที่เป็นโรคไปยังกออ้อยปกติ โดยพบจำนวนมากในช่วงฤดูฝน แนวทางการควบคุมโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ การควบคุมแมลงพาหะ การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรค และการใช้พันธุ์ต้านทานโรค ซึ่งการควบคุมโรควิธีที่ดีที่สุดได้แก่การใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย แต่ยังไม่มีความสำเร็จ ในการปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์ทำให้เกิดโรคระบาดอย่างต่อเนื่อง และพบว่าพันธุ์อ้อยสะอาดที่ปลอดจากโรคใบขาวนั้นหาได้ยากในแปลงปลูกอ้อย จึงมีการวิจัยใช้วิธีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อโดยการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยอดอ่อน แต่เมื่อนำไปปลูกก็ประสบปัญหาการเกิดโรคในภายหลัง เนื่องจากมีแมลงพาหะ ที่ถ่ายทอดเชื้อ ดังนั้น การสร้างความต้านทานให้กับพืช จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ โดยวิธีการสร้างความต้านทานให้กับพืชที่มีรายงานไว้นั้น มีหลายวิธี เช่น การใช้สารเคมีในการกระตุ้น ให้พืชสร้างความต้านทาน การเพิ่มธาตุอาหารบางชนิดให้แก่พืช และอีกวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ ได้แก่ การใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตามธรรมชาติ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยครอบครองอยู่บริเวณรากพืช หรือภายในต้นพืช และสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ผลผลิตสารที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค กระตุ้นให้พืชผลิตสารที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การใช้แบคทีเรียในการสร้างความต้านทานให้กับพืชเป็นวิธีการที่ยั่งยืนตั้งแต่การเพาะปลูกจนเก็บเกี่ยว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ควบคุมและป้องกันโรคใบขาวอ้อย โดยการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ในด้านการส่งเสริมการเจริญของพืช การควบคุมโรค และการสร้างความต้านทานให้กับอ้อย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกแบคทีเรียอ้อย ที่เป็นแบคทีเรียครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อย
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืช และ การผลิตสารกลุ่มที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา
3. ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการสร้างความต้านทานโรคใบขาวให้กับอ้อย

การตรวจเอกสาร

คุณลักษณะของแบคทีเรียที่อยู่อาศัยกับพืช และเป็นประโยชน์ในระบบการผลิตพืชมีมากมาย เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ หรือสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน และ siderophore การเปลี่ยนรูปสารหรือธาตุอาหารให้พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการปลูกพืชและเป็นที่รู้จักกันดี ได้แก่ ไรโซเบียมซึ่งช่วยตรึงไนโตรเจนให้แก่พืชตระกูลถั่ว ข้อจำกัดของเชื้อแบคทีเรียพวก Rhizobia ได้แก่ ความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัย เชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มที่เป็นประโยชน์และมีศักยภาพในการนำไปใช้ได้แก่ แบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากพืช (root colonizing bacteria) ซึ่งมีหลายประเภทที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ แบคทีเรีย PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) โดยแบคทีเรีย PGPR เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืช พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถชักนำให้พืชต้านทานโรคหรือทำให้เกิด ISR (Induced systemic resistance) เนื่องจากแบคทีเรีย PGPR มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หลายด้าน นักโรคพืชจึงทำการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ในการชักนำพืชให้ต้านทานโรค ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า การจัดการโรคพืชที่ดีที่สุดคือการใช้พืชที่ต้านทานโรค ข้อดีของแบคทีเรีย PGPR คือ เป็นเชื้อที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และสามารถชักนำให้พืชต้านทานโรคได้อย่างกว้างขวาง ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายๆชนิด เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อรา (Wei และคณะ, 1991; Liu และคณะ, 1995a; Vidhyasekaran และ Muthamilan, 1999; Berg และคณะ, 2001; Pal และคณะ, 2001; Srivastava และคณะ, 2001; Viswanathan และ Samiyappan, 2002; Walker และคณะ, 2002; Zhang และคณะ, 2002) แบคทีเรีย (Alstrom, 1991; Liu และคณะ, 1995b; Wei และคณะ, 1996; Park และ Kloepper, 2000) ไวรัส (Maurhofer และคณะ, 1994; Raupach และคณะ, 1996; Murphy และคณะ, 2000) และไส้เดือนฝอย (Siddiqui และ Mahmood, 1999) การศึกษาทั่วโลกที่ PGPRs สามารถชักนำความต้านทานโรคในพืชต่างๆ โดยเฉพาะกับ PGPR พวก *Pseudomonas fluorescens* พบว่า เกิดจากการสะสมสาร phenolic compounds การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ PR-proteins

นอกจากนี้ ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่ไม่ได้อยู่บริเวณเขตรากพืช ที่สามารถชักนำให้พืชต้านทานโรคและนำมาใช้ในการควบคุมโรค โดย Bashan และ Holguin (1998) เสนอให้ใช้คำว่า PGPB (plant growth promoting bacteria) และ biocontrol-PGPB (biocontrol plant growth-promoting bacteria) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการศึกษากันมากกับพวกแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืช (endophytic bacteria) การศึกษา endophytic bacteria โดย Hollis (1951) พบว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืชและไม่ได้ทำให้พืชเป็นโรค มีการศึกษา endophytic bacteria ในพืชชนิดต่างๆมากมาย ได้แก่ พืชไร่ต่างๆ เช่น พืชอาหารสัตว์ clover (Philipson and Blair, 1957) และ alfalfa (Gagne *et al.*, 1987) พืชไร่อุตสาหกรรม เช่น sugar beet (Jacobs *et al.*, 1985), ฝ้าย (Misaghi and Donndelinger, 1990) พืชผัก เช่น *Brassica* spp. (Agarwal and Shende, 1987), มะเขือเทศ (van Peer *et al.*, 1990) และไม้ผล เช่น cherry trees (Cameron, 1970), ส้ม (Gardner *et al.*, 1982), pear trees (Whitesides and Spotts, 1991), องุ่น (Bell *et al.*, 1995) การศึกษา endophytic bacteria ได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อพบว่า แบคทีเรียพวก endophytic bacteria สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและกระตุ้นกลไกความต้านทานในพืช (Hallmann, 2001)

การศึกษา PGPR ในอ้อยโดย Villegas (2001) ได้ทำการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย และศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญของอ้อยโดยการติดตามเชื้อด้วยวิธีการติดฉลากด้วยยีน *gusA* พบว่า *Pseudomonas fluorescens* ไอโซเลท LV7 ซึ่งสามารถส่งเสริมให้ความสูง น้ำหนักมวลรวมของยอดและราก และความยาวรากเพิ่มขึ้น โดยเชื้อครอบครองอยู่บริเวณเนื้อเยื่อรากอ้อย Viswanathan and Samiyappan (2002) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads จากบริเวณเขตรากอ้อย พบว่า PGPR ที่แยกได้และนำมาทดสอบสามารถชักนำให้อ้อยต้านทานโรคเน่าแฉง โดยทำให้การเกิดโรคลดลง และเห็นผลชัดเจนในอ้อยพันธุ์อ่อนแอโรค

ในประเทศไทยได้มีการคัดเลือกไรโซแบคทีเรียจากอ้อยซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากอ้อยและศึกษาการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวเน่าแฉงของอ้อย (วรารณา และคณะ , 2549) และเมื่อทำการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า ไรโซแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ E7-17 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินบริเวณรากอ้อย สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดี (ชลิดา และ นัฐพร , 2550) และแสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแฉง โดยเมื่อทำการแช่ท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสายพันธุ์ E7-17 พบว่า สามารถควบคุมโรคได้ดี (อัจฉรวรรณ และคณะ , 2553)

การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียเพื่อส่งเสริมการเจริญของอ้อยจากแหล่งปลูกอ้อย 24 จังหวัด และคัดเลือกเชื้อโดยการตรวจสอบ *nifH* gene ในการผลิตเอนไซม์ไนโตรจิเนส (nitrogenase) ซึ่งทำหน้าที่รีดิวส์ไดไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียให้พืชนำไปใช้ในการเจริญ พบว่าตรวจพบยีนดังกล่าว 21.81% จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 1,336 ไอโซเลท และเมื่อคัดเลือกเชื้อ 100 ไอโซเลท นำไปตรวจสอบต่อบนอาหารทดสอบ พบว่า มีเชื้อ 79 และ 49 ไอโซเลท ที่แสดงลักษณะการผลิตสาร siderophore และการละลายฟอสเฟต (พจณา และคณะ, 2555)

การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากอ้อยจาก 22 แปลง ใน 3 อำเภอ 3 จังหวัด ได้แก่ อ. แก่งสนามนาง จังหวัด นครราชสีมา อ. กุมภวาปี จ.อุดรธานี และ อ. เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น แยกได้แบคทีเรียละลายฟอสเฟต จำนวน 19 ไอโซเลท และพบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมละลายฟอสเฟตสูง เมื่อนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง พบว่า การปลูกเชื้อแบคทีเรียร่วมกับการใส่ปุ๋ยหินฟอสเฟต ทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตในทุกด้านและมีการสะสมธาตุฟอสฟอรัสในลำต้นสูงกว่าอ้อยชุดควบคุม (ไตรธานี และคณะ, 2555)

การศึกษาแบคทีเรียที่อยู่อาศัยกับพืชกับโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมา มีรายงานในองุ่น โดยพบว่า endophytic bacteria ลดการเกิดโรคเหลือง (grapevine yellows) ขององุ่น และทำให้องุ่นมีอายุการดีขึ้น (Bulgari et al., 2010)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่าง และแยกแบคทีเรียอ้อย

แยกเชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากอ้อย เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บในจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกอ้อยมากกว่า 500,000 ไร่ และจังหวัดใกล้เคียง รวม 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร นครราชสีมา อุดร ขอนแก่น และชัยภูมิ โดยเก็บจังหวัดละ 10 พื้นที่ สุ่มเก็บ

ตัวอย่างดิน 5 จุดต่อพื้นที่ แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อย ด้วยวิธี soil dilution plate method โดยใช้อาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) สำหรับแยกแบคทีเรียทั่วไป บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน ย้ายเชื้อลงอาหารใหม่ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

การแยกเชื้อแบคทีเรียภายในอ้อยหรือแบคทีเรียชนิดโอฟิตจากตัวอย่างอ้อยโดย เก็บตัวอย่างต้นอ้อยในพื้นที่ปลูกที่สำคัญเช่นเดียวกับตัวอย่างดิน การเก็บต้นอ้อย เก็บแปลงละ 3 ต้น โดยตัดตัวอย่าง 3 ต้น รวมกันก่อนแยกเชื้อและนับเป็น 1 ตัวอย่าง ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 5 นาที จากนั้นใช้มีดที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ปาดเปลือกออก แล้วใช้ cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะในลำอ้อยจากส่วนโคน กลาง และปลาย ลำอ้อย นำชิ้นอ้อยที่เจาะได้ใส่ลงในน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว บดชิ้นอ้อยด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ จากนั้น ทำการแยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate บนอาหาร NGA บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48-72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน ย้ายเชื้อลงอาหารใหม่ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากดิน

2. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืช ในระดับห้องปฏิบัติการ นำแบคทีเรียอ้อยที่แยกได้มาประเมินประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

- การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน

ทดสอบการตรึงไนโตรเจนบนอาหารแข็ง N-free malate medium (Nfb) โดยวิธี point inoculation บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 5 และ 7 วัน เชื้อที่สามารถเจริญได้บนอาหารแสดงถึงความสามารถของแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

- การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต โดยเลี้ยง เชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium (PVK) โดยวิธี point inoculation บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน บันทึกผลการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

- การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายโพแทสเซียม

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายโพแทสเซียมโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Aleksandrov agar medium โดยวิธี point inoculation บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน บันทึกผลการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

- การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต indole 3-acetic acid (IAA)

ศึกษาการผลิต indole 3-acetic acid (IAA) จากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยก โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารทดสอบ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่อยู่ในไมโครเพลท จากนั้นบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าในที่มืด นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยเติม Salkowski 's reagent ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตรวจสเปกตรัมที่เกิดขึ้นแสดงถึงความสามารถในการสร้าง IAA

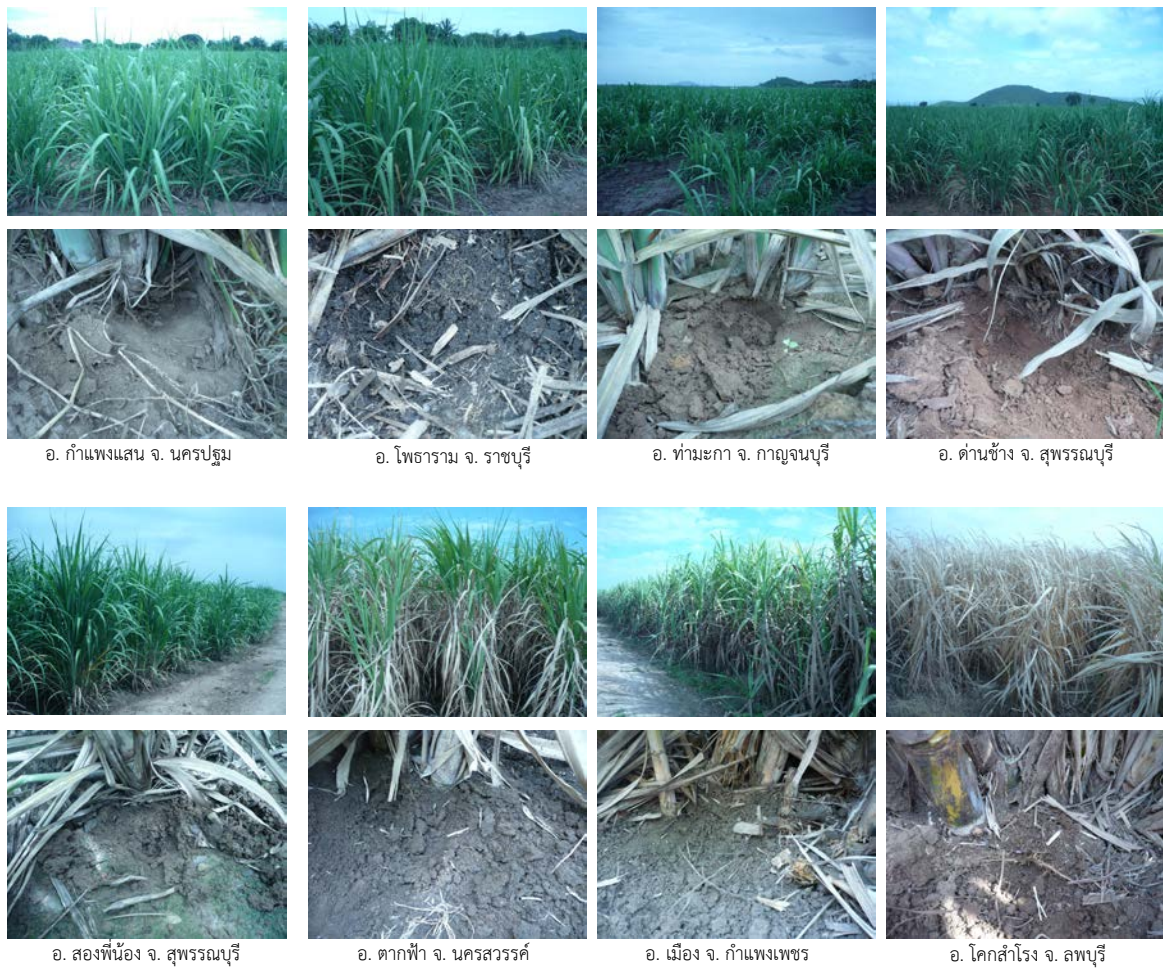
3. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียอ้อยที่แยกได้มาประเมินการสร้างสรรค์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี paper disc agar diffusion โดยใช้แบคทีเรียที่ไวต่อสาร tetracycline เป็นเชื้อตรวจสอบแทนเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยในขั้นแรกทำการคัดเลือกเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งได้โดยสาร tetracycline แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อตรวจสอบได้ นำไปตรวจสอบการผลิตสาร tetracycline โดยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่าง และแยกแบคทีเรียอ้อย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยภาคกลาง และภาคเหนือ รวม 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร (ภาพที่ 1) และได้รับความอนุเคราะห์จากคุณทวีป ศรีวงษ์ โรงงานน้ำตาลวังขนาย ในการเก็บตัวอย่างจากคตวันออกเฉียงเหนือ รวม 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี นครราชสีมา และชัยภูมิ (ภาพที่ 2) รวมตัวอย่างทั้งหมด 11 จังหวัด จังหวัดละ 10 แปลง ได้ตัวอย่างดิน 110 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืช 110 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 220 ตัวอย่าง ในการเก็บตัวอย่างดิน สุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 จุดต่อพื้นที่ แต่ละจุดเก็บดินพร้อมรากอ้อยประมาณ 200 กรัม รวมเป็น 1 กิโลกรัมต่อตัวอย่างต่อพื้นที่ และเก็บตัวอย่างต้นอ้อยในพื้นที่เดียวกับตัวอย่างดิน โดยเลือกเก็บลำอ้อยที่สมบูรณ์ 3 ลำต่อพื้นที่ แยก แบคทีเรียภายในลำอ้อยหรือแบคทีเรีย เอนโดไฟต์จากตัวอย่างอ้อย จากตัวอย่างรวม 11 จังหวัด จังหวัดละ 10 แปลง ได้ตัวอย่างดินและต้นอ้อยรวม 220 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากอ้อย จำนวน 558 ไอโซเลต และแยกได้เชื้อแบคทีเรียภายในอ้อย จำนวน 401 ไอโซเลต รวมแยกได้เชื้อแบคทีเรียอ้อย 959 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างจากทั้ง 11 จังหวัด ตรวจพบเชื้อจากดินบริเวณรากอ้อยมากกว่าเชื้อภายในลำอ้อย ยกเว้นจังหวัดลพบุรี ที่พบเชื้อในลำอ้อยมากกว่าในดิน และพบเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อยในพื้นที่จังหวัดนครปฐมมากที่สุด เป็นจำนวน 81 ไอโซเลต รองลงไปได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 62 ไอโซเลต ส่วนจังหวัดลพบุรี พบเชื้อจากดินน้อยที่สุด จำนวน 24 ไอโซเลต อย่างไรก็ตาม เมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียภายในอ้อย พบเชื้อในลำอ้อยจากนครปฐม เป็นจำนวนน้อยเพียง 26 ไอโซเลต ซึ่งจังหวัดที่พบเชื้อในลำอ้อยน้อยที่สุด ได้แก่ กาญจนบุรี จำนวน 25 ไอโซเลต ส่วนจังหวัดที่พบเชื้อในลำอ้อยมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 64 ไอโซเลต ดังนั้น จังหวัดที่แยกได้เชื้อรวมมากที่สุดคือ สุพรรณบุรี ในการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดสุพรรณบุรีในครั้งนี้ เป็นตัวแทนที่เก็บจากอำเภอสองพี่น้อง และด่านช้าง

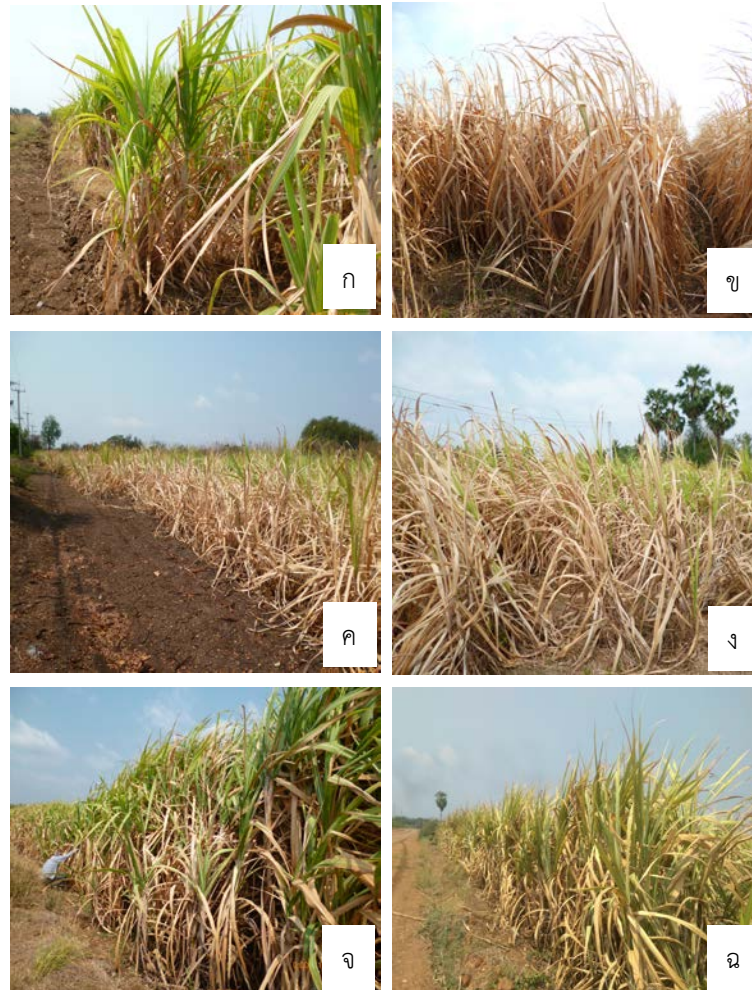


ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นอ้อยและดินบริเวณรากอ้อย ในพื้นที่ปลูกอ้อยที่เก็บตัวอย่าง 7 จังหวัด



ภาพที่ 2 ลักษณะของต้นอ้อย (ก) และดินบริเวณรากอ้อย จากพื้นที่ปลูกอ้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบดิน 2 ลักษณะ (ข และ ค)

การเก็บตัวอย่างพบว่าในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันโดยเฉพาะในพื้นที่ต่างภูมิภาคกัน ทั้งในด้านลักษณะของดิน และพันธุ์อ้อย รวมทั้งอายุอ้อยที่แตกต่างกันด้วย โดยการเก็บตัวอย่างจากลพบุรีเป็นแหล่งสุดท้ายในการวิจัยนี้ ในเดือนมีนาคม 2558 ซึ่งอยู่ในระยะเก็บเกี่ยวอ้อย และเป็นช่วงที่แห้งแล้งมาก (ภาพที่ 3) จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อที่แยกได้จากดินมีปริมาณน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามแม้สภาพดินแห้งและใบอ้อยแห้ง แต่ภายในลำอ้อยไม่แห้ง จึงพบว่าเชื้อแบคทีเรียในลำอ้อยมีปริมาณมาก



ภาพที่ 3 ลักษณะของต้นอ้อย จากพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดลพบุรี เขตอำเภอโคกสำโรง (ก และ ข) อำเภอชัยบาดาล (ค และ ง) และ อำเภอท่าหลวง (จ และ ฉ)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่าง และจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน บริเวณรากอ้อยและต้นอ้อยจากพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	จำนวนแปลง	ดิน		ต้นอ้อย	
		จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลต)
สุพรรณบุรี	10	10	72	10	64
นครปฐม	10	10	81	10	26
ราชบุรี	10	10	48	10	38
กาญจนบุรี	10	10	41	10	25
ขอนแก่น	10	10	58	10	42
อุดรธานี	10	10	57	10	32
นครราชสีมา	10	10	31	10	28
ชัยภูมิ	10	10	43	10	32
นครสวรรค์	10	10	58	10	42
กำแพงเพชร	10	10	45	10	32
ลพบุรี	10	10	24	10	40
รวม	110	110	558	10	401

2. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืช ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อนำแบคทีเรียอ้อยที่แยกได้มาประเมินประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการทดสอบบนอาหารในห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 4) พบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม จำนวน 503, 480 และ 230 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยพบว่า ทั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและภายในอ้อย แสดงคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุด รองลงไปได้แก่คุณสมบัติการละลายฟอสเฟต และการละลายโพแทสเซียม ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่แยกได้จากดินและภายในอ้อย พบว่า เชื้อที่แยกได้จากลำอ้อย มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชจากการทดสอบทั้ง 3 ลักษณะ มากกว่าเชื้อที่แยกได้จากดิน โดยเปอร์เซ็นต์เชื้อจากภายในอ้อยที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม เท่ากับ 58.36, 57.11 และ 33.17 ส่วนเชื้อที่แยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 48.21, 44.98 และ 17.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อย และต้นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดต่างๆ ที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจน (N) การละลายฟอสเฟต (P) และโพแทสเซียม (K)

จังหวัด	แบคทีเรียจากดิน			แบคทีเรียจากต้นอ้อย		
	N	P	K	N	P	K
สุพรรณบุรี	45	30	16	47	38	34
นครปฐม	27	27	5	15	12	2
ราชบุรี	30	21	6	29	16	4
กาญจนบุรี	15	23	6	4	14	8
ขอนแก่น	23	25	0	18	23	10
อุดรธานี	10	31	7	24	19	16
นครราชสีมา	21	22	15	21	18	8
ชัยภูมิ	35	25	14	22	22	8
นครสวรรค์	31	16	8	24	27	17
กำแพงเพชร	30	21	19	18	18	12
ลพบุรี	2	10	1	12	22	14
จำนวนรวม	269	251	97	234	229	133
%	48.21	44.98	17.38	58.36	57.11	33.17

% = $\frac{\text{จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบแต่ละชนิด}}{\text{จำนวนไอโซเลตเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจาก 220 ตัวอย่าง}} \times 100$

จากจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในแต่ละจังหวัด พบว่าเปอร์เซ็นต์การพบแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อยที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจนมีมากกว่าลักษณะอื่นๆ ยกเว้นจากจังหวัดกาญจนบุรี ขอนแก่น อุดรธานี และนครราชสีมา (ตารางที่ 3) โดยเฉพาะจากอุดรธานี พบว่าเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตมีปริมาณมากกว่าเชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจน และเมื่อเปรียบเทียบกับทุกจังหวัด พบว่าจากอุดรธานีมีจำนวนไอโซเลตที่สามารถละลายฟอสเฟตมากที่สุด อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ ไม่ได้มีการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารและความอุดมสมบูรณ์ของดิน ทั้งนี้ ไตรธานี และคณะ (2555) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจาก 3 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ขอนแก่น อุดรธานี และนครราชสีมา รวม 22 แปลง แยกได้แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต 19 ไอโซเลต และพบว่าแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากดินในแปลงที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูง จะมีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้มากกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ และพบว่าการกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตไม่ขึ้นกับความอุดมสมบูรณ์ของดิน

จากการวิจัยนี้ เมื่อทดสอบ คุณสมบัติการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม พบว่า เชื้อบางไอโซเลตมีคุณสมบัติมากกว่า 1 ลักษณะ เลือก แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต หรือโพแทสเซียม นำมาทดสอบความสามารถในการผลิต indole 3-acetic acid (IAA) (ภาพที่ 5) ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA มีจำนวน 43 ไอโซเลต

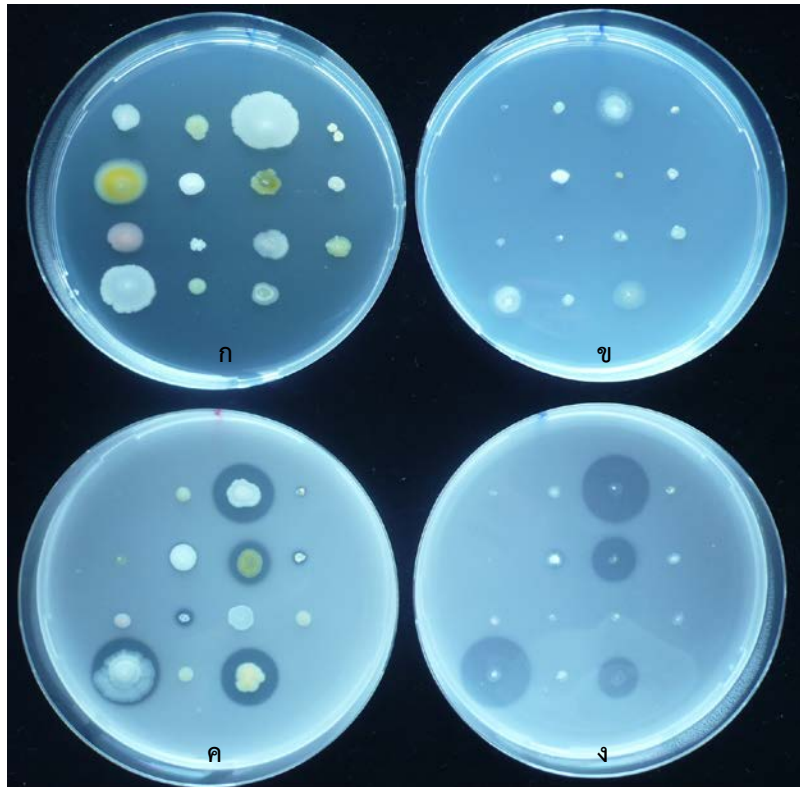
การทดสอบ คุณสมบัติการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียมของเชื้อที่แยกจากลำอ้อยในแต่ละจังหวัด พบว่าเปอร์เซ็นต์การพบแบคทีเรียภายใน อ้อยที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจนมีมากกว่าลักษณะอื่นๆ เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกจากดิน ยกเว้นจากจังหวัดกาญจนบุรี ขอนแก่น นครสวรรค์ และลพบุรี (ตารางที่ 3) โดยพบว่าเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตมีปริมาณมากกว่าเชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจน จากการทดสอบคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจากดินและต้นอ้อย 11 จังหวัด รวม 220 ตัวอย่าง โดยการตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน พบเชื้อที่สามารถเจริญได้เป็นจำนวน 503 ไอโซเลต จากเชื้อทั้งหมด 959 ไอโซเลต หรือเท่ากับ 52.45 % อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ พจนา และคณะ (2555) ที่ทำการแยกเชื้อจากดินในแหล่งปลูกอ้อย 24 จังหวัด โดยใช้อาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน พบว่าแยกได้เชื้อทั้งหมด 1,336 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบ *nifH* gene พบว่าตรวจพบยีนดังกล่าวจากเชื้อ 292 ไอโซเลต หรือพบ 21.81 % ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน และสามารถส่งเสริมการเจริญของอ้อยได้นั้น ควรทำการทดสอบกับอ้อยเป็นสำคัญ

การตรวจสอบเชื้อที่สามารถละลายโพแทสเซียม พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินจากจังหวัดนครราชสีมา กำแพงเพชร และชัยภูมิ มีเปอร์เซ็นต์เชื้อที่แสดงคุณสมบัติ ละลายโพแทสเซียมมากกว่าจากแหล่งอื่น โดยพบว่าไม่มีเชื้อที่แยกจากดินจังหวัดขอนแก่นที่สามารถละลายโพแทสเซียม แสดงว่าการพบเชื้อที่สามารถละลายโพแทสเซียมไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะของดิน เนื่องจากตัวอย่างดินจากนครราชสีมา และขอนแก่น มีลักษณะของดินเหมือนกันคือเป็นดินร่วนปนทราย และแบคทีเรียที่แยกได้จากลำอ้อยจากจังหวัดสุพรรณบุรี มีเปอร์เซ็นต์เชื้อที่แสดงคุณสมบัติ ละลายโพแทสเซียมมากกว่าจากแหล่งอื่น ส่วนเชื้อที่แยกจากลำอ้อยจากจังหวัดนครปฐมมีเชื้อที่สามารถละลายโพแทสเซียมได้น้อยที่สุด แสดงว่าการพบเชื้อที่สามารถละลายโพแทสเซียมไม่มีความสัมพันธ์กับพันธุ์อ้อย เนื่องจากในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดสุพรรณบุรีและนครปฐม ปลูกอ้อยพันธุ์ LK92-11 เช่นเดียวกัน

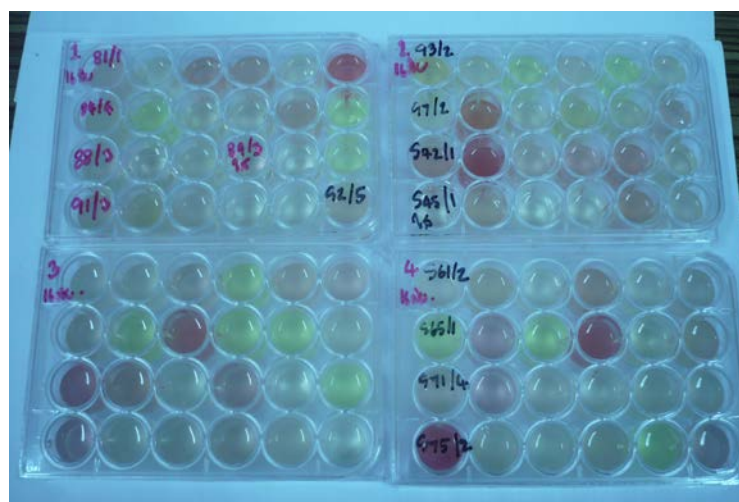
ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การพบแบคทีเรียจากดินบริเวณรากอ้อย และต้นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดต่างๆ ที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจน (N) การละลายฟอสเฟต (P) และโพแทสเซียม(K)

จังหวัด	แบคทีเรียจากดิน						แบคทีเรียจากต้นอ้อย					
	N		P		K		N		P		K	
	รวม	%	รวม	%	รวม	%	รวม	%	รวม	%	รวม	%
สุพรรณบุรี	45	62.5	30	41.7	16	22.2	47	73.4	38	59.4	34	53.1
นครปฐม	27	33.3	27	33.3	5	6.2	15	57.7	12	46.2	2	7.7
ราชบุรี	30	62.5	21	43.8	6	12.5	29	76.3	16	42.1	4	10.5
กาญจนบุรี	15	36.6	23	56.1	6	14.6	4	16.0	14	56.0	8	32.0
ขอนแก่น	23	39.7	25	43.1	0	0	18	42.9	23	54.8	10	23.8
อุดรธานี	10	17.5	31	54.4	7	12.3	24	75.0	19	59.4	16	50.0
นครราชสีมา	21	67.7	22	71.0	15	48.4	21	75.0	18	64.3	8	28.6
ชัยภูมิ	35	81.4	25	58.1	14	32.6	22	68.8	22	68.8	8	25.0
นครสวรรค์	31	53.4	16	27.6	8	13.8	24	57.1	27	64.3	17	40.5
กำแพงเพชร	30	66.7	21	46.7	19	42.2	18	56.3	18	56.3	12	37.5
ลพบุรี	2	8.3	10	4.2	1	4.2	12	30.0	22	55.0	14	35.0

% = $\frac{\text{จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบแต่ละชนิดในแต่ละจังหวัด}}{\text{จำนวนไอโซเลตเชื้อทั้งหมดที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบแต่ละชนิด}} \times 100$



ภาพที่ 4 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ
บนอาหารทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ข) การละลายฟอสเฟต (ค) และโพแทสเซียม (ง)
เมื่อเทียบกับการเจริญของเชื้อในชุดควบคุมบนอาหาร nutrient glucose agar (ก)

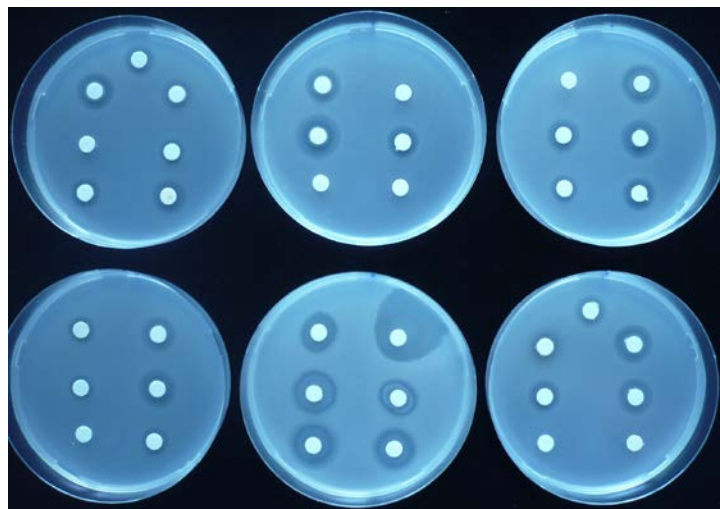


ภาพที่ 5 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole 3-acetic acid (IAA)
โดยเกิดสีชมพู เมื่อเติมสารทดสอบ

3. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสาร tetracycline มาใช้ในการคัดเลือกเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมด โดยทดสอบด้วยวิธี paper disc agar diffusion และใช้อาหาร NGA พบว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดบริเวณใสรอบแผ่นกลม (ภาพที่ 6) มีจำนวน 18 ไอโซเลต คัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันจำนวน 12 ไอโซเลต เลี้ยงในอาหาร nutrient glucose broth โดยวางบนเครื่องเขย่า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้น นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร แล้วนำส่งวิเคราะห์ตรวจหาสาร tetracycline โดยใช้เทคนิค HPLC ผลการวิเคราะห์พบว่า ตรวจไม่พบสาร tetracycline ในทุกตัวอย่าง แสดงว่าเชื้อทดสอบทั้ง 12 ไอโซเลต ไม่สามารถผลิตสาร tetracycline

เนื่องจากมีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมา ในการทดลองนี้ จึงทำการตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการผลิตสาร surfactin โดยใช้เทคนิค drop-collapse และเนื่องจากสาร surfactin ที่มีผลต่อต้านเชื้อไฟโตพลาสมานั้น มีรายงานการสร้างโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการทดลองนี้ จึงนำเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 25 ไอโซเลต ทดสอบการสร้างสาร surfactin ผลจากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่แสดงผลเป็นบวก อย่างไรก็ตาม จะต้องทำการตรวจสอบต่อไป โดยการตรวจสอบยีน *sfp* ที่ควบคุมการสร้างสาร surfactin ในแบคทีเรีย และทำการแยกสารบริสุทธิ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตสาร surfactin และใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยต่อไป



ภาพที่ 6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจากดินและต้นอ้อยในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อทดสอบที่ไวต่อสารเตตราซัยคลิน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion

เอกสารอ้างอิง

- ชลิดา เล็กสมบุญ และ นัฐพร จำปี. 2550. ผลของแบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. การประชุมวิชาการการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 วันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรม อัมรินทร์ลากูน พิษณุโลก
- ไทรธานี เยี่ยมอ่อน นันทวัน ฤทธิเดช ประสิทธิ์ใจศิลป์ และโสภณ บุญลือ. 2555. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง. เกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 185-193.
- พวงมา กะสินรัมย์ จุฑาทพ วัชรไชยคุปต์ สุจินต์ ภัทรภูวดล และวิชัย โฆสิตรัตน์. 2555. การประชุมวิชาการการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 10 วันที่ 22-24 กุมภาพันธ์ 2555 เชียงใหม่
- วรารณา แซ่อ้วง ชลิดา เล็กสมบุญ ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล และ เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2549. ประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ E7-17 ในการควบคุมโรคเหี่ยวเน่าแดงของอ้อย . รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 44 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตร ปี 2549-50. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา <http://www.oae.go.th>, 23 เมษายน 2552.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553 (ก). การใช้ที่ดินเพื่อการเกษตรของประเทศไทย ระดับประเทศ ภาค จังหวัด ปี 2549. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/download/article/article_20090417181149.html
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553(ข). มูลค่าสินค้าเกษตรนำเข้าที่สำคัญ พ.ศ.2552-2553. http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/exp_topten.php?imex=1
- อัจฉราวรรณ จีระเพ็ญแสง ชลิดา เล็กสมบุญ และ เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2553. ประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียในการควบคุมโรคเหี่ยวเน่าแดงของอ้อยในสภาพโรงเรือน. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ.
- Abd-Alla, M.H. 1999. Growth and siderophore production in *Bradyrhizobium* (Lupin) strains under iron limitation. Folia Microbiol. 44:196-200.
- Agarwal, S. and S.T. Shende. 1987. Tetrazolium reducing microorganisms inside the root of *Brassica* species. Curr. Sci. 56:187-188.
- Alstrom, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere Pseudomonads. J. Gen. Appl. Microbiol. 37:495-501.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M. R. Ismail, Md. A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah and S. Meon. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology 8:1247-1252.
- Bashan, Y. and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30:1225-1228.
- Berg, G., A. Fritze, N. Roskot and K. Smalla. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. Journal of

- Applied Microbiology 91: 963-971.
- Bell, C.R., G.A. Dickie, W.L.G. Harvey and J.W.Y.F. Chan. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41:46-53
- Cameron, H.R. 1970. *Pseudomonas* content of cherry trees. *Phytopathology* 60:1343-1346.
- De Meyer, G., Hofte, M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- Gagne, S., C. Richard, H. Rousseau and H. Antoun. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* 33: 996-1000.
- Garcia, J.A.L., A. Probanza, B.Ramos, M.R. Palomino and F.J. G. Manero. 2004. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie* 24:169-176.
- Gardner, J.M., A.W. Feldman and R.M. Zablotowicz. 1982. Identity and behaviour of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1335-1342.
- Hallmann, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. *In* Biotic interactions in Plant-Pathogen associations. M.J. Jeger and N.J. Spence. CABI Publishing, UK. 353 p.
- Hoffland, E., J. Hakulinen, J.A. Van Pelt. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86:757-762.
- Hollis, J.B. 1951. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology* 41:320-366.
- Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4:27-31.
- Jacobs, M.J., W.M. Bugbee, and D.A. Gabrielson. 1985. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugarbeet root. *Can. J. Bot.* 63:1262-1265.
- Jetiyanon, K. and J.W. Kloepper. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control* 24:285-291.
- Kumar, V., A. Kumar, V.C. Verma, S.K. Gond and R.N. Kharwar. 2007. Induction of defense enzymes in *Pseudomonas fluorescens* treated chickpea roots against *Macrophomina phaseolina*. *Indian Phytopath.* 60: 289-295
- Leeman, M., F.M. Den Ouden, J.A. Van Pelt, F.P.M. Dirkx and H. Steijl. 1996. Iron availability effects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86:149-155.
- Libbert, E. And H. Risch. 1969. Interactions between plants and epiphytic bacteria

- regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and destroying bacteria from pea plants. *Physiol. Plantar.* 22:51-58.
- Liu, L., J.W. Kloepper and S. Tuzun. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695- 698.
- Liu, L., J.W. Kloepper and S. Tuzun. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber Against bacterial leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:843-847.
- Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.P. Metraux and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.
- Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.P. Metraux and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.
- Misaghi, I.J. and C.R. Donndelinger. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Murphy, J.F. and G.W. Zehnder. 2000. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. *Plant Disease* 84:779-784.
- Pal, K.K., K.V. Tilak, A.K. Saxena, R. Dey and C.S. Singh. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 156: 209-223.
- Pan, B., Y.M. Bai, S. Leibovitch and D.L. Smith. 1999. Plant growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11:179-186.
- Park, K.S. and J.W. Kloepper, 2000. Activation of PR-1 a promoter by rhizobacteria which induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biological Control* 18:2-9.
- Philipson, M.N. and I.D. Blair. 1957. Bacteria in clover root tissue. *Can. J. Microbiol.* 3:125-129.
- Pieterse, C.M.J., S.C.M. Van Wees, E. Hoffland, J.A. Van Pelt and L.C. Van Loon. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-1237.
- Raupach, G.S., L. Liu, J.F. Murphy, S. Tuzun, and J.W. Kloepper. 1996. Induced resistance

- in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Disease* 80: 891-894.
- Saikia, R., R. Kumar, T. Singh, A.K. Srivastava, D.K. Arora and M.W. Lee. 2004. Induction of defense enzymes and pathogenesis related proteins in *Pseudomonas fluorescens* treated chickpea in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Microbiology* 32: 47-53.
- Siddiqui, Z.A. and I.Mahmood, 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes :A review. *Bioresource Technology* 69: 167-179.
- Srivastava, A.K., T. Singh, T.K. Jana and D.K. Arora. 2001. Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinum*(chickpea) by *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Botany* 79: 787-795.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- van Peer, R., H.L.M. Punte, L.A. Deweger and B. Schippers. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2462-2470.
- Van Peer, R., G.J. Niemann and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Vidhyasekaran, P. and M. Muthamilan. 1999. Evaluation of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology* 9:67-74.
- Villegas, L.C. 2001. Isolation, characterization and investigations into the mechanism of action of plant growth promoting bacteria in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Phillippines Univ. Los Banos, College, Laguna* (Abstract)
- Viswanathan, R. and R. Samiyappa. 2002. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. *Crop Protection* 21:1- 10.
- Walker, R., S. Rossall and M.J.C. Asher. 2002. Colonization of the developing rhizosphere of sugar beet seedlings by potential biocontrol agents applied as seed treatments. *Journal of Applied Microbiology* 92: 228-237.
- Wei, G., J.W. Kloepper and S. Tuzun, 1991. Induction of systemic resistance in cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strain of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508-1517.
- Wei, G., J.W. Kloepper and S. Tuzun, 1996. Induction of systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86: 221-224.
- Whitesides, S.K. and R.A. Spotts. 1991. Frequency, distribution and characteristics of

endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81: 453-457.

Zhang, S., M.S. Reddy and J.W. Kloepper. 2002. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 23: 79-86.