

ไรโซเบียมและแบคทีเรียจากดินเพื่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง

นางสาวศศิธร พงษ์สำราญกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RHIZOBIA AND SOIL BACTERIA FOR GROWTH PROMOTION OF SOYBEAN

Miss Sasithorn Pongsamrangun



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial

Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ไรโซเปียมและแบคทีเรียจากดินเพื่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง
โดย	นางสาวศศิธร พงษ์สำราญกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

ศศิธร พงษ์สำราญกุล : ไรโซเบียมและแบคทีเรียจากดินเพื่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง (RHIZOBIA AND SOIL BACTERIA FOR GROWTH PROMOTION OF SOYBEAN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ, 138 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองและประเมินแบคทีเรียที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง ตลอดจนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในถั่วเหลือง ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจสามารถทำงานร่วมกันได้ แบคทีเรียในดินและแบคทีเรียปนเปื้อนจากพืชตระกูลถั่วจำนวน 100 ไอโซเลต ได้รับการทดสอบสำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราหลายชนิดที่ก่อโรคในถั่วเหลือง ซึ่งได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* นอกจากนี้ สมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองโดยไอโซเลตเหล่านี้ก็ได้รับการประเมินด้วย ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียในดินจำนวน 11 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ที่ยับยั้งรา ซึ่งรวมถึง โปรตีเอสและเซลลูเลส ไอโซเลตเหล่านี้ผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกในปริมาณเล็กน้อย และไซโตโครฟอรีนในปริมาณสูง ลักษณะสมบัติทางสัณฐานวิทยา, สรีรวิทยา, และชีวเคมี รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แสดงว่า แบคทีเรียในดิน 11 ไอโซเลตเหล่านี้มีความเหมือน 99% กับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า 6 ไอโซเลตของแบคทีเรียปนเปื้อนจากพืชตระกูลถั่วจัดเป็น *Bradyrhizobium japonicum* และ 1 ไอโซเลต จัดเป็น *Bradyrhizobium elkanii* แบคทีเรียกลุ่มหลังนี้ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราและไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งรา อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งรวมถึง การผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก และไซโตโครฟอรีน, ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างปม สองไอโซเลตของแบคทีเรียปนเปื้อนจากพืช ได้แก่ *B. japonicum* 01010 และ *B. elkanii* 01027 สามารถผลิตปริมาณที่สูงของกรดอินโดล-3-อะซีติก ที่ 80 µg/ml และ 42 µg/ml, ตามลำดับ *Bacillus* sp. N13/2 ซึ่งมีสมบัติต้านรา และ *B. japonicum* 01023 ซึ่งมีสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช สามารถเจริญร่วมกันและใช้เป็นเชื้อผสมได้ การใส่เชื้อผสมร่วมกันของไอโซเลตเหล่านี้โดยไม่มีราพบว่า ส่งเสริมผลผลิตโดยรวมของถั่วเหลืองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อันเป็นผลมาจากลักษณะสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลต อย่างไรก็ตาม การใส่เชื้อผสมร่วมกันยังไม่เพียงพอที่จะป้องกันการเกิดโรคในถั่วเหลืองได้ ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5672176623 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOCONTROL / FUNGAL PLANT DISEASE / PGPR / RHIZOBIUM / SOYBEAN

SASITHORN PONGSAMRANGUN: RHIZOBIA AND SOIL BACTERIA FOR GROWTH PROMOTION OF SOYBEAN. ADVISOR: ASST. PROF. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 138 pp.

The aims of this work were to screen and evaluate the bacterial isolates with plant growth promoting characteristics, as well as suppressing the growth of pathogenic fungi in soybean in which these bacteria might have combination effects. One hundred isolates of soil bacteria and root nodule-forming-bacteria from leguminous plants were tested for their abilities to inhibit the growth of several fungal pathogen of soybean including *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. In addition, plant growth promotion abilities of these isolates were also evaluated. The results revealed that eleven isolates of soil bacteria were able to produce antifungal enzymes including protease and cellulase. Moreover, they produced low amount of indole-3-acetic acid, and high amount of siderophore. Morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence revealed that these eleven isolates of soil bacteria had 99% identity to bacteria in the genus *Bacillus*. 16S rDNA sequencing demonstrated that six isolates of root nodule-forming-bacteria belong to *Bradyrhizobium japonicum* and one isolate belongs to *Bradyrhizobium elkanii*. The latter group of bacteria had neither antifungal activity nor antifungal enzyme production. However, they possessed plant growth promoting characteristics including indole-3-acetic acid and siderophore productions, and nitrogen fixation and nodulation abilities. Two isolates, *B. japonicum* 01010 and *B. elkanii* 01027, could produce high amount of indole-3-acetic acid at 80 µg/ml and 42 µg/ml, respectively. *Bacillus* sp. N13/2 that had antifungal ability and *B. japonicum* 01023 that had plant growth promoting ability were able to grow together and used as mixed culture. Co-inoculation of these isolates, without fungus, significantly promoted overall yields of soybean due to the plant growth promoting characteristics of both bacteria. However, the co-inoculation was not enough to prevent disease development in soybean under the tested condition.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย ตลอดจนการดูแลเอาใจใส่ที่ดียิ่ง อีกทั้งยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพระวัฒนา กรุณารับเป็นประธานกรรมการ ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณกองโรคพิษ กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การอนุเคราะห์รอกอโรคสำหรับใช้ในงานวิจัย ทำให้งานของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. มนต์ชัย มนต์สิลา กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์ ที่ให้การอนุเคราะห์แบคทีเรียและเมล็ดถั่วเหลืองสำหรับใช้ในงานวิจัย ทำให้งานของผู้วิจัย สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนนางสาว รพีวรรณ โสวรรณปรีชา ที่สอนเทคนิควิธีการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือและ ข้อคิดเห็นต่างๆที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย และสมาชิกห้องวิจัย 1904/15 ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัววงษ์สำราญกุล สำหรับการให้คำปรึกษาอย่างดี คอย สนับสนุน ช่วยเหลือ เป็นแรงใจและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1.....	5
บทที่ 2.....	9
บทที่ 3.....	28
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	28
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	29
3.3 ไพรมเมอร์.....	32
3.4 จุลินทรีย์	32
3.4.1 แบคทีเรีย	32
3.4.2 ราก่อโรคในพืช	32
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	32
3.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	32
3.6.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	32
3.6.2 การเก็บรักษาราก	33
3.7 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค	33
3.7.1 การเตรียมแบคทีเรียและรากเพื่อใช้ในการทดสอบ.....	33
3.7.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคด้วยวิธี Dual culture	33
3.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆ ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองและในการยับยั้งราก่อโรค	34
3.8.1 การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนน้ำใสของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรค	34

3.8.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา	34
3.8.3 การทดสอบการผลิต กรดอินโดล-3-แอซีติก (IAA)	35
3.8.4 การทดสอบการผลิตสารไซโตไคนนิน.....	35
3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง	36
3.9.1 การเตรียมเมล็ดถั่วเหลือง	36
3.9.2 การเตรียมเชื้อผสมของแบคทีเรีย	36
3.9.3 การเตรียมชุดปลูกถั่วเหลืองในขวด	36
3.9.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ในขวด Leonard's jar	37
3.9.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ในหลอดทดลอง	38
3.10 การทดสอบความเข้ากันได้ของการแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย	38
3.11 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมการเกิดโรครากในถั่วเหลือง	38
3.11.1 การทดสอบการเกิดโรคในถั่วเหลืองด้วยรา	38
3.11.2 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียในการยับยั้งรากอโรคในถั่วเหลือง	38
3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	39
3.12.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย.....	39
3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA.....	40
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	42
บทที่ 4.....	43
4.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	43
4.2 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา.....	47
4.3 การผลิต กรดอินโดล-3-แอซีติก (IAA).....	52
4.4 การผลิตสารไซโตไคนนิน	53

4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง	55
4.6 การใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งราก่อโรคในถั่ว เหลือง.....	62
4.6.1 การศึกษาความเข้ากันได้ของแบคทีเรียที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญกับแบคทีเรีย ยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง	62
4.6.2 การคัดเลือกคู่แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียในการทดสอบ	63
4.6.3 ผลการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง	63
4.7 การก่อโรคในถั่วเหลืองโดยรา.....	66
4.8 ประสิทธิภาพของเชื้อผสมในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง	68
4.9 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย.....	71
4.9.1 การทดสอบทางชีวเคมี	71
4.9.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ แบคทีเรีย	73
บทที่ 5.....	76
รายการอ้างอิง	81
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	99
ภาคผนวก ค	101
ภาคผนวก ง.....	110
ภาคผนวก จ	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	138

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของถั่วเหลืองต่อน้ำหนัก 100 กรัม	10
ตารางที่ 2.2 สมดุลเมล็ดถั่วเหลืองโลก ปี 2552/2553 – 2557/2558	10
ตารางที่ 2.3 สมดุลเมล็ดถั่วเหลืองของไทย ปี 2553-2558	11
ตารางที่ 2.4 กลไกการควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพ	17
ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการยับยั้งรากอโรคของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture ...	43
ตารางที่ 4.2 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งรากอโรคของส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย 11 ชนิด	45
ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต.....	48
ตารางที่ 4.4 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วันร่วมกับแบคทีเรียปมรากแต่ละไอโซเลต.....	56
ตารางที่ 4.5 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในหลอดทดลอง หลังจากปลูกเป็นเวลา 30 วันร่วมกับแบคทีเรียปมรากแต่ละไอโซเลต.....	60
ตารางที่ 4.6 ความเข้ากันได้ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มเมื่อเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMCA.....	62
ตารางที่ 4.7 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย ไอโซเลต 01023 และ N13/2.....	64
ตารางที่ 4.8 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งรากอโรค	72
ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยับยั้งราเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	74
ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	75

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	แผนภาพผู้ผลิตถั่วเหลืองที่สำคัญในปี 2013 – 2014	11
รูปที่ 2.2	เส้นใยของ <i>R. solani</i>	12
รูปที่ 2.3	โครงสร้างสเคลโรเตียม ซึ่งเกิดจากการรวมกันของเซลล์โมโนออยด์	13
รูปที่ 2.4	อาการโคนเน่า	14
รูปที่ 2.5	อาการรากเน่าในถั่วเหลือง	14
รูปที่ 2.6	อาการลักษณะข้ำน้ำบริเวณใบ	15
รูปที่ 2.7	อาการใบติดบริเวณใบ	16
รูปที่ 2.8	แผนผังการละลายของฟอสฟอรัสในดิน โดย Rhizobacteria	19
รูปที่ 2.9	แสดงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม	20
รูปที่ 2.10	แสดงการสังเคราะห์ IAA โดยวิธีต่างๆ ในแบคทีเรีย	21
รูปที่ 2.11	แสดงเส้นทางการส่งสัญญาณ (Signal transduction pathways) แบบ SAR และ ISR ใน <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
รูปที่ 2.12	แสดงภาพย้อมแกรม และการย้อมสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <i>Bacillus</i> sp.....	25
รูปที่ 2.13	แสดงภาพย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไรโซเบียม	26
รูปที่ 2.14	ปมรากพืชตระกูลถั่ว และ ภาพตัดขวางปมรากที่เกิดจากไรโซเบียม สายพันธุ์ Y629	26
รูปที่ 3.1	รูปแบบการลงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งรากก่อโรควิธี dual culture.....	33
รูปที่ 3.2	ส่วนประกอบของขวด Leonard's jar	37
รูปที่ 4.1	ความสามารถของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆ	44
รูปที่ 4.2	ความสามารถของส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆ	46
รูปที่ 4.3	ผลการผลิตเซลล์ลูเลส, โปรตีนเอส และโคตินเนสของไอโซเลต NE10/2	47
รูปที่ 4.4	กราฟแสดงค่า IAA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต.....	53
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงค่า IAA ผลิตโดยแบคทีเรียที่ยับยั้งราทั้ง 11 ไอโซเลต.....	53
รูปที่ 4.6	ผลการทดสอบการผลิตไฮเดรโอโรฟอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา	54
รูปที่ 4.7	ผลการทดสอบการผลิตไฮเดรโอโรฟอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลือง	54

รูปที่ 4.8 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง	57
รูปที่ 4.9 บริเวณรากต้นถั่วเหลืองจากชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง	58
รูปที่ 4.10 ตัวอย่างการเกิดปมรากในถั่วเหลืองจากชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01035	59
รูปที่ 4.11 การเจริญของต้นถั่วเหลืองจากชุดปลูกในหลอดทดลอง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง	61
รูปที่ 4.12 บริเวณรากของต้นถั่วเหลืองจากชุดปลูกในหลอดทดลอง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง	61
รูปที่ 4.13 ตัวอย่างความเข้ากันได้ของแบคทีเรียซึ่งไม่พบโซนยับยั้งรอบโคโลนี และ ความเข้ากันไม่ได้ของแบคทีเรียซึ่งเกิดโซนยับยั้งรอบโคโลนี	62
รูปที่ 4.14 การเจริญของต้นถั่วเหลืองบริเวณลำต้น ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย	65
รูปที่ 4.15 บริเวณรากของต้นถั่วเหลือง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย	65
รูปที่ 4.16 การใช้เชื้อผสมของ 01023 และ N13/2 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง และการเกิดปมราก	66
รูปที่ 4.17 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม <i>F. oxysporum</i> ในหลอดทดลอง	66
รูปที่ 4.18 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม <i>Curvularia</i> sp. ในหลอดทดลอง	67
รูปที่ 4.19 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดควบคุมในหลอดทดลอง	67
รูปที่ 4.20 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม <i>R. solani</i> ในหลอดทดลอง	67
รูปที่ 4.21 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม <i>Colletotrichum</i> sp. ในหลอดทดลอง	68
รูปที่ 4.22 อาการของโรคหลังจากลงราเป็นเวลา 7 วัน	69
รูปที่ 4.23 การเจริญบริเวณต้นของถั่วเหลือง หลังจากลงราเป็นเวลา 7 วัน	69
รูปที่ 4.24 อาการใบเหี่ยว หลังจากลงราเป็นเวลา 14 วัน	70
รูปที่ 4.25 แสดงการเกิดปมบริเวณรากถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค	70
รูปที่ 4.26 ผลการทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture บนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และบนอาหารที่มีไนโตรเจน	71

รูปที่ 4.27 ตัวอย่างภาพได้กล้องจุลทรรศน์ (1000X) ของการย้อมแกรมและการย้อมสปอร์ของไอโซเลต NE10/2.....	72
รูปที่ 4.28 ตัวอย่างภาพได้กล้องจุลทรรศน์ (1000X) ของการย้อมแกรมแบคทีเรียจากปมราก ไอโซเลต 01027 และ 01041	73
รูปที่ 4.29 อีอาร์เอสเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยั้งรา	73
รูปที่ 4.30 อีอาร์เอสเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมราก ถั่วเหลือง	75



บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเหลือง (soybean) จัดอยู่ในกลุ่มพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันมีการเพาะปลูกถั่วเหลืองกันอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Guo และคณะ, 2012)

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกและของประเทศไทย เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วย โปรตีนสูงถึง 40 % ซึ่งอุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) หลายชนิด (Liu, 1997), คาร์โบไฮเดรต 35 % (Mateos-Aparicio และคณะ, 2008) และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มมวลกระดูก ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็งเต้านม ลดอาการที่เกิดจากสาเหตุการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) และมีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ เป็นต้น (Messina, 1999) นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีน้ำมัน 18-22 % ของน้ำหนักเมล็ดแห้ง โดยน้ำมันในถั่วเหลืองถือเป็นน้ำมันคุณภาพดี มีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมกา-3 (omega-3 fatty acid) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมกา-6 (omega-6 fatty acid) ในปริมาณสูง (Mateos-Aparicio และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงนิยมนำเมล็ดถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มากมาย อาทิ ใช้ในการประกอบอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตแป้ง การผลิตน้ำมันพืช และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลาย (Erickson, 1995) นอกจากนี้ยังนำมาประยุกต์ใช้สำหรับสกัดน้ำมัน และผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก (Vasudevan และ Briggs, 2008) อีกทั้งยังสามารถนำกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ด้วย (Wong และคณะ, 1996) นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นพืชที่มีปมราก ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จึงช่วยส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองและช่วยบำรุงดินให้อุดมสมบูรณ์อีกด้วย (Berg, 2009)

แนวโน้มการผลิตและการบริโภคถั่วเหลืองในฐานะของพืชอาหารและพืชพลังงานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ได้จัดให้ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจในกลุ่มพืชพลังงานทดแทนที่มีแนวโน้มการผลิตและความต้องการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเพื่อการอุปโภคและบริโภคของโลกที่เพิ่มสูงขึ้น โดยในปี 2557/2558 ได้มีการคาดว่าความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองเพื่อสกัดน้ำมันจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปี 2556/2557 ร้อยละ 5.16 สำหรับในประเทศไทยการผลิตถั่วเหลืองยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ประเทศไทยจึงต้องนำเข้าเมล็ดถั่วเหลือง โดยปริมาณการนำเข้าถือเป็นอันดับ 7 ของโลก โดยในปี 2556/2557 มีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลือง 1.80 ล้านตัน หรือร้อยละ 1.63 ของปริมาณนำเข้าของโลก และคาดการณ์ว่ายังคงเพิ่มขึ้นตามการขยายตัวของเศรษฐกิจ (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

อย่างไรก็ตามผลผลิตของถั่วเหลืองในประเทศกลับมีปริมาณลดลง เนื่องจากปัญหาที่เกิดจากแมลงและจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิ แบคทีเรีย ไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์พวกรา (Roy และคณะ, 2001) โรคสำคัญจากราที่มีการระบาดและมีผลทำลายรุนแรงหรือค่อนข้างรุนแรง ได้แก่ โรคต่อไปนี้

โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) เกิดจาก *Colletotrichum dematium* ซึ่งจะพบอาการเป็นจุดแผลสีน้ำตาลเข้มบริเวณใบ กิ่ง ลำต้น และฝัก ส่งผลให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลง (Mahmodi และคณะ, 2013)

โรคราสนิม (rust) เกิดจาก *Phakopsora pachyrhizi* พบอาการหลังจากต้นถั่วเหลืองติดเชื้อ 5-8 วัน โดยจะสังเกตเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลคล้ายสนิม อาการจะปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆใต้ใบและจุดจะค่อยๆมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยจะเกิดบริเวณผิวใบด้านล่างมากกว่าผิวใบด้านบน ว่าจะเจริญและแพร่กระจายไปยังต้นข้างเคียง รวมถึงอาจปนเปื้อนไปกับเมล็ดได้ (Bromfield, 1984; Goellner และคณะ, 2010)

โรครากเน่า (Rhizoctonia root rot) เกิดจาก *Rhizoctonia solani* เมื่อต้นถั่วเหลืองติดเชื้อจะเกิดแผลสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลแดงบริเวณส่วนนอกของฐานลำต้น (outer cortical layer) และรากแขนง (lateral root) โดยจะไม่พบอาการในส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเหนือดินขึ้นไป แต่จะสังเกตเห็นอาการของโรคจากใบซีดเหลือง (chlorosis) และการเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงัก เหี่ยวและตายในที่สุด (Hwang และคณะ, 1996; Sinclair, 1989)

โรคใบติด (wet rot) เกิดจาก *R. solani* โดยพบอาการนี้บริเวณใบ ใบเลี้ยง และฝัก ลักษณะอาการจะมองเห็นเส้นใยสีขาวเจริญบนใบและใบเลี้ยง โดยจะเจริญปกคลุมและแพร่ไปยังใบข้างเคียงเกิดเป็นร่างแหคล้ายใยแมงมุม ใบที่เป็นโรคจะเหี่ยวและทำให้การเจริญของต้นหยุดชะงัก และจะแพร่ไปยังฝักซึ่งส่งผลโดยตรงต่อผลผลิตถั่วเหลือง (Galindo และคณะ, 1983; Hwang และคณะ, 1996)

โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการแก้ไขปัญหาที่เกิดจากราดังกล่าว เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีและให้ผลที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีส่งผลกระทบด้านลบต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งสารตกค้างในดินและบนผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง รวมทั้งยังเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค (Tu, 1982) และหากใช้ต่อเนื่องก็จะส่งผลให้เชื้อก่อโรคในพืชมีแนวโน้มคือยาและยังทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีประโยชน์ต่อพืชอีกด้วย (Gerhardson, 2002) ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี และเป็นวิธีในการแก้ไขปัญหาอย่างยั่งยืน (de Weger และคณะ, 1995)

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) คือแบคทีเรียในดินที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆรากพืช หรือยึดเกาะกับรากพืช หรือเจริญอยู่ภายใน หรือเจริญร่วมกันกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) หรืออาศัยแบบอิสระในดิน (free living form) โดยจะมีกลไกบางอย่างที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช (Kloepper และ Schroth, 1978) PGPR มีประโยชน์ต่อพืช อาทิ ทำหน้าที่เป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยมีส่วนช่วยในกระบวนการตรึงไนโตรเจน และกระบวนการสร้างปมในกรณีของพืชตระกูลถั่ว และยึดเกาะกับรากพืชแล้วช่วยในการสร้างสารอาหารที่จำเป็นให้กับพืช เช่น ฟอสฟอรัส สร้างสารเคมีและฮอร์โมนพืชที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน สร้างสารไซเดอโรฟออร์ (siderophore) ซึ่งมีส่วนช่วยในการจับธาตุเหล็ก

ให้กับพืช (Perez-Montano และคณะ, 2014) นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ยังมีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้อีกด้วย โดย PGPR ที่มีรายงานว่ามีความสามารถนี้ได้แก่ *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Ampelomyces*, *Coniothyrium* และ *Trichoderma* (Cassan และคณะ, 2009; Saharan และ Nehra, 2011) งานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR หลายชนิดร่วมกันเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและ/หรือยับยั้งราโรค อาทิ

Cassán และคณะ (2009) ได้คัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของ *Azospirillum brasilense* สายพันธุ์ Az39 และ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ E109 เพื่อช่วยในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญในระยะเริ่มต้นของถั่วเหลืองและข้าวโพด และพบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างฮอร์โมนพืช ได้แก่ ออกซินในรูปของ IAA ปริมาณ 6.62 ± 0.37 และ 13.16 ± 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดย *B. japonicum* E109 ยังมีบทบาทในกระบวนการสร้างปมรากด้วย (Mathesius และคณะ, 1998), ฮอโมนซีเอทีน (zeatin (Z)) ปริมาณ 0.65 ± 0.02 และ 0.88 ± 0.03 ตามลำดับ ซึ่ง Z ช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และมีบทบาทในกระบวนการสร้างปมรากของ *B. japonicum* E109 (Giraud และคณะ, 2007) และฮอโมนจิบเบอเรลลินแอซิด (gibberellic acid (GA_3)) ปริมาณ 0.95 ± 0.02 และ 0.39 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีบทบาทในการเพิ่มความสูงและขนาดของลำต้น (Leite และคณะ, 2003)

Atieno และคณะ (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. japonicum* ร่วมกับ *Bacillus subtilis* 2 สายพันธุ์ ในถั่วเหลืองพบว่าเชื้อผสมช่วยเพิ่มการเกิดปม (nodulation) และเพิ่มน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ ประมาณ 2-5 และ 4-10 กรัมต่อต้น ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Masciarelli และคณะ (Masciarelli และคณะ, 2014) คัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR จากเมล็ดถั่วเหลืองและพบว่าเป็น *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ LL2012 เมื่อศึกษาผลในการส่งเสริมการเจริญของพืชรวมถึงบทบาทในกระบวนการตรึงไนโตรเจน การทำงานของเอนไซม์ และการผลิตฮอร์โมนพืช ได้แก่ IAA, GA_3 และ SA ร่วมกับ *B. japonicum* พบว่าช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียกับรากพืช รวมถึงช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นและจำนวนปมรากให้มากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งยาว (rod shape) จัดอยู่ใน Class Alpha-proteobacteria ไรโซเบียมมีความสามารถในการเข้าสร้างปมในรากพืชตระกูลถั่วได้และช่วยในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืช บทบาทในการส่งเสริมการเจริญของพืช อาทิ ผลิตฮอร์โมนพืช, ผลิตไซโตโรพอร์, ผลิต HCN, ช่วยละลายสารอินทรีย์ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (Siddiqui และคณะ, 2006) ตัวอย่างไรโซเบียมที่มีความจำเพาะในการเข้าสร้างปมในรากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ *Rhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* และ *Bradyrhizobium elkanii*

อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง เช่น กลุ่มไรโซเบียม มักไม่มีความสามารถในการยับยั้งราโรคในถั่วเหลือง ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญแก่พืช ร่วมกับจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในถั่วเหลืองจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาผลของแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR โดยเน้นศึกษากลุ่มของแบคทีเรียพวกไรโซเบียมที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองร่วมกับกลุ่ม *Bacillus* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในถั่วเหลือง โดยมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้กับพืชถั่วเหลือง ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีและยากำจัดศัตรูพืชต่อไป



บทที่ 2

ปรีทรศน์วรรณกรรม

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จัดอยู่ในกลุ่มพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Glycine max* (L.) Merrill ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชล้มลุก เมื่อโตเต็มทีลำต้นมีความสูงประมาณ 90-120 เซนติเมตร ระบบรากของถั่วเหลืองประกอบด้วยรากแก้ว, รากแขนง และมีรากฝอยเป็นจำนวนมาก ใบประกอบด้วย ใบเลี้ยง (cotyledon) และใบจริงคู่แรก (unifoliate leaves) ซึ่งมี 2 ใบ อยู่ในตำแหน่งตรงข้ามกัน ทั้งใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรกจะเป็นใบเดี่ยว (simple leaves) และจะเจริญต่อไปเป็นใบประกอบ มีใบย่อย 3 ใบ (trifoliolate) นอกจากนี้ยังมีใบขนาดเล็กเกิดเป็นคู่บริเวณฐานของกิ่งแขนง เรียกว่า prophyll (Hicks, 1978)

ถั่วเหลืองมีถิ่นกำเนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศจีน ชาวจีนใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองเป็นเวลากว่า 5,000 ปี และแพร่ขยายไปสู่ประเทศอื่นๆ ทั้งในเอเชีย ยุโรป และอเมริกา จนถึงปัจจุบันมีการเพาะปลูกถั่วเหลืองกันอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูง โดยประเทศที่ปลูกถั่วเหลืองมากที่สุดคือ สหรัฐอเมริกา รองลงมาได้แก่ บราซิล และอาร์เจนตินา ตามลำดับ (The United States Department of Agriculture, 2016; อาวุธ ณ ลำปาง, 2538)

สำหรับในประเทศไทยสันนิษฐานว่า ถั่วเหลืองถูกนำเข้ามาโดยพ่อค้าและชาวเขาที่เดินทางไปมาระหว่างจีนตอนใต้ และภาคเหนือของประเทศไทย และเริ่มมีการปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ หลังจากนั้นการเพาะปลูกก็ขยายตัวออกไปสู่ภาคต่างๆของประเทศ และเริ่มนิยมปลูกมากขึ้น เนื่องจากมีการสกัดน้ำมันและมีผลผลิตพลอยได้ หลังจากสกัดน้ำมันจากเมล็ดคือ กากถั่วเหลือง ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการผลิตถั่วเหลืองยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ต้องนำเข้ากากถั่วเหลืองเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558; อาวุธ ณ ลำปาง, 2538) โดยพันธุ์ถั่วเหลืองที่แนะนำโดยกรมวิชาการเกษตรให้ปลูกมีหลายพันธุ์ ได้แก่ สจ. 2, สจ. 4, สจ. 5, เชียงใหม่ 60, นครสวรรค์ 1 และสุโขทัย 1 (องค์การตลาดเพื่อเกษตรกร, 2552)

ความสำคัญของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกและของประเทศไทย เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองอุดมไปด้วยสารอาหารและเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีน (ตารางที่ 2.1) ซึ่งโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองมีสูงถึงร้อยละ 34 ถึง 57 ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมด นอกจากนี้ยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ทั้งในรูปพอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลายน้ำ (insoluble polysaccharide) ได้แก่ เพคติน, เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และแป้ง (Liu, 1997) และในรูปของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (soluble carbohydrate) ร้อยละ 9 ถึง 12 ได้แก่ มอนอแซ็กคาไรด์ (กลูโคสและ

พรักโทส), ไตแซ็กคาไรด์ (ซูโครส) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (แอฟฟิโนสและสแตคีโอส) (Liu, 1997) และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ที่เป็นสารช่วยเพิ่มมวลกระดูก ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคกระดูกพรุน ลดอาการที่เกิดจากสาเหตุการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) และมีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ เป็นต้น (Messina, 1999) นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีน้ำมันในเมล็ดร้อยละ 8.3 ถึง 28 และโดยเฉลี่ยร้อยละ 19.5 ของน้ำหนักเมล็ดแห้ง (Wilson, 2004) น้ำมันในถั่วเหลืองถือเป็นน้ำมันคุณภาพดี มีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (saturated fatty acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็น ได้แก่ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) ร้อยละ 10 ถึง 12, กรดสเตียริก (stearic acid) ร้อยละ 2.2 ถึง 7.2 (Cherry, 1985), กรดโอเลอิก (oleic acid) ร้อยละ 24, กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ร้อยละ 54 (Schnebly และ Fehr, 1993)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของถั่วเหลืองต่อน้ำหนัก 100 กรัม (Good Health (Thailand), 2006)

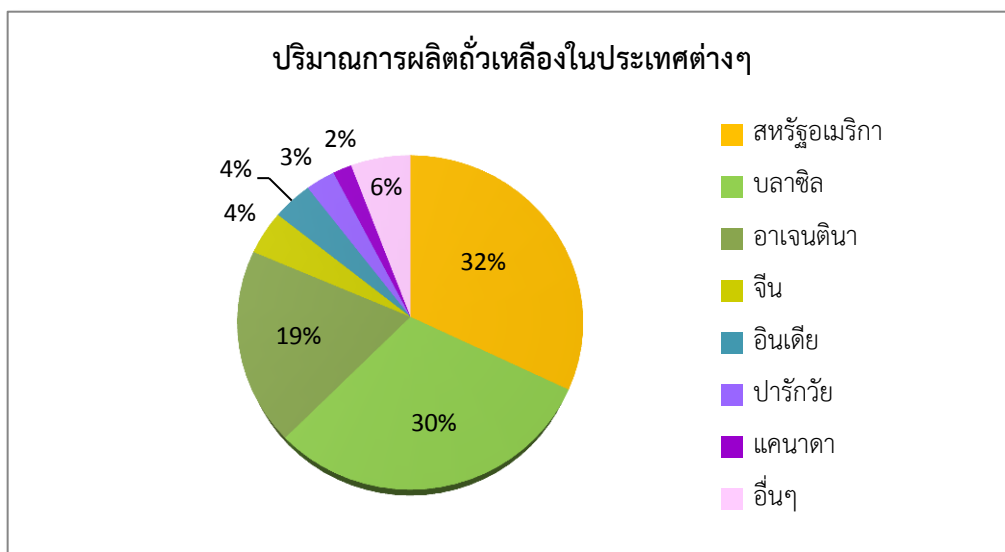
องค์ประกอบ	แคลอรี (กิโล แคลอรี)	น้ำ	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต		ASH	แร่ธาตุ		วิตามิน			อื่นๆ
					กลูโค ไซด์	ไฟ เบอร์		แคลเซียม	เหล็ก	บี1	บี2	ไน อา ซิน	
ปริมาณ (กรัม)	410	9.2	41.3	17.6	21.6	3.5	5.8	127	7.6	0.6	0.17	3.2	0.86

การผลิตและความต้องการถั่วเหลืองของโลก

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร จัดให้ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจในกลุ่มพืชพลังงานทดแทน โดยมุ่งเน้นไปที่อุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันจากถั่วเหลือง จากรายงานสถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญในปี 2557 และการคาดการณ์แนวโน้มในปี 2558 ด้านการผลิต การตลาด การส่งออก การนำเข้า และราคาของสินค้าเกษตรที่สำคัญ พบว่า การผลิตและความต้องการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเพื่อการอุปโภคและบริโภคของโลกยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (George, 2014) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยประเทศผู้ผลิตถั่วเหลืองที่สำคัญได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา ตามลำดับ (รูปที่ 2.1)

ตารางที่ 2.2 สมดุลเมล็ดถั่วเหลืองโลก ปี 2552/2553 – 2557/2558 (หน่วย : ล้านตัน) (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

รายการ	2552/53	2553/54	2554/55	2555/56	2556/57	อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	คาดการณ์ 2557/58
1. ผลิต	260.40	263.95	239.79	268.06	285.01	1.98	312.06
2. นำเข้า	86.45	88.76	93.44	95.89	110.29	5.71	112.72
3. ส่งออก	91.11	91.70	92.16	100.54	112.73	5.24	115.54
4. สกัดน้ำมัน	209.12	228.11	228.11	229.60	239.55	3.13	251.92
5. สต็อกสิ้นปี	62.21	53.40	53.40	56.28	66.85	-0.77	90.20



รูปที่ 2.1 แผนภาพผู้ผลิตถั่วเหลืองที่สำคัญในปี 2013 – 2014 (George, 2014)

สำหรับในประเทศไทย การผลิตถั่วเหลืองยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศในขณะที่ความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 2.3) โดยมีสัดส่วนการใช้ผลผลิตภายในประเทศ ร้อยละ 2.38 และนำเข้าร้อยละ 97.62 ของปริมาณความต้องการใช้ทั้งหมด โดยประเทศไทยนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นอันดับ 7 ของโลก และคาดการณ์ว่ายังคงเพิ่มขึ้นตามการขยายตัวของเศรษฐกิจ (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

ตารางที่ 2.3 สมดุลเมล็ดถั่วเหลืองของไทย ปี 2553-2558 (หน่วย : ล้านตัน) (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

ปี	ผลิต	นำเข้า	รวม (supply)	ความต้องการใช้ภายในประเทศ			ส่งออก	รวม (demand)
				สกัดน้ำมัน	ทำพันธุ์	แปรรูปฯ		
2553	169,577	1,818,705	1,988,282	1,542,307	11,877	433,134	954	1,988,282
2554	137,381	1,994,378	2,131,759	1,727,676	9,607	391,847	2,629	2,131,759
2555	83,787	2,199,941	2,203,728	1,679,481	4,950	517,379	1,919	2,203,728
2556	64,355	1,678,678	1,743,033	1,451,700	4,225	285,119	1,989	1,743,033
2557 ¹	52,541	2,015,550	2,068,091	1,693,200	3,840	365,051	6,000	2,068,091
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	-26.67	0.33	-1.22	0.13	-26.52	-6.39	40.48	-1.22
2558 ²	51,246	2,100,800	2,100,800	1,788,500	3,640	363,406	6,500	2,152,046

หมายเหตุ : ¹ ข้อมูลเบื้องต้น ² ประมาณการณ์

ที่มา: Oilseeds: World Markets and Trade.USDA Foreign Agricultural Service (2014)

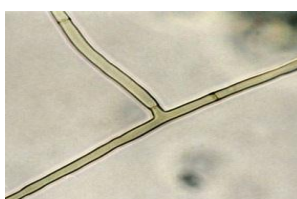
บทบาทของราก่อโรคในถั่วเหลืองและการป้องกัน

เนื่องจากถั่วเหลืองมีความต้องการทางเศรษฐกิจสูง ดังนั้นปริมาณผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลือง จึงมีความสำคัญ เมล็ดถั่วเหลืองที่มีคุณภาพดีจะส่งผลต่อ อัตราการงอก (germination rate), ความแข็งแรง (vigor) และความสามารถในการเจริญเป็นต้นกล้า รวมถึงลดการเกิดโรคและเพิ่มความทนทานต่อภาวะแวดล้อม ต่างๆ ได้ดี (Athow, 1987) อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ด อาทิ สภาพ ภูมิอากาศ ภาวะการเจริญและการเก็บเกี่ยว การขาดธาตุอาหาร การรบกวนของวัชพืช แมลงศัตรูพืช และโรคที่เกิด จากจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส ซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและเมล็ดมีคุณภาพต่ำ (Conley และคณะ, 2012)

รามิบทบาทสร้างความเสียหายต่อถั่วเหลืองอย่างมากเนื่องจากสามารถดำรงชีวิตได้หลายรูปแบบ อาทิ โครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive structure), ในรูปของเส้นใย, คลามัยโดสปอร์ หรือสปอร์ชนิดอื่นๆ อาทิ โอโอสปอร์ (oospore) เป็นต้น ทำให้สามารถเข้าทำลายถั่วเหลืองได้ในทุกระยะของการเจริญ และยังสร้างความเสียหายในหลายส่วนทั้ง ดอก ฝัก ราก และลำต้น เมื่อราเข้าก่อการติดเชื้อในถั่วเหลืองในระยะเอ็มบริโอ (embryo) จะส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งเป็นผลผลิตหลัก และส่งผลต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ในรุ่น ถัดไป (Nath และ Lambat, 1971) นอกจากนี้เมื่อมีต้นติดโรคจะกลายเป็นพาหะ ซึ่งสามารถแพร่กระจายโรคไป ยังต้นข้างเคียงได้อีกด้วย (Athow, 1987) ราชางชนิดอาจไม่ได้เข้าทำลายพืชโดยตรง แต่สร้างผลิตภัณฑ์บางอย่าง ที่เป็นพิษ อาทิ สารพิษจากรา (mycotoxin) ทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองเกิดการปนเปื้อนซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของ ผู้บริโภค (Clear และคณะ, 1989; Mislivec และ Brunce, 1977)

Rhizoctonia solani

R. solani (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota โดยทั่วไปอาศัยในดิน มีลักษณะที่สำคัญคือ ไม่สร้างคอนิเดียซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) แต่มี การสร้างเส้นใย (รูปที่ 2.2) และโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม (resistant structure) ที่เรียกว่า ไมโครสเคลอโรเตียม (microsclerotium) หรือสเคลอโรเตียม (sclerotium) (รูปที่ 2.3ก) ซึ่งเกิดจากการพันกันของ เส้นใยอย่างหลวมๆแล้วมีผนังแข็งสีน้ำตาลเข้มหุ้มล้อมรอบ และนอกจากนี้ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ยัง สร้างสปอร์ที่เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ด้วย (Ogoshi, 1987)



รูปที่ 2.2 เส้นใยของ *R. solani* (Tredway และ Burpee, 2001)

ลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของ *R. solani* คือมีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก มีรอยคอดและผนังกัน (septum) ใกล้จุดกำเนิด มักมีการสร้างเซลล์สั้นๆ กลมๆ เรียกว่า เซลล์โมนิไลออยด์ (monilioid cell) (รูปที่ 2.3ข) และไม่พบการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน (clamp connection)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างสเคลอโรเทียม (2.3ก) ซึ่งเกิดจากการรวมกันของเซลล์โมนิไลออยด์ (2.3ข) (Tredway และ Burpee, 2001)

R. solani มีบทบาทในการก่อโรคและสร้างความเสียหายให้กับถั่วเหลือง อาการที่พบ อาทิ เมล็ดเน่า (seed decay), โคนเน่า (seedling blight), ไฮโปคอติลเน่า (hypocotyl rot), รากเน่า (root rot) และใบไหม้ (foliar blight) เป็นต้น (Anderson, 1982)

อาการของโรคสำคัญที่พบในถั่วเหลืองที่เกิดจาก *R. solani*

1. โคนเน่า (seedling blight)

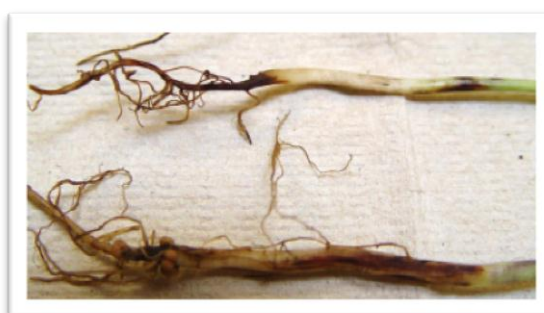
โรคโคนเน่าจัดเป็นโรคที่สำคัญในถั่วเหลือง เนื่องจากสร้างความเสียหายที่รุนแรงในหลายพื้นที่ทั่วโลก อาทิ ทำให้ผลผลิตลดลงร้อยละ 10 ใน Iowa (Tadlibana, 1968) และสูงถึงร้อยละ 40 ในพื้นที่ทางตอนใต้ของบราซิล (Lebman และคณะ, 1976) เมื่อเข้าสู่ภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เมล็ดที่เริ่มงอก (germinating seed) จะเกิดการติดเชื้อ *R. solani* ซึ่งทำให้โคนเน่าและตายในที่สุด ราจะเข้าโจมตีในส่วนของคอราก (root collar) อาการของโรคโคนเน่าในระยะแรกจะมีลักษณะช้ำน้ำ (water-soaked reddish) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากโคนต้นเหนือพื้นดิน (รูปที่ 2.4) ถูกทำลายเป็นแผลเน่าสีน้ำตาล ในระยะต่อมารอยแผลจะแห้งมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น โดยแผลจะลุกลามเข้าไปถึงส่วนของลำต้น ตัดการลำเลียงน้ำอาหาร และลดอัตราการเจริญของไฮโปคอติล (Grau และ Martison, 1971) ส่งผลให้ราชนิดอื่นเข้าสู่ถั่วเหลืองได้ง่ายขึ้น ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคเน่าคอดิน (damping off) และรากเน่า (root rot)



รูปที่ 2.4 อาการโคนเน่า ลักษณะเป็นแผลสีน้ำตาลแดงในต้นกล้าบริเวณลำต้นส่วนล่างที่ระดับพื้นดิน (Mueller, 2015)

2. รากเน่า (root rot)

เมื่อต้นกล้าเหลืองติดเชื้อ *R. solani* จะเกิดแผลสีน้ำตาล ไปจนถึงน้ำตาลแดงบริเวณส่วนนอกของฐานลำต้น (outer cortical layer) และรากแขนง (lateral root) (Sinclair, 1989) (รูปที่ 2.5) โดยจะไม่พบอาการนี้ในส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเหนือดินขึ้นไป แต่จะสังเกตเห็นอาการของโรคจากใบซีดเหลือง (chlorosis) และการเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงัก เหี่ยวและตายในที่สุด รากจะเข้าทางขนรากและรากแขนงได้ง่ายกว่าทางรากแก้ว (Orellana และคณะ, 1976) เมื่อพืชติดเชื้อ *R. solani* จะง่ายต่อการติดเชื้ออื่นๆ เช่น *Fusarium oxysporum* ซึ่งถือเป็นเชื้อฉวยโอกาส (secondary invader) และสามารถก่อโรคร่วมกัน (co-invader) เนื่องจากรากเน่าอาจเกี่ยวข้องกับรามากกว่า 1 ชนิด และอาการของโรคก็จะรุนแรงกว่าโรคที่เกิดจากราเพียงชนิดเดียว (Datnoff และ Sinclair, 1988) อาการรากเน่าและไฮโพคอติลเน่าในถั่วเหลืองมักเกิดในสภาพอากาศชื้นและอุณหภูมิดินอยู่ในช่วง 25-29 องศาเซลเซียส และโรคจะระบาดในช่วงอากาศเย็นไปจนถึงอบอุ่น (Sinclair, 1989)



รูปที่ 2.5 อาการรากเน่าในถั่วเหลือง จะเกิดแผลสีน้ำตาล ไปจนถึงน้ำตาลแดงบริเวณส่วนนอกของฐานลำต้น และรากแขนง (lateral root) (Wise และคณะ, 2015)

3. ใบไหม้ (arial blight)

อาการไหม้เกิดได้ในส่วนของลำต้น ใบและฝักของถั่วเหลือง อาการในช่วงแรกจะเป็นจุดเทาถึงน้ำตาลและอาจพบสเคลอโรเทียมขนาดเท่าหัวเข็ม (pinhead-size) ที่บริเวณกลางจุดของอาการ (Joye และคณะ, 1990) ใบที่ติดเชื้อจะมีลักษณะซ้มน้ำ (water-soaked) และจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดงไปจนถึงดำ และใบร่วงในที่สุด (รูปที่ 2.6) จากนั้นส่วนที่ติดเชื้อจะแพร่ขยายจากจุดหนึ่งบริเวณใบ ครอบคลุมทั้งใบ และแพร่ขยายไปยังฝัก



รูปที่ 2.6 อาการลักษณะซ้มน้ำบริเวณใบ โดยเปลี่ยนจากสีเขียวจะกลายเป็นสีน้ำตาลแดง (Wise และคณะ, 2015)

โรคใบไหม้พบมากในประเทศสหรัฐอเมริกาเนื่องจากแพร่ระบาดในสภาพอากาศอบอุ่นและพื้นที่ที่มีความชื้น (Anderson, 1982) โดยในช่วงฤดูฝนเชื้อจะอยู่ในดินที่มีสเคลอโรเทียม หรือดำรงชีวิตในรูปผู้ย่อยสลายแบบอิสระ (saprophyte) เมื่อถึงภาวะที่เหมาะสมจะเข้าสู่รากพืชและเกิดการติดเชื้อในช่วงแรกบริเวณใบ (Yang และคณะ, 1991) เมื่อฝนตกอีกครั้งเชื้อจะแพร่ระบาดไปยังใบถัดไปและต้นข้างเคียงได้ในรูปของเส้นใย และจะสังเกตเห็นอาการของโรคชัดเจนในช่วงการออกดอก ในช่วงที่ภาวะอากาศอบอุ่น อุณหภูมิประมาณ 25-26 องศาเซลเซียส และมีความชื้นในอากาศ โรคจะแพร่ระบาดได้รวดเร็ว และมีความรุนแรงสูง ส่งผลต่อผลผลิตถั่วเหลือง ซึ่งจะเห็นว่าฝน ความชื้น และสภาพอากาศอบอุ่น เป็นปัจจัยสำคัญในการระบาดของโรค ดังนั้นฤดูการเพาะปลูก (growth season) จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องตระหนักถึง (Sinclair, 1989)

4. ใบติด (web blight)

เกิดจากการกระจายของไมโครสเคลอโรเทียมของรา (Yang และคณะ, 1991) พบอาการนี้บริเวณใบ ใบเลี้ยง และฝัก ลักษณะอาการจะมองเห็นเส้นใยสีขาวเจริญบนใบและใบเลี้ยง โดยจะเจริญปกคลุมและแพร่ไปยังใบข้างเคียงเกิดเป็นร่างแหคล้ายใยแมงมุม (รูปที่ 2.7) ใบที่เป็นโรคจะเหี่ยวและทำให้การเจริญของต้นหยุดชะงัก และจะแพร่ไปยังฝักซึ่งส่งผลต่อผลผลิตถั่วเหลือง (Galindo และคณะ, 1983)



รูปที่ 2.7 อาการใบติดบริเวณใบ (Allen, 2011)

การควบคุมโรคที่เกิดจาก *R. solani* ในถั่วเหลืองมีหลากหลายวิธี อาทิ การจัดการด้านการเพาะปลูก (cultural practice) โดยการเลือกใช้เมล็ดพันธุ์ปลอดโรค, การควบคุมระยะห่างระหว่างต้นในการปลูกที่เหมาะสม (Joye และคณะ, 1990) ร่วมกับการควบคุมโรคด้วยสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว มักนิยมใช้ pentachloronitrobenzene (PCNB) และ chloroneb (1,4-dichlor-2,5-dimethoxybenzol) ซึ่งยับยั้ง *R. solani* ได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำเพาะ (Kucharek, 1982)

อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคในถั่วเหลืองอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อในหลายๆ ด้าน อาทิ เพิ่มต้นทุนการผลิต ส่งผลให้เชื้อก่อโรคและแมลงเกิดการต้านทานต่อสารเคมี รวมถึงปัญหาเกิดสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตและปัญหาสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นหลายๆประเทศทั่วโลกจึงเริ่มกำหนดนโยบายการลดปริมาณการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชลงโดยพยายามหาวิธีการควบคุมศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีหรือหาสิ่งทดแทน เพื่อให้มีการใช้สารเคมีลดลง

การควบคุมโรคในถั่วเหลืองโดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological control) หมายถึง การยับยั้งการเจริญ หรือการยับยั้งการเพิ่มจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งโดยใช้สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง (Cook, 1993) การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นการลดปริมาณประชากรและลดกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ตลอดจนสารพันธุกรรมหรือผลผลิตจากสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2546) การควบคุมจุลินทรีย์ในพืชโดยวิธีนี้ จะใช้ศัตรูทางธรรมชาติของจุลินทรีย์ก่อโรคในการกำจัดหรือควบคุมประชากร (Cook, 1993) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นอยู่แล้วตามธรรมชาติในระบบนิเวศ (Schouten และคณะ, 2004) โดยอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และพืช โดยกลไกการควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.4 อาทิ การแก่งแย่งอาหารและที่อยู่อาศัย (competition) เกิดขึ้นในภาวะที่สิ่งมีชีวิตมากกว่าหนึ่งชนิดมีความ

ต้องการทรัพยากรเดียวกันเพื่อการอยู่รอดและการดำรงชีวิตในบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) จุลินทรีย์จะแก่งแย่ง ออกซิเจน และพื้นที่บริเวณผิวรากที่มีจำกัด, การผลิตสารยับยั้งการเจริญ (antimicrobial substance) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) สารประกอบเหล่านี้ถูกผลิตขึ้นในระยะหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญและไม่ใช้สารตัวกลาง (intermediary) ที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมหลัก โดยจะมีโครงสร้างที่แตกต่างจากปกติหรือเป็นสารพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 2.4 กลไกการควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Pal และ Gardener, 2006)

ประเภทการยับยั้ง	กลไก	ตัวอย่าง
การยับยั้งทางตรง (direct antagonism)	การเป็นปรสิต/การล่า (hyperparasitism/predation)	<i>Ampelomyces quisqualis</i> <i>Lysobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
การยับยั้งแบบผสม (mixed-path antagonism)	สารปฏิชีวนะ	2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) สารฟีนอลผลิตโดย <i>Pseudomonas fluorescens</i> ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด สารฟีนาซีน (phenazine) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบบที่เรียและราบางชนิด สารต้านแบคทีเรียในกลุ่มไซคลิกลิโปเปปไทด์ (cyclic lipopeptide)
	เอนไซม์ย่อยสลาย	ไคตินเนส, กลูคาเนส, โปรตีเอส
	การรบกวนทางกายภาพ/เคมี (physical/chemical interference)	การปิดกั้นรูในดิน การใช้สัญญาณการออก การแทรกสัญญาณข้ามโมเลกุล
การยับยั้งทางอ้อม (indirect antagonism)	การแก่งแย่ง (competition)	สารที่ปลดปล่อยออกมาหรือไหลซึมผ่าน การบริโภค (consumption) ไซโตโรพอร์ การแก่งแย่งที่อยู่อาศัย
	ความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน (induction of host resistance)	สัมพันธ์กับผนังเซลล์ของเชื้อรา และตรวจหาเชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องหรือรูปแบบโมเลกุล และเป็นตัวกลางการเหนี่ยวนำการสร้างฮอริโมนพืช

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมทางชีวภาพ มีดังนี้

Menendez และ Godeas (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Trichoderma harzianum* BAFC 742 ในรูปของโซเดียมแอลจินเตแคปซูล ในการยับยั้งโรคในรากที่เกิดจาก *Sclerotinia sclerotiorum* ในถั่วเหลือง โดยกลไกการชักนำและการขับออกของสารปฏิชีวนะ อาทิ เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์รา ไคตินเนส และกลูคาเนส พบว่า สามารถลดการงอกของสเคลอโรเทียมได้ 62.5 % และเพิ่มการอยู่รอดของต้นถั่วเหลืองได้มากถึง 100% เปอร์เซ็นต์

Mizumoto และคณะ (2007) ศึกษาและเพิ่มผลผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มอิทูลินเอ (itulin A) จาก *B. subtilis* RB14-C ในการยับยั้ง *R. solani* พบว่าสามารถผลิตอิทูลินเอได้ถึง 4.4 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าคอดินที่เกิดจาก *R. solani* ในมะเขือเทศ และลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Senthilkumar และคณะ (2009) คัดแยกแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. HKA-15 และ *Bacillus* sp. HKA-121 (HKA-121) จากบริเวณผิวยาง ลำต้น และปมรากของถั่วเหลือง ที่สามารถยับยั้งรา *Rhizoctonia bataticola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกลไกการผลิตสารยับยั้งการเจริญเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์, ไฮเดอโรฟอรั และเอนไซม์ย่อยสลาย

Gao และคณะ (2012) ศึกษาเชื้อผสมร่วมกันของไรโซเปียมและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ในด้านประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคเรดคราวน์โรทในถั่วเหลือง (soybean red crown rot) ในภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ปัญหาการก่อโรคที่มีต่อผลผลิตถั่วเหลือง พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งโรคในรากด้วย

อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ คือ การใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มของ plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ซึ่งมีบทบาททั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

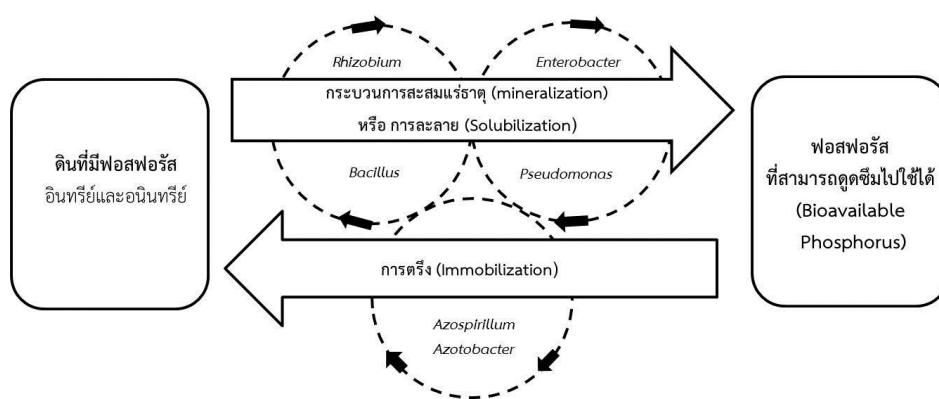
Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม (Glick, 1995) การดำรงชีวิตของ PGPR มีทั้งในรูปแบบ intracellular PGPR (iPGPR) คือเข้าไปอาศัยภายในเซลล์ของรากพืชและมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช (symbiosis) อาทิ การเข้าอาศัยและสร้างปมของไรโซเปียมกับพืชตระกูลถั่ว หรือในรูปแบบของ extracellular PGPR (ePGPR) คืออาศัยแบบอิสระในดิน (free-living form) ที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในเซลล์ของรากพืชแต่อาศัยรอบๆรากพืช อาทิ กลุ่มที่อาศัยอยู่ใกล้กับราก, กลุ่มที่อาศัยติดอยู่ที่ผิวของราก และกลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณระหว่างเซลล์ของรากในชั้น cortex โดยทั้ง 2 รูปแบบ จะมีกลไกกระตุ้นการเจริญหรือช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Gray และ Smith, 2005)

กลไกการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย PGPR ในถั่วเหลือง

ความสามารถในการเพิ่มความชื้นของธาตุอาหารพืช

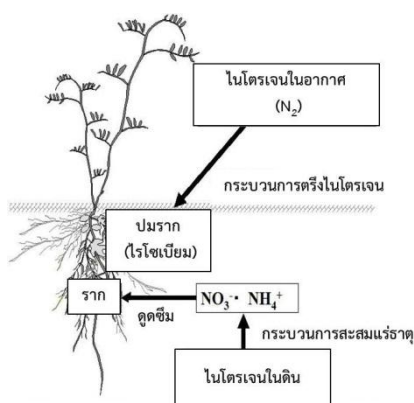
เนื่องจากปริมาณธาตุอาหารในดินมีจำกัด หรืออาจอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก (อาวูธ ณ ลำปาง, 2538) จุลินทรีย์บางกลุ่มที่มีความสามารถในการเพิ่มความชื้นของธาตุอาหารพืช อาทิ การละลาย ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (Parmar และ Sindhu, 2013; Rodríguez และ Fraga, 1999) จึงช่วยให้พืชสามารถใช้ธาตุอาหารดังกล่าวได้ง่ายขึ้น (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 แผนผังการละลายของฟอสฟอรัสในดิน โดย Rhizobacteria ดัดแปลงจาก Khan และคณะ (2009)

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

จุลินทรีย์บางกลุ่มมีความสามารถในการเข้าสร้างปมราก และดำรงชีวิตในภาวะพึ่งพาซึ่งกันและกัน (symbiosis) ร่วมกับถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่ว จุลินทรีย์ดังกล่าวมีบทบาทในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) (Kim และ Rees, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม ดัดแปลงจาก Sato (2014)

ความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตฮอร์โมนพืช

อินโดล-3-แอซิดิกแอซิด (indole-3-acetic acid (IAA)) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฮอร์โมนออกซิน (auxin) มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell division), กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) (Davies, 2010) PGPR สามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยใช้ทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นสารตั้งต้น และมีวิถีในการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป (Spaepen และคณะ, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ดังนี้

วิถีอินโดล-3-อะเซตาไมด์ (IAM)

อาศัยการทำงานของเอนไซม์ ทริปโตเฟนโมโนออกซิจีเนส (tryptophan monooxygenase) ซึ่งสังเคราะห์โดยยีน *iaaM* เปลี่ยนสารตั้งต้นทริปโตเฟน ไปเป็น IAM จากนั้น IAM จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น IAA และแอมโมเนียด้วยเอนไซม์อินโดล-3-อะเซตาไมด์ ไฮโดรเลส (IAM Hydrolase) ซึ่งสังเคราะห์โดยยีน *iaaH* (รูปที่ 2.10)

โดยวิถี IAM นี้มักพบใน *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* sp. เป็นต้น

วิถีอินโดล-3 ไพรูเวท (IPA)

โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะมิโนทรานเฟอร์ส (aminotransferase) เปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น IPA จากนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์อินโดล-3-ไพรูเวทคีคาร์บอกซิลเลส (IPDC) ซึ่งสังเคราะห์โดยยีน *ipdC* ทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาการปลดปล่อยหมู่คาร์บอกซิลของ IPA ไปเป็นอินโดล-3-อะซิดิไลด์ (IAAld) และสุดท้าย IAAld เปลี่ยนไปเป็น IAA โดยการทำงานของเอนไซม์ IAAld ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.10)

โดยวิถี IPA นี้มักพบใน *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobiums*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Rhizobium* เป็นต้น

วิถีทริปตามีน (TAM)

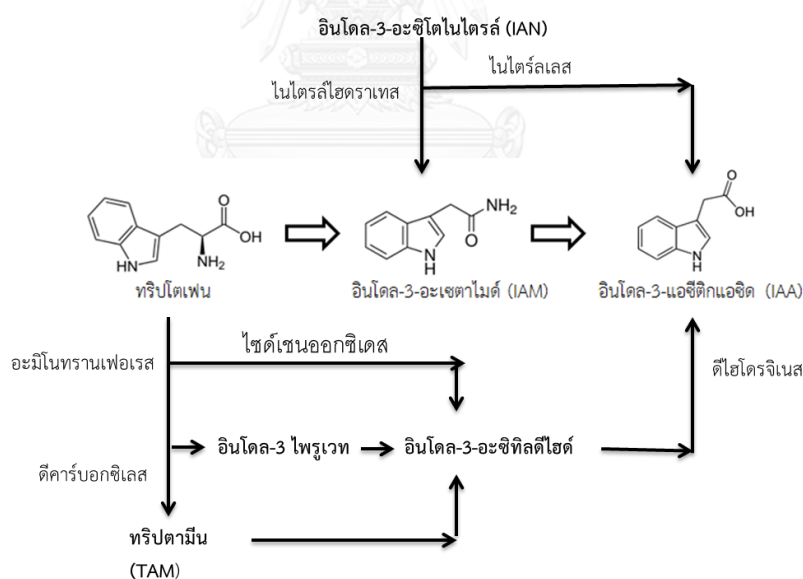
โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ทริปโตเฟนดีคาร์บอกซิเลส (tryptophan decarboxylase) เปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น TAM จากนั้น TAM จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอินโดล-3-อะซิทิลดีไฮด์ (IAAld) โดยการทำงานของเอนไซม์อะมิโนออกซิเดส และสุดท้าย IAAld เปลี่ยนไปเป็น IAA โดยการทำงานของเอนไซม์ IAAld ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.10) โดยวิถี TAM พบใน *Bacillus cereus* และ *Azospirillum*

วิถีอินโดล-3-อะซิโตนไตร์ล (IAN)

โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรล์เลส (nitrilase) เปลี่ยน IAN ไปเป็น IAA โดยตรง และโดยอ้อม โดย IAN เปลี่ยนไปเป็น IAM ด้วยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตส (nitrile hydratase) (รูปที่ 2.10)

วิถีทริปโตเฟนไซด์เซนออกซิเดส (TSO)

โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ TSO เปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น อินโดล-3-อะซิทิลดีไฮด์ (IAAld) จากนั้น IAAld จะถูกเปลี่ยนไปเป็น IAA ด้วยเอนไซม์ IAAld ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.10) โดยวิถีนี้จะพบเฉพาะใน *Pseudomonas fluorescens* CHAO



รูปที่ 2.10 แสดงการสังเคราะห์ IAA โดยวิถีต่างๆ ในแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก Spaepen และคณะ (2007)

นอกจากนี้ ฮอริโมนพืชอื่นๆ อาทิ ไซโตไคนิน (cytokinin) ก็มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การขยายตัวและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ และกระตุ้นการขยายตัวของใบ ได้เช่นกัน (Timmusk และคณะ, 1999) ฮอริโมนจิบเบอเรลลิน (gibberellin) ยังช่วยกระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ การกระตุ้นการพักตัวของพืช การสร้างขนราก และกระตุ้นการงอกของเมล็ด (Bottini และคณะ, 2004) รวมถึงการสร้างเอนไซม์ ACC ดีเอมีเนส (1-

aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) เพื่อลดปริมาณเอธิลีน (ethylene) ในพืช เนื่องจากปริมาณเอธิลีนที่มากเกินไปจะส่งผลให้การเจริญของรากผิดปกติ และลดปริมาณการเกิดปมรากในพืชตระกูลถั่วอีกด้วย (Glick, 2014)

ความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟออร์

จุลินทรีย์บางชนิดยังมีความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟออร์ (siderophore) ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ในภาวะขาดแคลนธาตุเหล็กหรือมีธาตุเหล็กในปริมาณจำกัด (Rajkumar และคณะ, 2010) ไซเดอโรฟออร์จะมีความจำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็ก โดยจะเข้าจับธาตุเหล็กในสิ่งแวดล้อม รวมเป็นโครงสร้างซับซ้อนที่เรียกว่าเฟอร์ริก-ไซเดอโรฟออร์ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่โดยการแพร่ (diffusion) กลับไปยังผิวเซลล์ (cell surface) และจะเข้าแย่งจับธาตุเหล็กกับจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ (Andrews และคณะ, 2003) อาทิ *P. fluorescence* สร้างสารไซเดอโรฟออร์ ยับยั้งเชื้อก่อโรค *Erwinia carotovora*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium glycinia* และ *Sarocladium oryzae* ในมันฝรั่ง ข้าวสาลี และถั่วเหลือง *Bradyrhizobium* sp. มีรายงานว่าสามารถสร้างสารไซเดอโรฟออร์เพื่อแข่งขันและยับยั้ง *Fusarium solani* และ *R. solani* ในทานตะวัน และถั่วเขียวได้ เป็นต้น (Sayyed และคณะ, 2013)

Kloepper และคณะ (1980) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ที่มีความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟออร์ ชนิดไพเวอร์ดีน (pyoverdine) เพื่อแย่งจับไอออนของเหล็ก ซึ่งความสามารถในการแย่งจับไอออนของเหล็กนี้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราที่ผลิตสารไซเดอโรฟออร์ได้น้อยกว่า และนอกจากนี้ยังพบว่าไซเดอโรฟออร์ชนิดซูโดแบคทีน (pseudobactin) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ B10 ยังมีความสามารถในการยับยั้ง *F. oxysporum* ในดินที่มีปริมาณเหล็กจำกัดด้วย

กลไกทางอ้อมต่อพืช ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช อาทิ การสร้างสารปฏิชีวนะ (Schouten และคณะ, 2004), ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งรากก่อโรค (Glick, 1995), ความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน (Kloepper และคณะ, 2004), และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของรากก่อโรค เป็นต้น (Whipps, 2001)

การสร้างสารปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR มีบทบาทในการหลั่งโมเลกุลสารเพื่อฆ่าหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Dowling และ O'Gara, 1994) เรียกว่า สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลต่ำที่มีอันตรายต่อการเจริญเติบโตหรือเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์อื่นๆ (Duffy และคณะ, 2003)

ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย PGPR อาทิ ไพร์โรลนิตริน (pyrrolnitrin) ที่ผลิตโดย *P. fluorescens* สายพันธุ์ BL915 สามารถป้องกันความเสียหายจากโรค damping-off ที่เกิดจาก *R. solani* ในต้นฝ้ายได้ (Hill และคณะ, 1994), 2,4-ไดอะซีทิลฟลอโรกลูซินอล (2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)) ที่ผลิตโดย pseudomonad

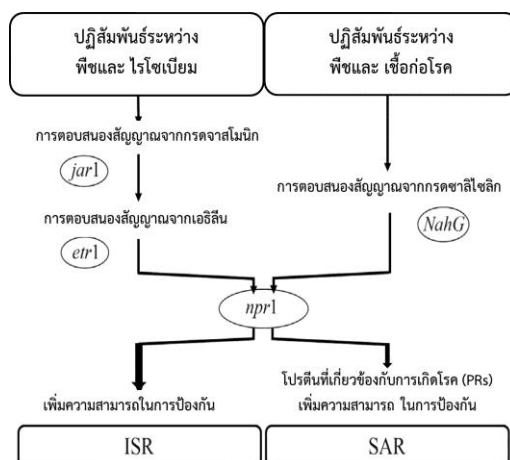
เป็นสารปฏิชีวนะที่ทำลายเซลล์เมมเบรนของ *Pythium* spp. และยับยั้งซุโอสปอร์ (zoospore) ของราน้ำได้ (de Souza และคณะ, 2003), ฟีนาซีน-1-คาร์บอกซาไมด์ (phenazine-1-carboxamide) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas chlororaphis* สายพันธุ์ PCL1391 ที่คัดแยกได้จากรากมะเขือเทศ มีความสามารถในการหลั่งธาตุเหล็กที่ละลายน้ำได้ (soluble iron) จากเฟอริกออกไซด์ที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble ferric oxide) ในภาวะความเป็นกรดเบสที่เป็นกลาง (neutral pH) ซึ่งช่วยให้ธาตุเหล็กเกิดการเคลื่อนที่ในดินได้ดีขึ้น (Hernandez และคณะ, 2004), พอลิมิกซิน (polymyxin), เซอร์คูลิน (circulin) และโคลิสติน (colistin) ที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก รวมถึงราก่อโรคอีกหลายชนิดได้ (Maksimov และคณะ, 2011)

ความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน

PGPR มีบทบาทในการยับยั้งการก่อโรคโดยกลไกกระตุ้นภูมิคุ้มกันในพืช (rhizobacteria-mediated induced systemic resistance) หรือ ISR (Van Loon และคณะ, 1998) ISR เป็นลักษณะความต้านทานรูปแบบหนึ่ง ซึ่งพืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองหลังจากการบุกรุกของเชื้อก่อโรค เมื่อพืชได้รับการกระตุ้น จะเกิดการตอบสนองทั้งในลักษณะของการป้องกันและการกำจัดเชื้อก่อโรค โดยพืชจะสังเคราะห์สารบางชนิดเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นและเพียงพอที่จะกำจัดเชื้อได้ภายหลังการติดเชื้อ (Choudhary และคณะ, 2007)

ตัวอย่างการตอบสนองแบบ ISR ของพืช อาทิ การสร้างไฟโตเล็กซิน (phytoalexin) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกเทอร์ปีนอยด์และอาลิฟาติกส์ ที่มีสมบัติเป็นพืชต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Buchanan และคณะ, 2000), การสร้างแคลโลส (callose) ซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์และสะสมของสารปีต้า-กลูแคน ที่ถูกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ปีต้า-1,3-กลูแคน โดยแคลโลสจะไปเกาะที่ผนังเซลล์ของราที่แทงผ่านเข้าสู่เซลล์ (papillae) เพื่อยับยั้งการบุกรุกของรารภายในเซลล์พืช (Lucas, 1998) และการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหรือโปรตีนพีอาร์ (pathogenesis-related protein; PR protein) ซึ่งมีสมบัติในการต้านทานโรคหรือเชื้อก่อโรคอย่างไม่จำเพาะ (Lucas, 1998) เป็นต้น

นอกจากนี้กลไกการต้านทานยังรวมถึงความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำ (systemic acquired resistance) หรือ SAR โดยทั้งสองประเภทของความต้านทานเมื่อพืชถูกการเหนี่ยวนำจะช่วยให้ส่วนของพืชที่ยังไม่เกิดการติดเชื้อทนทานต่อเชื้อก่อโรคทั้ง รา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลงได้ (Beneduzi และคณะ, 2012; Van Loon และคณะ, 1998) ISR และ SAR มีเส้นทางการส่งสัญญาณ (signaling pathway) ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.11) สำหรับ SAR จะเกิดการกระตุ้นจากเส้นทางการส่งสัญญาณของกรดซาลิไซลิก (salicylic acid (SA)) ในขณะที่ ISR ได้รับเส้นทางการส่งสัญญาณจากกรดจาสโมนิก (jasmonic acid (JA)) และเอธิลีน (ethylene (ET)) ซึ่งการป้องกันโดย ISR จะมีความสำคัญมากกว่าแบบ SAR (Van Loon และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.11 แสดงเส้นทางการส่งสัญญาณ (Signal transduction pathways) แบบ SAR และ ISR ใน *Arabidopsis thaliana* ดัดแปลงจาก Beneduzi และคณะ (2012)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับ PGPR มีดังนี้

Cassán และคณะ (2009) คัดแยกและศึกษาประสิทธิภาพของ *Azospirillum brasilense* สายพันธุ์ Az39 และ *B. japonicum* สายพันธุ์ E109 ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญในระยะเริ่มต้นของถั่วเหลืองและข้าวโพด พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA, GA3 และ Z ซึ่งส่งผลดีต่อการเจริญของพืชได้

Tripathi และคณะ (2006) ศึกษาแบคทีเรียพวก *Pseudomonad* ที่เรืองแสงได้ (fluorescent pseudomonad (FLP)) ในบริเวณฮิมาลัยประเทศอินเดีย โดยศึกษาถึงบทบาทของแบคทีเรียที่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง และลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสจาก *Colletotrichum dematium* ได้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า 4 สายพันธุ์ ของ *Pseudomonas* sp. สามารถยึดจับกับรากพืชและส่งผลทำให้พืชมีน้ำหนักรากที่เพิ่มขึ้น รวมถึงลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ

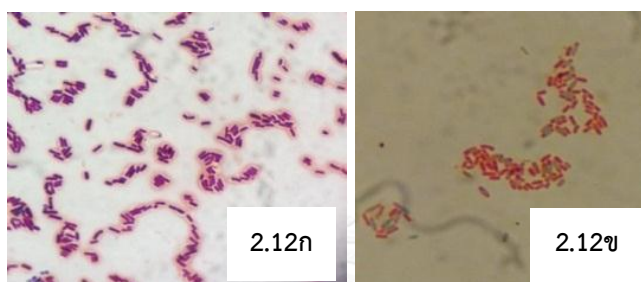
Atieno และคณะ (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. japonicum* และการทำงานร่วมกันของเชื้อกับ *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ ในถั่วเหลืองพบว่าเชื้อผสมช่วยเพิ่มการเกิดปมรากและน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ ประมาณ 2-5 และ 4-10 กรัมต่อต้น ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Masciarelli และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR จากเมล็ดถั่วเหลืองและพบว่าเป็น *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ LL2012 เมื่อศึกษากลไกในการส่งเสริมการเจริญของพืชรวมถึงบทบาทในกระบวนการตรึงไนโตรเจน การทำงานของเอนไซม์ และการผลิตฮอร์โมนพืช ร่วมกับ *B. japonicum* พบว่าช่วยเพิ่มการเกิดปมในถั่วเหลือง เพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียกับรากพืช และช่วยเพิ่มการเจริญของถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR มีหลายชนิดได้แก่ *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* และ *Serratia* (Ahemad และ Kibret, 2014)

Bacillus

Bacillus ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae *Bacillus* มีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) (Holt และคณะ, 1994) (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 แสดงภาพย้อมแกรม (2.12ก) และการย้อมสปอร์ (2.12ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Bacillus* sp. (Pongsamrangun และ Remngsamran, 2015)

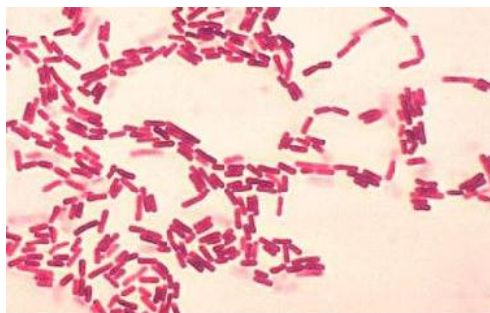
มีรายงานถึงบทบาทของ *Bacillus* spp. ในการส่งเสริมการเจริญของพืชอย่างกว้างขวาง รวมถึงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย (Kumar และคณะ, 2011) Asaka และคณะ (1996) ศึกษา *Bacillus* สายพันธุ์ RB14 พบว่าผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่มไซคลิกลิโปเปปไทด์ (cyclic lipopeptide antibiotic) ชนิดอิพิลินเอและเซอร์แฟคติน (surfactin) ที่ยับยั้ง *R. solani* ที่ก่อโรค damping-off ในมะเขือเทศ Kumar (1999) พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN), ไซเตอโรฟอรัส, โพรตีนเอส และ IAA โดยสามารถยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในถั่วเขียว Jung และ Kim (2003) พบว่า *Bacillus megaterium* KL39 ผลิตสารยับยั้งรา KL39 ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Phytophthora* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไหม้ในพริกแดงได้

Rhizobium

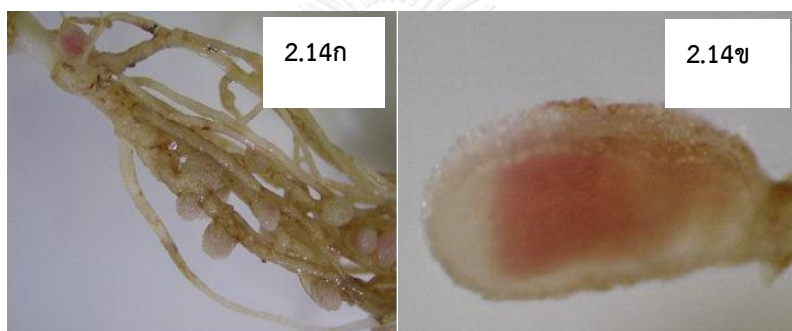
ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งยาว (rod shape) (รูปที่ 2.13) จัดอยู่ใน Class Alpha-proteobacteria บทบาทของไรโซเบียมในฐานะ PGPR อาทิ ผลิตฮอร์โมนพืช, ผลิตไซเตอโรฟอรัส, ผลิต HCN, ช่วยละลายสารอินทรีย์ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (Siddiqui และคณะ, 2006) รวมถึงสามารถเข้าเกาะกับรากพืชได้ดี (Antoun และคณะ, 1998)

ไรโซเบียมมีความสามารถในการเข้าสร้างปมในรากพืชตระกูลถั่วได้ (รูปที่ 2.14) โดยไรโซเบียมจะเข้าไปอาศัยอยู่ในปมในรูปของแบคทีเรีย (bacteroid) และช่วยในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืช (Alexander, 1984) ทั้งนี้ไรโซเบียมแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเข้าสร้างปมแบบจำเพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่วแต่ละ

ชนิดได้แตกต่างกัน สำหรับในถั่วเหลืองนั้น ไรโซเบียมที่มีความจำเพาะในการเข้าสร้างปม ได้แก่ *Rhizobium fredii*, *B. japonica* และ *Bradyrhizobium elkanii* (Dilworth และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.13 แสดงภาพย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไรโซเบียม (Smith, 2016)



รูปที่ 2.14 ปมรากพืชตระกูลถั่ว (2.14ก) และ ภาพตัดขวางปมรากที่เกิดจากไรโซเบียม สายพันธุ์ Y629 (2.14ข) (Sato, 2014)

กระบวนการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่ว

ไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่ว เมื่อดำรงชีวิตร่วมกับพืชตระกูลถั่วในภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) การเข้าสร้างปมเริ่มจากการที่รากพืชปล่อยสารจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ออกมา เพื่อกระตุ้นให้ไรโซเบียมเคลื่อนตัวสู่รากพืช และกระตุ้นกลุ่มของยีนในไรโซเบียมที่ควบคุมการสร้างปม (nodulation gene หรือ *nod* gene) ให้มีการแสดงออกเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพวกลิโปพอลิแซ็กคาไรด์หรือที่เรียกว่า nod factor โดย nod factor จะทำให้รากพืชตระกูลถั่วเกิดการโค้งงอ และเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างของปม ในระยะนี้ไรโซเบียมจะเคลื่อนตัวเข้าสู่รากของพืช ไปตามโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread ซึ่งยีนในเซลล์รากพืชจะแสดงออกและควบคุมการเกิดโครงสร้างนี้และโครงสร้างที่จะขยายตัวออกมาเป็นปมต่อไป (Long, 1989)

เมื่อไรโซเบียมสามารถเข้าสร้างปมได้แล้ว ก็จะเริ่มขบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้กับพืช โดยสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการควบคุมกลไกปฏิกิริยาเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนให้เป็น

แอมโมเนีย กลุ่มของยีนในไรโซเบียมที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนนี้เรียกว่า *nif* gene ซึ่งจะแสดงออกเพื่อทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ยังพบยีนในกลุ่ม *fix* gene ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนถ่ายอิเล็กตรอน และพลังงานในขบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย (Dilworth และคณะ, 2008)

บทบาทในการยับยั้งรากอโรคโดยแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมมีรายงานไว้บ้างเล็กน้อย อาทิ *Sinorhizobium meliloti* มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ร้อยละ 5-50 และไม่ส่งผลต่อการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพากับพืช (Antoun และคณะ, 1998; Reddy, 2014) การใช้ไรโซเบียมที่คัดแยกจากถั่วแขก (snap bean) ในการยับยั้ง *F. solani* f. sp. *phaseoli* เพื่อควบคุมโรคเน่า (Buonassisi และคณะ, 1986) เป็นต้น

ดังกล่าวข้างต้น จุลินทรีย์ที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง เช่น กลุ่มไรโซเบียม มักไม่ค่อยพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งรากอโรคในถั่วเหลือง ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในถั่วเหลืองจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ตัวอย่างการใช้เชื้อผสมของไรโซเบียม และ PGPR ในถั่วเหลือง (Verma และคณะ, 2010)

Dashti และคณะ (1998) ศึกษา *B. japonicum* ร่วมกับ *Serratia liquefaciens* 2-68 และ *Serratia proteamaculans* 1-102 พบว่าช่วยเพิ่มการสร้างปม, เพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจน, เพิ่มผลผลิตโปรตีนและไนโตรเจน

Chebotar และคณะ (2001) ศึกษาการใช้ *B. japonicum* ร่วมกับ *P. fluorescens* พบว่าช่วยเพิ่มการยึดเกาะราก และเพิ่มจำนวนปมราก

Iruthayathas และคณะ (1983) ศึกษาการใช้ *B. japonicum* ร่วมกับ *Azospirillum* พบว่าเพิ่มการสร้างปม, เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และส่งเสริมการเจริญพืช

Polonenko และคณะ (1987) ศึกษาการใช้ *B. japonicum* ร่วมกับ *P. putida*, *P. fluorescens* และ *Aeromonas hydrophila* พบว่าช่วยเพิ่มน้ำหนักและจำนวนปมราก

การใช้ไรโซเบียมที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในถั่วเหลืองจะช่วยทั้งในด้านส่งเสริมการเจริญและในด้านการยับยั้งรากอโรคในถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR โดยเน้นศึกษาเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียพวกไรโซเบียมที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองและแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในถั่วเหลือง โดยมีเป้าหมายเพื่อนำเชื้อผสมของแบคทีเรียดังกล่าวไปพัฒนาเป็นเชื้อผสมสำหรับใช้กับพืชถั่วเหลือง เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีและยากำจัดศัตรูพืชต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรวดละเอียดปลอดเชื้อ
2. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International Co., Ltd., England
3. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
4. กระดาษดินเผา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร
5. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
6. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
7. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น G27
9. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
10. เครื่องซั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ss672-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
14. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
16. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA พร้อมหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
18. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop Spectrophotometer) รุ่น 2000 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
19. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan

20. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
21. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
22. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
23. ทรายหยาบปลอดเชื้อ
24. ผ้าขาวบางปลอดเชื้อ
25. แผ่นสะท้อนแสง ของบริษัท Siam grow light Co., Ltd., China
26. ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
27. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
28. ชุดอุปกรณ์ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพรซิส ได้แก่ ภาชนะเจล กล่องใส่สารละลาย แผ่นหีและแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
29. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
30. Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร
31. หลอดไฟเสมือนแสงแดด LED Grow Light 18 W ของบริษัท Siam grow light Co., Ltd., China
32. โหลแก้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
33. อ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14, รุ่น W760 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดอินโดลอะซีติก (3-Indole acetic acid) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
4. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
5. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
6. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
7. โกลแท็กกรีน (GoTaq® Green Master Mix) ของบริษัท Promega Corporation, USA
8. คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
9. คริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) ของบริษัท Merck, Germany
10. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
11. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA

12. เคซีนเอนไซม์ไฮโดรไลเซต ไทป์ I (casein enzymatic hydrolysate, type-I) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
13. ไคติน (chitin) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
14. โครมอะซัวร์เอส (chrome azurol S, CAS) ของบริษัท Fluka, Switzerland
15. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
16. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
17. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
18. ซาฟานิน โอ (safanin O) ของบริษัท Carlo Erba Reagents, USA
19. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ($NaOCl$) ของบริษัท KAO Industrail, Thailand
20. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
21. โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) ของบริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) ของบริษัท Merck, Germany
24. ดีเอ็นเอซอลไดเรค (DNAzol® direct) ของบริษัท Molecular research center, INC., USA
25. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
26. นมขาดมันเนย (skim milk) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
27. 1-แนปทอล (1-naphthol) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. บรอมไทมอลบลู (bromothymol blue) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
29. แบคโตเปปโทน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
30. แป้ง (soluble starch) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
31. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
32. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
33. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
34. ผงสกัดจากมันฝรั่ง (potato dextrose) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
35. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
36. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
37. โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
38. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
39. ฟีนอลเรด (phenol red) ของบริษัท Merck, Germany
40. เมทิลเรด (methyl red) ของบริษัท Merck, Germany
41. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia

42. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
43. มาลาไคท์ กรีน (malachite green) ของบริษัท Carlo Erba Reagents, USA
44. โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
45. แลคโตส (lactose) ของบริษัท Merck, Germany
46. สารละลายโคแวกสำหรับทดสอบอินโดล (Kovac's reagent) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
47. สารละลายสำหรับทดสอบออกซิเดส (oxidase reagent) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
48. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
49. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป ฟีนีฟีนอลเรด (Phenol Red Broth Base) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
50. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปยีสต์แมนนิทอล (Yeast Mannitol Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
51. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำเร็จรูป ยีสต์แมนนิทอล ที่มีคองโกเรด (Yeast Mannitol Agar w/congo red) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
52. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท J.T. Baker, USA
53. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ของบริษัท Sigma, USA
54. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของบริษัท BDH, England
55. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA
56. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
57. แอสพาราจีน (L-asparagine) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
58. ไอโอดีน (iodine) ของบริษัท Merck, Germany
59. ไอรอน (III) คลอไรด์ ($FeCl_3$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
60. ไอรอน (III) ซิเตรต ($FeC_6H_6O_7$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
61. ไอรอน (III) ซัลเฟต ($FeSO_4$) ของบริษัท Ajaz Finechem Pty Ltd, Australia
62. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของบริษัท Merck, Germany
63. เฮกซะเตคซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (HDTMA) ของบริษัท Sigma, USA
64. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentus, USA
65. 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) ของบริษัท Bio basic INC., Canada
66. GeneJET PCR Purification Kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, (EU) Lithuania
67. SeaKem ® LE Agarose For gel electrophoresis ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
68. TE buffer ของบริษัท Bio Excellence International Tech Co., Ltd., Thailand

3.3 ไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
41F	5'-GCT CAG ATT GAA CGC TGG CG-3'	Herrera-Cervera และคณะ (1999)
1488R	5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC ACC-3'	Herrera-Cervera และคณะ (1999)
9F	5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'	Nilsson และ Strom (2002)
1510R	5'-TAC GGY TACCTT GTT ACG ACT T-3'	Nilsson และ Strom (2002)

3.4 จุลินทรีย์

3.4.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลถั่ว จำนวน 93 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่คัดแยกจากปมรากถั่วเหลือง (root nodule-forming-bacteria) จำนวน 7 ไอโซเลต ได้รับจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3.4.2 ราก่อโรคในพืช

ราที่ก่อโรคในถั่วเหลืองได้รับจากกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Pythium* sp. และ *R. solani*

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเหลว Nutrient Broth (NB), อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA), อาหารเหลว Yeast Mannitol broth (YMB) และอาหารแข็ง Yeast Mannitol Agar with Congo Red (YMCA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ)

3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรา ได้แก่ อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) และอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5 และ 6 ตามลำดับ)

3.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.6.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว NB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วผสมกับ 15% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.2 การเก็บรักษา

เลี้ยงราบนอาหารแข็งเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.7 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค

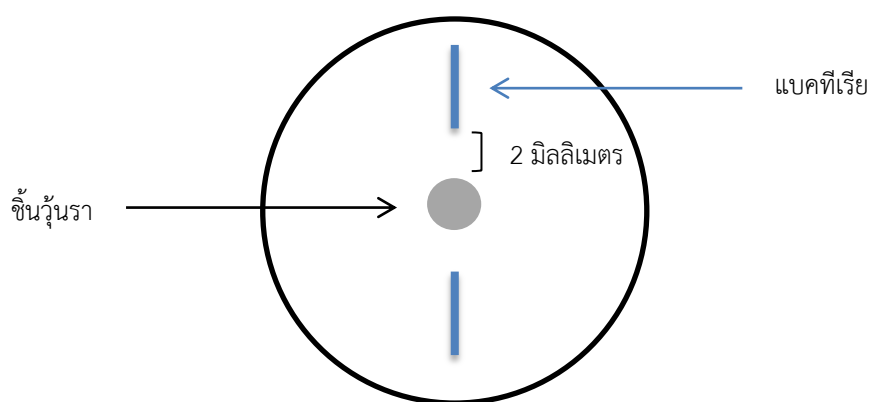
3.7.1 การเตรียมแบคทีเรียและราเพื่อใช้ในการทดสอบ

3.7.1.1 นำแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 93 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียที่คัดแยกจากปมรากถั่วเหลือง จำนวน 7 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.7.1.2 นำราที่ก่อโรคในถั่วเหลือง ที่ได้จากกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Pythium* sp. และ *R. solani* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

3.7.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคด้วยวิธี Dual culture ตามวิธีของ Verma และ Kharwar (2006)

เจาะชิ้นวงุนราที่เตรียมในข้อ 3.7.1.2 ด้วย cork borer นำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นขีดแบคทีเรียในข้อ 3.7.1.1 ลงบนจานอาหารเดียวกัน โดยเว้นระยะห่างจากรา 2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3.1 ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นวงุนราโดยไม่มีแบคทีเรีย บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการยับยั้งรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 รูปแบบการลงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรควิธี dual culture

3.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตปัจจัยต่างๆ ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองและในการยับยั้งราก่อโรค

3.8.1 การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนน้ำใสของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรค

3.8.1.1 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนน้ำใสของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคตามวิธีของ Kumar และคณะ (2010) โดยนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราตามข้อ 3.7 มาทดสอบประสิทธิภาพของส่วนน้ำใสของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรค โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเตรียมส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสที่ได้มากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำส่วนใสที่ปราศจากเชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) เทเพลท แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง

3.8.1.2 เจาะชิ้นวันราโรคพีชจากข้อ 3.7.1.2 ด้วย cork borer แล้วนำมาวางบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.8.1.1 บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.8.1.3 ตรวจสอบการยับยั้งราโดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งคืออาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราตามสูตรด้านล่าง (Verma และ Kharwar, 2006) คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ดีเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา} = 1 - \left(\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของราของชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของราของชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

3.8.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราตามข้อ 3.7 มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ที่มีรายงานว่ามียับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ เซลลูเลส, โปรตีเอส และไคติเนส โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ 2% (w/v) 1-carboxymethylcellulose (CMC) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7), 3% (w/v) powdered skim milk agar plate (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) และ 1% (w/v) colloidal chitin agar plate (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) บ่มจานอาหารที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-8 วัน จากนั้นตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ดังนี้

การผลิตเซลลูเลสโดยการเติมสารละลายคองโกเรด (congo red solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) และตามด้วย 1 M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงในจานอาหารที่มี CMC สังเกตผลบวกจากโซนใสรอบโคโลนี (Zhang และคณะ, 2009) ตรวจสอบการผลิตไคติเนสโดยการเติมสารละลายสารละลายคองโกเรด และสังเกต

ผลบวกจากโซนไฮรอปโคโลนี และการผลิตโปรตีนเอสสังเกตโซนไฮรอปโคโลนีหลังจากบ่มจานอาหารที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-8 วัน

3.8.3 การทดสอบการผลิต กรดอินโดล-3-แอซีติก (IAA)

ตรวจสอบการผลิต IAA ตามวิธีของ Fukuhara (1994) ดังนี้

3.8.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานของ IAA บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สาร IAA บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น ได้แก่ 10, 20, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Salkowsky reagent (0.01 M FeCl_2 ใน HClO_4) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ในอัตราส่วน 1:2 บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 530 นาโนเมตร (Costacurta และคณะ, 1998) บันทึกผลและสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณ IAA บริสุทธิ์

3.8.3.2 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีการเติม ทริปโตเฟน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียจากปมรากแก้วเหลือง จำนวน 7 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB ที่มีการเติม ทริปโตเฟน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.8.3.3 นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาผสมกับสารละลาย Salkowsky reagent ในอัตราส่วน 1:2 บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร (Costacurta และคณะ, 1998) บันทึกผลปริมาณ IAA ที่ผลิตได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ในข้อ 3.8.3.1

3.8.4 การทดสอบการผลิตสารไซโตโรพอร์

ทดสอบการผลิตสารไซโตโรพอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S (CAS) ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ของเหล็ก โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มเมื่อเกิดสารประกอบ chelator-iron (III) complex ทำการทดลองโดย เลี้ยงแบคทีเรียที่ย้ายรื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแบคทีเรียปมรากแก้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่ย้ายรื้อทั้ง 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมรากแก้วเหลือง 7 ไอโซเลต ให้เท่ากัน ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ปิเปตลงบนแผ่นดิสก์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นสังเกตวงสีส้มรอบโคโลนี (Schwyn และ Neilands, 1987)

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง

3.9.1 การเตรียมเมล็ดถั่วเหลือง

ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวเมล็ดถั่วเหลืองเมล็ดตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (1994) โดยคัดเลือกเมล็ดถั่วเหลืองที่มีความสมบูรณ์และมีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าร้อยละ 70 มาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดฝุ่นผงและดินที่ติดมากับเมล็ด และทำให้แห้งด้วยการซับด้วยกระดาษซับ จากนั้นแช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำเมล็ดมาแช่ใน 2.5 % โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง และแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง และบ่มเมล็ดเป็นเวลา 2-3 วัน ในภาชนะที่มีความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จนสังเกตเห็นรากงอกจากเมล็ดแล้ว

3.9.2 การเตรียมเชื้อผสมของแบคทีเรีย

หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทึบแสง (optical density) และจำนวนแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการกำหนดจำนวนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ดังนี้

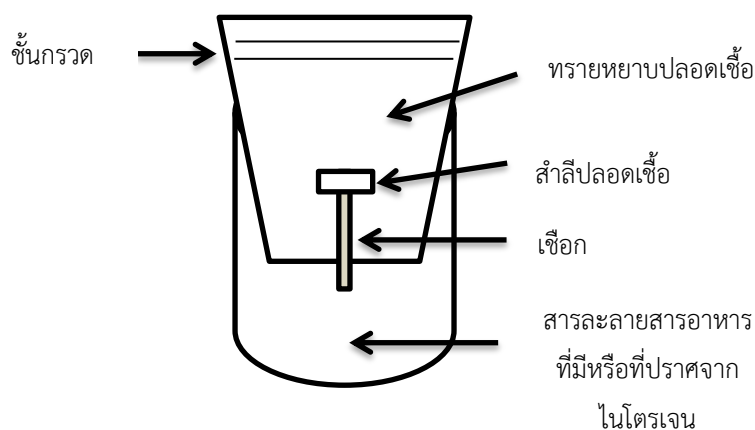
3.9.2.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง จำนวน 7 ไร่ไฮเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน

3.9.2.2 เมื่อครบเวลา นำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 แล้ววัดค่าความทึบแสงที่ 560 นาโนเมตร และตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งนำมาหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยวิธี viable plate count โดยนำมาเจือจางให้มีความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-8} และปิเปต 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเจือจางไปเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA และ YMCA บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชม และ 7 วัน ตามลำดับ แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)

3.9.2.3 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทึบแสงและจำนวนแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการกำหนดจำนวนแบคทีเรียที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียเพื่อทดสอบกับพืชต่อไป

3.9.3 การเตรียมชุดปลูกถั่วเหลืองในขวด

3.9.3.1 เตรียมชุดทดลอง ขวด Leonard's jar โดยดัดแปลงจาก Devine (1977) โดยชุดขวด Leonard's jar ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนด้านบนทำจากกระดาษดินเผา ซึ่งบรรจุทรายหยาบ 500 กรัม และโรยกรวดหยาบ 50 กรัม บนผิวทราย และส่วนด้านล่างเป็นโหลแก้วซึ่งบรรจุสารละลายสารอาหารที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจน (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) โดยมีเชือกพาดเชื่อมระหว่างส่วนบนและส่วนล่าง ดังรูปที่ 3.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้งาน



รูปที่ 3.2 ส่วนประกอบของขวด Leonard's jar

3.9.3.2 นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.9.1 มาปลูกในขวด Leonard's jar ซึ่งบรรจุสารละลายสารอาหารที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจนตามข้อ 3.9.3.1 จำนวน 5 เมล็ด/ขวด

3.9.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ในขวด Leonard's jar

เตรียมชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกถั่วเหลืองไว้ตามข้อ 3.9.3 โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ข้าง ดังนี้

- 1) ชุดควบคุมหนึ่ง ในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน, ไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง
- 2) ชุดควบคุมสอง ในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, ไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง
- 3) ชุดทดสอบ ในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.2

โดยเติม 1 มิลลิลิตรของเชื้อผสมของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ที่เตรียมในข้อ 3.9.2 ลงบริเวณโคนต้นถั่วในชุดทดสอบ วางขวดที่อุณหภูมิห้อง ที่มีอากาศถ่ายเท และมีการให้แสงสม่ำเสมอ (หลอดไฟเสมือนแสงแดด 12 W) หลังจากนั้น 7 วัน ตัดต้นถั่วให้เหลือ 3 ต้น/ขวด เติมน้ำสารละลายอาหารทุก 3-4 วัน โดยไม่ให้น้ำสารละลายแห้ง วางขวดที่อุณหภูมิห้อง ที่มีอากาศถ่ายเท และมีการให้แสงสม่ำเสมอ (หลอดไฟเสมือนแสงแดด 12 W) เป็นเวลา 30-45 วัน หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วันแล้ว สังเกตการเจริญของต้นถั่วเหลือง บันทึกสีของใบ, ความสูงของลำต้น, ความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก และจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางปม เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ให้ประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญและการเกิดปมรากได้ดีเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

3.9.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ในหลอดทดลอง

เพื่อทดสอบระบบการเจริญของถั่วเหลืองในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับระบบการเจริญของถั่วเหลืองในขวด Leonard's jar ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.9.4 แต่ใช้การปลูกถั่วเหลืองในหลอดทดลองขนาด 2×15 นิ้ว ที่บรรจุอาหารแข็งเอียง Fahräeus ที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจน (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) (Barker และคณะ, 2006)

3.10 การทดสอบความเข้ากันได้ของการแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย

(Sundaramoorthy และ Balabaskar, 2012)

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง จำนวน 7 ไอโซเลต มาเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบ/นาที เป็น เวลา 7 วัน เกลี่ยแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYMA บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างหน้า จากนั้น ปิเปิด 100 ไมโครลิตรของแบคทีเรียที่มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งรา 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ ปลอดเชื้อ จากนั้นวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYMA ที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3-5 วัน สังเกตการยับยั้งกันและกันจากโซนใสรอบแผ่นกระดาษกรอง คัดเลือกคู่แบคทีเรียที่ไม่พบการยับยั้ง เพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

3.11 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมการเกิดโรคจากราในถั่วเหลือง

3.11.1 การทดสอบการเกิดโรคในถั่วเหลืองด้วยรา

เตรียมเมล็ดถั่วตามขั้นตอนในข้อ 3.9.1 จากนั้นนำเมล็ดที่รากงอกแล้วไปเพาะต่อในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 2×15 นิ้ว ที่มีอาหารแข็งเอียง Fahräeus ที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจน (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) (Barker และคณะ, 2006) และเลี้ยงราตามข้อ 3.7.1.2 แล้วตัดชิ้นรุ่นที่มีราด้วย cork borer แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี เมล็ดถั่วเหลือง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มหลอดที่อุณหภูมิห้อง และมีการให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน (หลอดไฟเสมือน แสงแดด 12 W) จากนั้นสังเกตและบันทึกผลการเกิดโรคในถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเฉพาะถั่ว เหลืองแต่ไม่มีรา เลือกรากที่สามารถก่อโรคในถั่วเหลืองได้ชัดเจน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.11.2 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง

3.11.2.1 เตรียมเชื้อผสมของแบคทีเรียและราก่อโรค โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง และแบคทีเรียจากปมรากแก้วเหลืองที่เจริญเข้ากันได้จากข้อ 3.10 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YMB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ปรับให้เชื้อแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร สำหรับบราที่ก่อโรคในแก้วเหลือง (จากการทดสอบในข้อ 3.11.1) นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน และตัดชิ้นวุ้นที่มีราด้วย cork borer เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3.11.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อผสมในการยับยั้งราก่อโรคในแก้วเหลือง

ปลูกเมล็ดแก้วเหลืองในหลอดทดลองอาหารแข็งเอียง Fahræus โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ได้แก่

- 1) ชุดควบคุมหนึ่ง ในอาหารที่มีไนโตรเจน, ใส่ราก่อโรค
- 2) ชุดควบคุมสอง ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, มีแบคทีเรียยับยั้งราปริมาณ 1 มิลลิลิตร, ใส่ราก่อโรคหลังจากแบคทีเรียเป็นเวลา 3 วัน
- 3) ชุดทดสอบหนึ่ง ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, มีเชื้อผสมของแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตร, ใส่ราก่อโรคหลังจากแบคทีเรียเป็นเวลา 3 วัน
- 4) ชุดทดสอบสอง ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, มีเชื้อผสมของแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตร, ใส่ราก่อโรคหลังจากแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน
- 5) ชุดทดสอบสาม ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน, มีเชื้อผสมของแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตร, ใส่ราก่อโรคหลังจากแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน

วางหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้องที่มีอากาศถ่ายเทและมีกาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน (หลอดไฟเสมือนแสงแดด 12 W) เป็นเวลา 30-45 วัน จากนั้นสังเกตและบันทึกผลการเกิดโรค การยับยั้งการเกิดโรคของแก้วเหลือง และ สังเกตการเจริญของต้นแก้วเหลือง บันทึกสีของใบ, ความสูงของลำต้น, ความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักสดและน้ำแห้งของราก และจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางปม

3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.12.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี โดยอ้างอิงหลักเกณฑ์ของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) ได้แก่ ตรวจสอบการติดสีแกรม, รูปร่างและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์, การผลิตคะตะเลส, การผลิตออกซิเดส, การสร้างสปอร์, การเคลื่อนที่, การหมักน้ำตาล ได้แก่ แลคโทส, กลูโคส, มอลโทส และเด็กซ์โทรส, การทดสอบ MR-VP, การย่อยแป้ง, การรีดิวส์ไนเตรต, การทดสอบ

เลซิติเนส, การทดสอบอินโดล, การทดสอบการใช้ซิเตรต, การทดสอบความทนเกลือที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์

3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

3.12.2.1 เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นสกัดจีโนมิก DNA ด้วย DNAzol® ตามวิธีการของ Chomczynski และคณะ (1997) โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย ลงใน 100 ไมโครลิตรของสาร DNAzol® ผสมให้เข้ากันเบาๆด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

3.12.2.2 เตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.12.2.1	5.0	ไมโครลิตร
Go taq green	25.0	ไมโครลิตร
Forward ไพรมเมอร์ (10 μ M)	5.0	ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ 41F สำหรับแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง		
- ไพรมเมอร์ 9F สำหรับแบคทีเรียยับบั๊งรา		
Reverse ไพรมเมอร์ (10 μ M)	5.0	ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ 1488R สำหรับแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง		
- ไพรมเมอร์ 1510R สำหรับแบคทีเรียยับบั๊งรา		
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	10.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50.0	ไมโครลิตร

สำหรับชุดควบคุมผลบ่ง ใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร แทนสารละลายของดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำหลอดไปทำปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ DNA thermal cycler

3.12.2.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	5 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	1 นาที	
Extention	ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	2 นาที	
Final extention	ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	10 นาที	

เมื่อดำเนินการปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.12.2.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจลร่วมกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (BioExcellence, Thailand)

3.12.2.4.1) การเตรียมอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียม 1% อะกาโรสเจลซึ่งหลอมละลายอยู่ใน 1X TAE บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) แล้วเทลงในแม่พิมพ์ที่มีช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งไว้ประมาณ 30 นาที จนอะกาโรสเจลแข็งตัว จากนั้นวางอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เท 1X TAE บัฟเฟอร์ให้ท่วม สูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย

3.12.2.4.2) ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) และหยอดสารละลายดีเอ็นเอและสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Mupid-2Advance, Japan) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของอะกาโรสเจลจึงนำเจลออกจากแชมเบอร์ และย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) เป็นระยะเวลา 10-15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำแล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.12.2.5 ทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, (EU) Lithuania) โดยผสมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับบัฟเฟอร์ (binding buffer) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นย้ายลงคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 700 ไมโครลิตร ของวอชบัฟเฟอร์ (wash buffer) ลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อนำบัฟเฟอร์ส่วนเกินออก จากนั้นย้ายคอลัมน์ลงหลอดใหม่ และเติม 30 ไมโครลิตรของน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บริเวณกึ่งกลางคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่บริสุทธิ์ไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop Spectrophotometer) เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.12.2.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ ที่ได้จากข้อ 3.12.2.5 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base (Malaysia) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม Blastn ซึ่งโปรแกรมจะนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ศึกษา

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองในพืชทั้งหมดทางสถิติแบบทางเดียว (one way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS และค่าเฉลี่ยในทุกๆ การทดลองเปรียบเทียบกับ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 5% ($P = 0.05$) (Yuttavanichakul และคณะ, 2012)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจากบริเวณรากของพืชตระกูลถั่ว จำนวน 100 ไอโซเลต ในการยับยั้ง รากก่อโรค 6 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *R. solani* และ *Pythium* sp. โดยวิธี dual culture สังเกตผลการทดสอบจากการยับยั้งการเจริญของรา พบว่าแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งราส่วนใหญ่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 ในขณะที่ 89 ไอโซเลต ที่เหลือไม่ยับยั้งการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ไม่ได้แสดงผลไว้) จากตาราง 4.1 พบว่าทุกไอโซเลตใน 11 ไอโซเลตเหล่านี้สามารถยับยั้ง *Curvularia* sp. และ *R. solani* แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดยับยั้ง *Pythium* sp. ได้

ไอโซเลต NE10/1, NE18, NE7 และ NE6 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *R. solani* ไอโซเลต C5 และ NE10/2 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Curvularia* sp. และ *R. solani* ไอโซเลต N13/2, NE16 และ N13/1 สามารถยับยั้ง *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *R. solani* ไอโซเลต N14/1 สามารถยับยั้ง *F. oxysporum*, *Curvularia* sp. และ *R. solani* และไอโซเลต N14/2 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *Curvularia* sp. และ *R. solani*

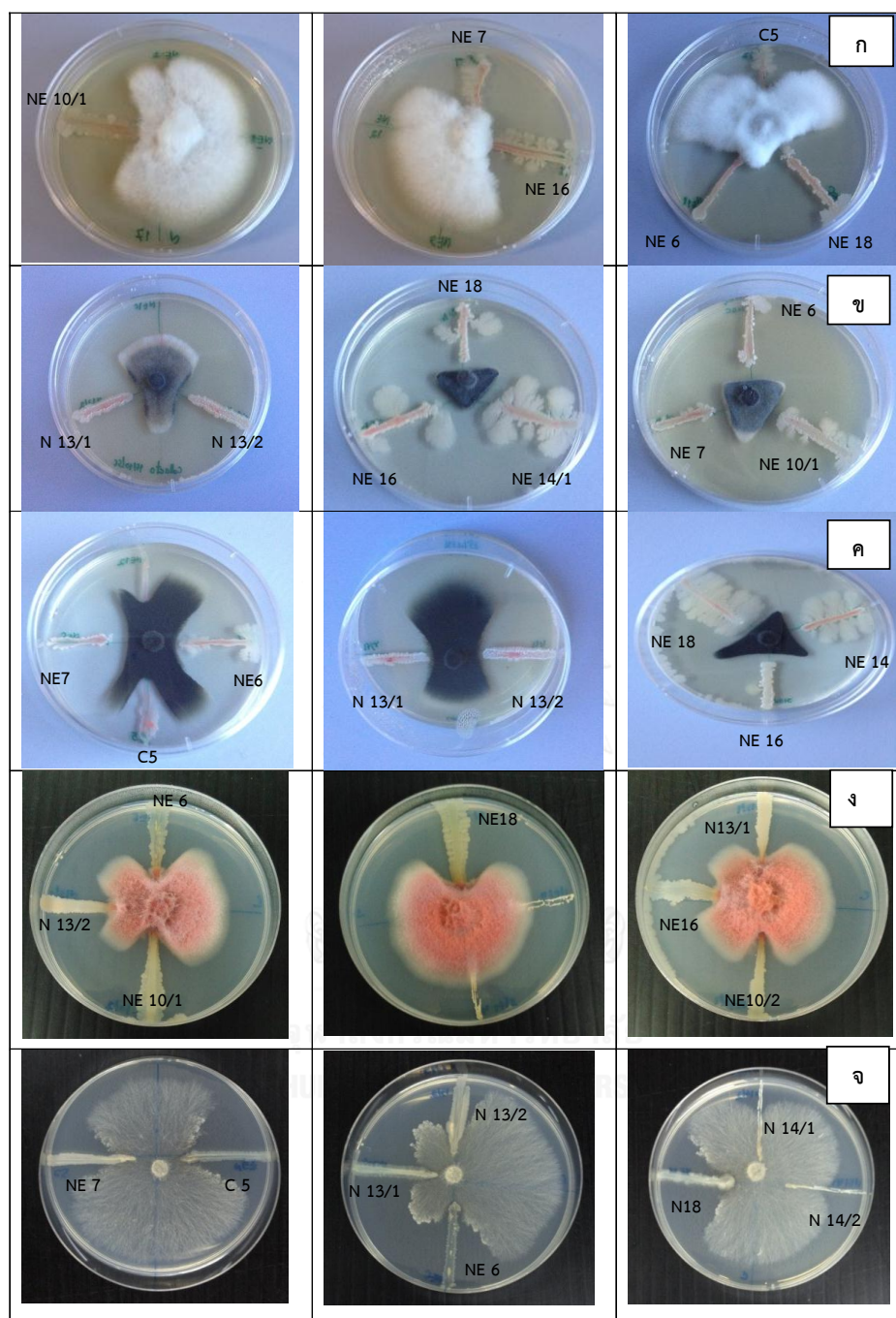
สำหรับแบคทีเรียปมราก (root nodule forming bacteria) จำนวน 7 ไอโซเลต ไม่มีความสามารถในการยับยั้งรากก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการยับยั้งรากก่อโรคของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture

ไอโซเลต/รา	ความสามารถในการยับยั้งรากก่อโรค					
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	<i>R. solani</i>	<i>Pythium</i> sp.
NE10/1	+	+	+	+	+	-
C5	+	+	-	+	+	-
N13/2	-	+	+	+	+	-
NE16	-	+	+	+	+	-
NE10/2	+	+	-	+	+	-
NE18	+	+	+	+	+	-
NE7	+	+	+	+	+	-
N13/1	-	+	+	+	+	-
NE6	+	+	+	+	+	-
N14/1	-	-	+	+	+	-
N14/2	+	-	-	+	+	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงว่า พบการยับยั้งการเจริญของรา

เครื่องหมาย - แสดงว่า ไม่พบการยับยั้งการเจริญของรา



รูปที่ 4.1 ความสามารถของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆ ได้แก่ *C. Gloeosporioides* (ก), *Colletotrichum* sp. (ข) *Curvularia* sp. (ค), *F. oxysporum* (ง) และ *R. solani* (จ)

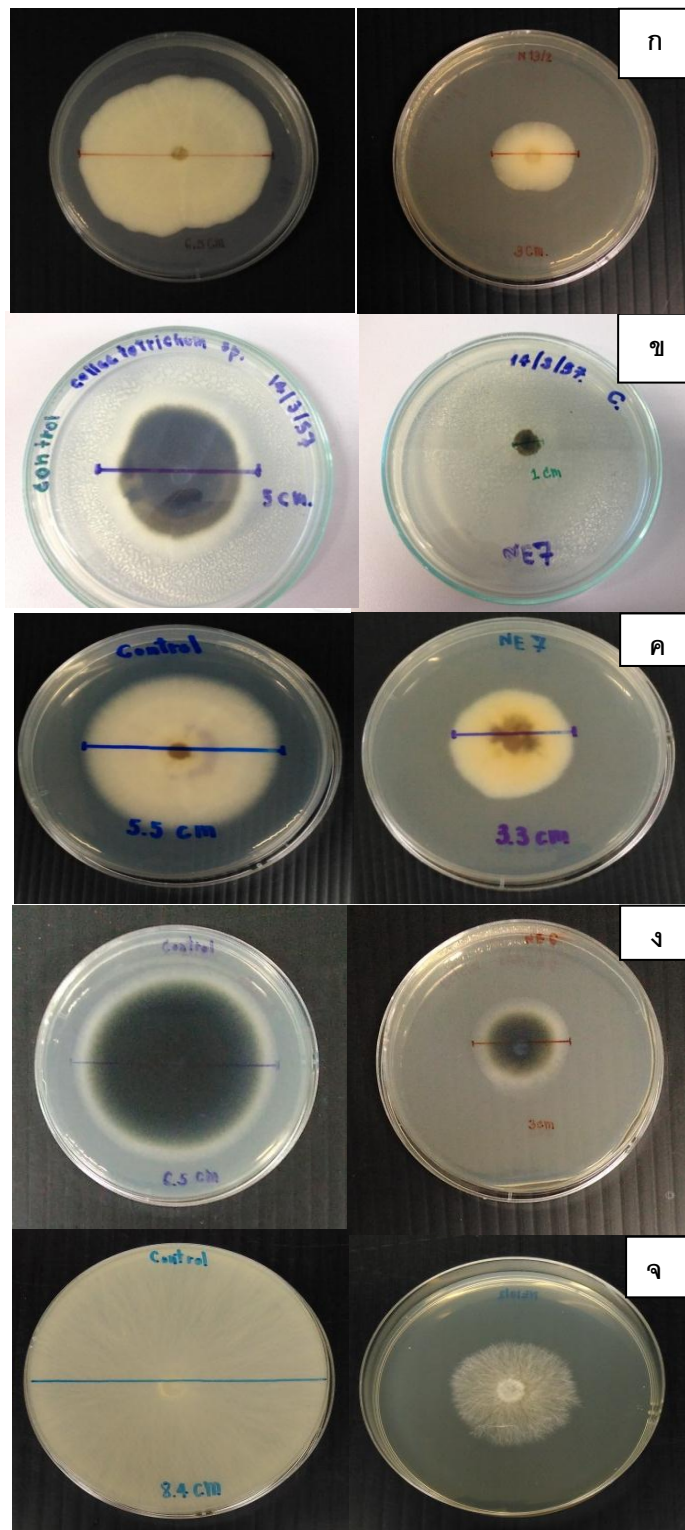
นำแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ที่ให้ผลทดสอบบวกในการทดสอบ dual culture มาทดสอบประสิทธิภาพของส่วนน้ำใส (cell free culture filtrate) ในการยับยั้งราก่อโรค โดยเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของราจากเพลททดสอบที่มีส่วนน้ำใสกับเพลทควบคุม ผลการทดสอบแสดงดังตาราง

ที่ 4.2 ซึ่งพบว่าส่วนน้ำใสของแบคทีเรียไอโซเลต N13/2, NE18 และ NE 6 มีความสามารถในการยับยั้งรา
 ก่อโรคทั้ง 5 ชนิดได้ (รูปที่ 4.2) โดย N13/2 ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด ที่การยับยั้ง 39.33%
 (รูปที่ 4.2ก), NE 7 ยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด ที่การยับยั้ง 35.22% (รูปที่ 4.2ข), NE 7 ยับยั้ง
Colletotrichum sp. ได้ดีที่สุด ที่การยับยั้ง 76% (รูปที่ 4.2ค), NE6 และ NE18 ยับยั้ง *Curvularia* sp.
 ได้ดีที่สุด ที่การยับยั้ง 56.67% (รูปที่ 4.2ง) และ N13/2 ยับยั้ง *R. solani* ได้ดีที่สุด ที่การยับยั้ง 66.27%
 (รูปที่ 4.2จ)

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคของส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย 11 ชนิด

ไอโซเลต/รา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคของส่วนน้ำใส				
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	<i>R. solani</i>
NE10/1	25.37	22.64	-	45.71	49.21
C5	-	8.80	-	45.71	55.55
N13/2	39.33	22.01	39.33	19.52	66.27
NE16	-	13.20	10.67	16.19	42.46
NE10/2	25.37	5.03	-	45.71	55.16
NE18	15.43	15.72	49.33	56.67	48.81
NE7	12.93	35.22	76	-	29.76
N13/1	-	6.92	32	30.47	42.46
NE6	26.36	16.35	68	56.67	26.58
N14/1	-	0.63	38	18.57	63.49
N14/2	-	6.92	34	18.57	11.51

หมายเหตุ เครื่องหมาย - แสดง ไม่พบการยับยั้งในส่วนน้ำใส



รูปที่ 4.2 ความสามารถของส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆ ได้แก่ *C. gloeosporioides* (ก), *F. oxysporum* (ข), *Colletotrichum* sp. (ค), *Curvularia* sp. (ง) และ *R. solani* (จ)

4.2 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา


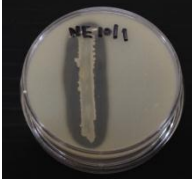



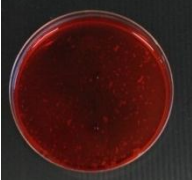



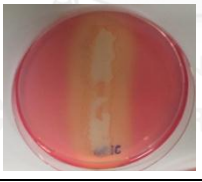







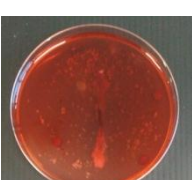
นำ 11 ไอโซเลตที่มีความสามารถยับยั้งราก่อโรคและแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ที่มีรายงานว่ามียับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ เซลลูเลส, โปรตีเอส และไคตินเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% (w/v) 1-carboxymethylcellulose (CMC), 3% (w/v) powdered skim milk agar plates และ 1% (w/v) colloidal chitin agar plates ตามลำดับ โดยสังเกตผลทดสอบบวจากลักษณะโซนใสรอบโคโลนี ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.3 ซึ่งพบว่าทั้ง 11 ไอโซเลตนั้น แต่ละไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด และไอโซเลตทั้งหมดไม่มีความสามารถในการผลิตไคตินเนส ไอโซเลต C5, N13/2, NE10/2, N13/1, NE6, N14/1 และ N14/2 สามารถผลิตเซลลูเลสและโปรตีเอสได้ ไอโซเลต NE16 ผลิตได้เฉพาะเซลลูเลส ไอโซเลต NE10/1, NE18 และ NE7 ผลิตได้เฉพาะโปรตีเอส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% (w/v) 1-carboxymethylcellulose (CMC) และ 3% (w/v) powdered skim milk agar plates ตามลำดับ โดยทั้งนี้พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่ผลิตโปรตีเอสได้

ส่วนแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4.3)



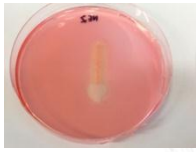


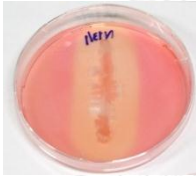


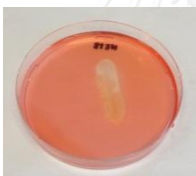

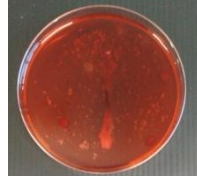



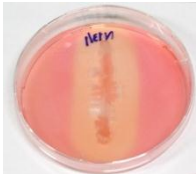


รูปที่ 4.3 ผลการผลิตเซลลูเลส, โปรตีเอส และไคตินเนสของไอโซเลต NE10/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% (w/v) 1-carboxymethylcellulose (CMC), 3% (w/v) powdered skim milk agar plates และ 1% (w/v) colloidal chitin agar plates ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต

ชนิด แบคทีเรีย	ไอโซเลต	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
		เซลลูเลส		โปรตีเอส		โคติเนส	
		ผลบวก/ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ผลลบ	ผลการทดสอบ
แบคทีเรียที่ยับยั้งราก่อโรค	NE10/1	-		+		-	
	C5	+		+		-	
	N13/2	+		+		-	
	NE16	+		-		-	
	NE10/2	+		+		-	
	NE18	-		+		-	


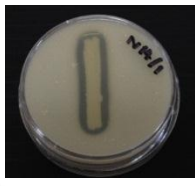










หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึงมีความสามารถในการผลิต, เครื่องหมาย - แสดงถึงไม่มีความสามารถในการผลิต

ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปราก 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ชนิด แบค ทีเรีย	ไอโซเลต	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
		เซลลูเลส		โปรตีเอส		โคติเนส	
		ผลบวก /ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก /ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ
	NE7	-		+		-	
	NE13/1	+		+		-	
	NE18	-		+		-	
	NE7	-		+		-	
	NE13/1	+		+		-	










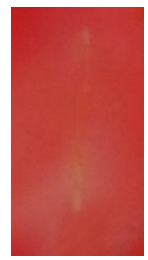


หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึงมีความสามารถในการผลิต, เครื่องหมาย - แสดงถึงไม่มีความสามารถในการผลิต

ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ชนิด แบคทีเรีย	ไอโซ เลต	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
		เซลลูเลส		โปรตีเอส		โคติเนส	
		ผลบวก /ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ
แบคทีเรียที่ยับยั้งรากโรค	N14/1	+		+		-	
	N14/2	+		+		-	
แบคทีเรียปมราก	01010	-		-		-	
	01011	-		-		-	






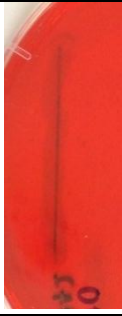
หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึงมีความสามารถในการผลิต, เครื่องหมาย - แสดงถึงไม่มีความสามารถในการผลิต

ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ชนิด แบคทีเรีย	ไอ โซ เลต	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
		เซลลูเลส		โปรตีเอส		ไคติเนส	
		ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ
แบคทีเรียปมราก	01041	-		-		-	
	01023	-		-		-	
	01041	-		-		-	
	01027	-		-		-	

หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึงมีความสามารถในการผลิต, เครื่องหมาย - แสดงถึงไม่มีความสามารถในการผลิต

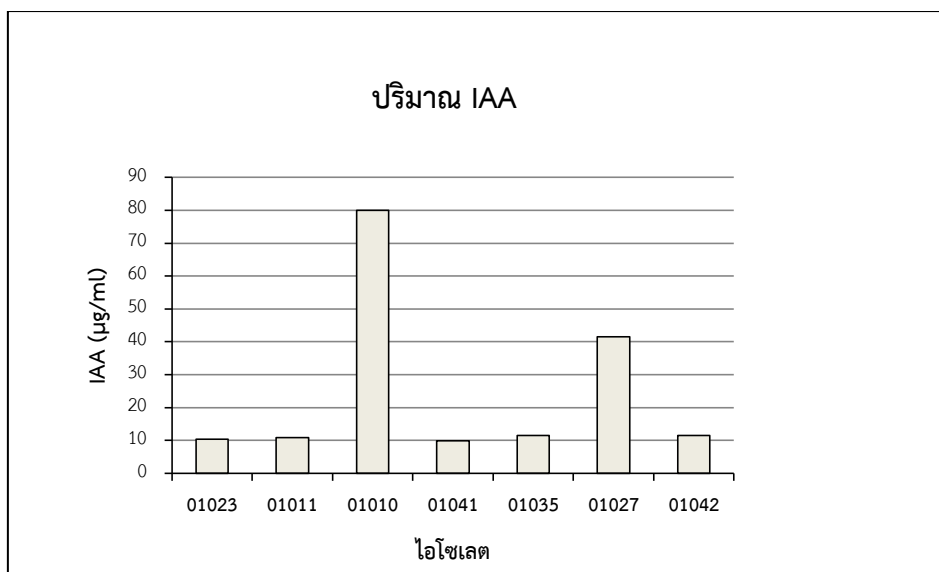
ตารางที่ 4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ยับยั้งรา 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต (ต่อ)

ชนิด แบคทีเรีย	ไอโซเลต	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
		เซลลูเลส		โปรตีเอส		โคติเนส	
		ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ	ผลบวก/ ผลลบ	ผลการทดสอบ
แบคทีเรีย ปมราก	01035	-		-		-	
	01042	-		-		-	

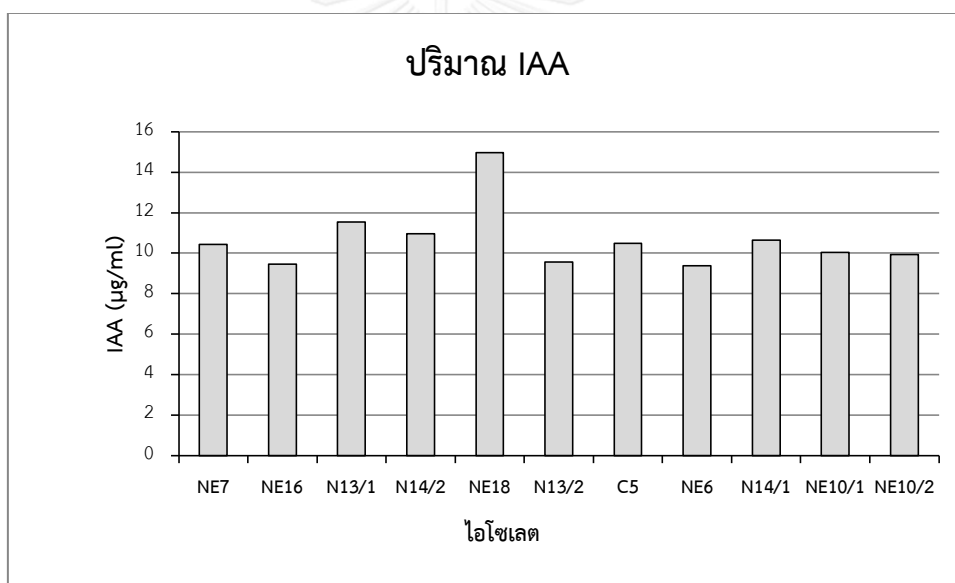
หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึงมีความสามารถในการผลิต, เครื่องหมาย - แสดงถึงไม่มีความสามารถในการผลิต

4.3 การผลิต กรดอินโดล-3-แอซีติก (IAA)

ทดสอบการผลิต IAA ตามวิธีของ Fukuhara และคณะ (1994) โดยนำส่วนใสของแบคทีเรียผสมกับสารละลาย Salkowski เพื่อดูการเกิดสาร tris-(indole-3-acetato) iron (III) complex ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของส่วนใสเป็นสีชมพู และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA (ภาคผนวก ค 1) เพื่อหาปริมาณ IAA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่ทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่ผลิต IAA สูงสุด 2 อันดับแรก ได้แก่ แบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01010 และ 01027 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐาน IAA แล้ว พบว่าสามารถผลิต IAA ได้ที่ 80 $\mu\text{g/ml}$ และ 42 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ส่วนไอโซเลตอื่นๆผลิตได้เพียงประมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับแบคทีเรียที่ยับยั้งรา นั้น ทั้ง 11 ไอโซเลตสามารถสร้าง IAA ได้ แต่มีปริมาณการผลิตที่ต่ำ โดยอยู่ในช่วงประมาณ 9-15 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่า IAA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต

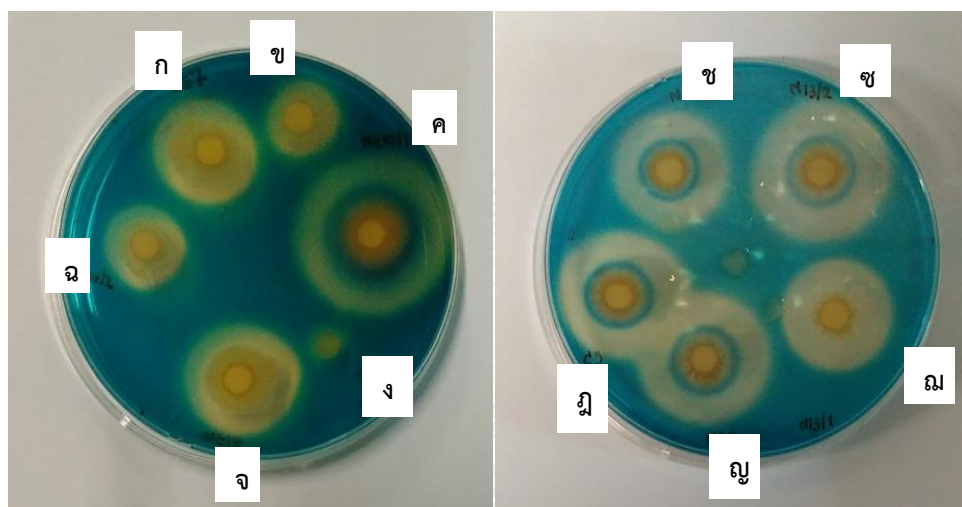


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่า IAA ผลิตโดยแบคทีเรียที่ยับยั้งราทั้ง 11 ไอโซเลต

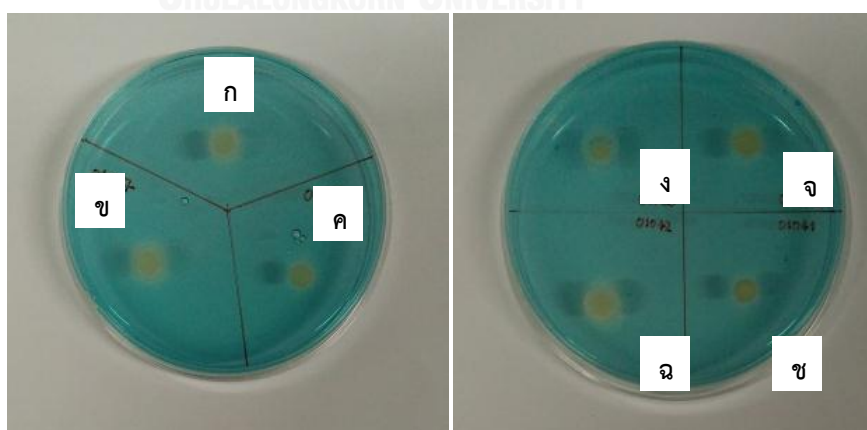
4.4 การผลิตสารไซเดอโรฟอรั

ทดสอบการผลิตสารไซเดอโรฟอรับนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S (CAS) เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ของเหล็ก โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มเหลืองเมื่อเกิดสาร chelator-iron (III) complex ตามวิธีของ Schwyn และ Neilands (1987) โดยปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่ยับยั้งราทั้ง 11 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมรากถั่วเหลือง 7 ไอโซเลต ให้เท่ากัน ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ปิเปตลงบนแผ่นดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีส้มเหลือง (orange halo) ที่เกิดขึ้น ผลการทดสอบพบว่า ทุกไอโซเลตมีการผลิตสารไซเดอโรฟอรัในภาวะเหล็กจำกัด (รูปที่ 4.6 และ 4.7) โดยเมื่อปม

จานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี CAS ที่ 30 อองศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เริ่มสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ย้ายยั้งราทั้ง 11 ไอโซเลต ในขณะที่ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียปมรากในช่วง 7 วันแรก และเมื่อบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี CAS ที่ 30 อองศาเซลเซียสต่อไปอีกจนครบ 14 วัน เริ่มสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองรอบโคโลนีของแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต (รูปที่ 4.7) และพบว่าแบคทีเรียที่ย้ายยั้งรา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีเหลืองรอบโคโลนีที่ชัดเจน โดยไอโซเลต NE10/1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุด คือ 33 มิลลิเมตร ในขณะที่แบคทีเรียปมรากแสดงวงสีเหลืองรอบโคโลนีเล็กน้อย



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบการผลิตไซโตโครฟอรันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S ของแบคทีเรียที่ย้ายยั้งรา ไอโซเลต NE7 (ก), NE16 (ข), NE10/1 (ค), NE10/2 (ง), NE18 (จ), NE14/2 (ฉ), N14/1 (ช), N13/2 (ซ), N13/1 (ฅ), NE6 (ญ) และ C5 (ฎ)



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบการผลิตไซโตโครฟอรันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง blue agar ที่มี chrome azurol S ของแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01010 (ก), 01027 (ข), 01010 (ค), 01027 (ง), 01035 (จ), 01023 (ฉ) และ 01041 (ช)

4.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปมรากในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองโดยการปลูกถั่วเหลืองร่วมกับแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต โดยเติม 1 มิลลิลิตรของแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ในสองรูปแบบการทดลองคือ ในชุดขวด Leonard's jar และในหลอดทดลอง จากนั้นสังเกตการเจริญของต้นถั่วเหลือง ได้แก่ ความสูงของลำต้น, ความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักสดและน้ำแห้งของราก จำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางปม หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งที่มีเฉพาะเมล็ดถั่วในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง และชุดควบคุมที่มีเฉพาะเมล็ดถั่วในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ผลการทดสอบหลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วันพบว่าต้นถั่วเหลืองในชุดที่ปลูกร่วมกับแบคทีเรียปมรากแต่ละไอโซเลต มีการเจริญและเกิดปมราก ดังแสดงในตารางที่ 4.4



ตารางที่ 4.4 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วันร่วมกับแบคทีเรียปมรากแต่ละไฮโซเลต

ไฮโซเลต	ความยาว ลำต้น (ซม.)	ความยาว ราก (ซม.)	จำนวนปม (ปม)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ปม (ซม.)	น้ำหนักสด ของต้น (กรัม)	น้ำหนักสด ของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง ของต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้ง ของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งรวม (กรัม)
01035	32.17±6.14 ^{ab}	5.58±3.21 ^{ab}	6.50±4.72 ^c	1.95±0.29 ^c	1.01±0.34 ^{bc}	0.55±0.34	0.21±0.12 ^{cd}	0.11±0.06	0.31±0.11 ^{bc}
01010	27.67±16.4 ^a	7.92±3.20 ^b	3.83±1.72 ^b	1.79±0.78 ^{bc}	0.67±0.68 ^a	0.93±0.67	0.14±0.09 ^{abc}	0.10±0.05	0.25±0.06 ^{abc}
01027	30.58±5.67 ^a	5.33±3.20 ^{ab}	3.33±2.06 ^b	1.15±0.30 ^b	0.77±0.40 ^a	0.59±0.40	0.18±0.11 ^c	0.09±0.06	0.27±0.09 ^{abc}
01011	24.13±8.43 ^a	4.83±1.97 ^{ab}	1.83±1.33 ^{ab}	1.17±0.41 ^b	0.15±0.24 ^a	0.55±0.24	0.23±0.20 ^a	0.12±0.04	0.14±0.53 ^a
01023	42.33±12.89 ^b	6.83±2.06 ^b	3.67±2.06 ^b	1.83±0.68 ^{bc}	1.94±0.83 ^c	0.61±0.83	0.34±0.02 ^d	0.12±0.02	0.46±0.18 ^d
01041	29.75±7.28 ^a	5.25±2.04 ^{ab}	3.17±2.04 ^b	1.88±0.80 ^c	1.15±0.33 ^{bc}	0.55±0.33	0.22±0.14 ^{cd}	0.09±0.04	0.31±0.16 ^c
01042	26.28±9.24 ^a	7.37±1.21 ^b	1.67±1.21 ^{ab}	2.37±0.80 ^c	0.17±0.36 ^a	0.83±0.36	0.07±0.82 ^{abc}	0.12±0.06	0.19±0.11 ^{abc}
N-free	26.15±8.30 ^a	5.12±3.52 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.38±0.30 ^a	0.57±0.30	0.08±1.03 ^{abc}	0.09±0.05	0.17±0.09 ^{ab}
Plus N ₂	26.23±4.38 ^a	2.89±1.32 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.23±0.69 ^a	0.94±0.69	0.06±0.13 ^{ab}	0.09±0.07	0.15±0.68 ^a

N-free ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

Plus N₂ ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

ตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT แสดงโดยตัวอักษร (ตัวยก) ที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 4.4 ซึ่งเป็นการทดสอบในชุดขวด Leonard's jar พบว่าน้ำหนักแห้งรวมของต้นและรากของถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01023 มีค่าสูงสุดคือ 0.46 กรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$)

สำหรับการทดสอบในชุดขวด Leonard's jar ในแง่ความสมบูรณ์และความเขียวของใบ พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมรากไอโซเลตต่างๆ (รูปที่ 4.8 ก-ข) มีการเจริญที่สมบูรณ์และมีใบสีเขียวอย่างชัดเจน ขณะที่ต้นถั่วเหลืองในชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.8 ช) แสดงการขาดไนโตรเจนโดยมีสีของใบที่เหลืองและไม่แข็งแรงในแง่ความยาวของลำต้น พบว่าต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01035, 01010, 01027, 01023, 01041 และ 01042 (รูปที่ 4.8 ก-ข) มีความยาวลำต้นเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.8 ช) และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.8 ฉ) โดยต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01023 มีความยาวลำต้นของต้นเฉลี่ยสูงสุด ที่ 42.33 เซนติเมตร ซึ่งมีค่ามากกว่าชุดควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$)



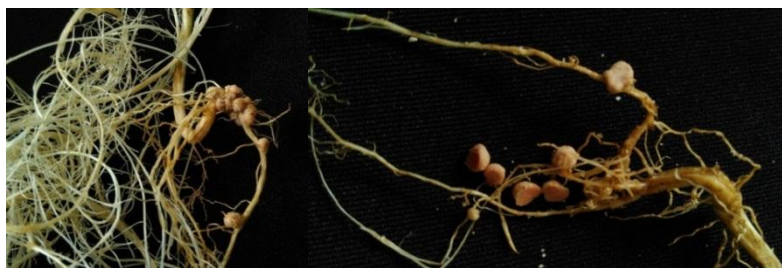
รูปที่ 4.8 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01011 (ก), 01023 (ข), 01027 (ค), 01035 (ง), 01041 (จ), 01010 (ฉ), 01042 (ช) ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (ช) และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (ฉ)

ในแง่ความยาวของรากนั้น ต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01010 มีความยาวรากสูงสุดที่ 7.92 เซนติเมตร (รูปที่ 4.9 ฉ) โดยต้นถั่วเหลืองในชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01010, 01023 และ 01042 มีค่าความยาวรากเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.9 ข) และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$) (รูปที่ 4.9 ฉ)



รูปที่ 4.9 บริเวณรากต้นถั่วเหลืองจากชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร ไอโซเลต 01011 (ก), 01023 (ข), 01027 (ค), 01035 (ง), 01041 (จ), 01010 (ฉ), 01042 (ช) ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (ซ) และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (ฅ)

ในส่วนของ การสร้างปม ในชุดขวด Leonard's jar หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วัน พบว่าแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลตมีความสามารถในการสร้างปมกับถั่วเหลือง โดยไอโซเลต 01035 สร้างปมเฉลี่ยได้สูงสุด 6.5 ปม/ต้น โดยสร้างปมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.95 เซนติเมตร เมื่อผ่าปมพบว่าภายในมีสีชมพูแดง ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของแบคทีเรียปมรากในการตรึงไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ตัวอย่างการเกิดปมรากในถั่วเหลืองจากชุดขวด Leonard's jar ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01035

สำหรับการทดสอบในหลอดทดลอง พบว่าการเจริญของต้นถั่วเหลืองหลังจากปลูกเป็นเวลา 30 วัน ในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนร่วมกับแบคทีเรียปมรากแต่ละไอโซเลต (ตารางที่ 4.5) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบในขวด Leonard's jar โดยน้ำหนักแห้งรวมของต้นและรากของถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01023 มีค่าสูงสุดคือ 0.23 กรัม ซึ่งมีความมากกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$) ต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01023 มีความยาวต้นสูงสุดที่ 34.75 เซนติเมตร และต้นถั่วเหลืองในหลอดทดลองที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01027, 01011, 01023 และ 01042 มีความยาวลำต้นเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.11) ในขณะที่ต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01010 มีความยาวรากสูงสุดที่ 20.67 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต มีความสามารถในการสร้างปมกับถั่วเหลือง (รูปที่ 4.12) โดยไอโซเลต 01041 สร้างปมเฉลี่ยได้สูงสุด 6.3 ปม โดยสร้างปมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.73 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.5 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในหลอดทดลอง หลังจากปลูกเป็นเวลา 30 วันร่วมกับแบบที่เปรียบเทียบแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ความยาวลำต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนปม (ปม)	เส้นผ่านศูนย์กลางปม (ซม.)	น้ำหนักสดของต้น (กรัม)	น้ำหนักสดของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งของต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้งของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งรวม (กรัม)
01035	25.33±2.02 ^a	11.83±4.15 ^a	6.00±1.55 ^c	1.84±0.21 ^{bc}	0.93±0.21 ^a	0.27±0.08 ^a	0.12±0.00 ^{ab}	0.03±0.00 ^a	0.15±0.00 ^{bc}
01010	26.33±4.93 ^{ab}	20.67±7.45 ^c	3.67±1.37 ^b	2.17±0.11 ^c	0.93±0.11 ^a	0.63±0.23 ^{bc}	0.10±0.00 ^{bc}	0.04±0.00 ^{ab}	0.14±0.00 ^a
01027	32.33±2.70 ^{bc}	17.67±3.61 ^{bc}	4.67±1.03 ^{bc}	2.14±0.19 ^c	1.19±0.19 ^c	0.62±0.07 ^{bc}	0.15±0.03 ^{bc}	0.04±0.01 ^{abc}	0.19±0.34 ^{bcd}
01011	23.33±4.30 ^a	13.67±1.86 ^{ab}	5.00±1.79 ^{bc}	1.43±0.17 ^b	0.87±0.17 ^a	0.65±0.20 ^{bc}	0.11±0.03 ^a	0.05±0.02 ^{bcd}	0.16±0.44 ^{ab}
01023	34.75±9.94 ^c	12.67±4.89 ^{ab}	6.17±2.79 ^c	1.74±0.73 ^{bc}	1.25±0.73 ^c	0.62±0.27 ^{bc}	0.18±0.05 ^b	0.06±0.01 ^{cd}	0.23±0.50 ^d
01041	34.67±2.26 ^c	16.33±4.23 ^{abc}	6.33±1.37 ^c	1.73±0.13 ^{bc}	1.12±0.13 ^{bc}	0.76±0.25 ^c	0.15±0.01 ^{bc}	0.06±0.02 ^d	0.21±0.34 ^{cd}
01042	33.90±5.29 ^c	12.33±1.37 ^{ab}	5.33±0.52 ^{bc}	1.97±0.06 ^c	1.05±0.06 ^{ab}	0.48±0.08 ^{ab}	0.13±0.02 ^{bc}	0.04±0.00 ^{abc}	0.18±0.02 ^{abc}
N-free	23.72±6.60 ^a	15.86±2.85 ^{abc}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.86±0.10 ^a	0.44±0.08 ^{ab}	0.11±0.04 ^a	0.05±0.01 ^{abcd}	0.15±0.45 ^{ab}
Plus N ₂	24.33±5.57 ^a	15.50±2.24 ^{abc}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.96±0.15 ^{ab}	0.49±0.24 ^{ab}	0.13±0.04 ^{ab}	0.05±0.02 ^{abcd}	0.18±0.05 ^{abc}

N-free ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

Plus N₂ ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

ตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT แสดงโดยตัวอักษร (ตัวยก) ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.11 การเจริญของต้นถั่วเหลืองจากชุดปลูกในหลอดทดลอง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (จากรูปด้านซ้ายไปขวา) ไอโซเลต 01042, 01041, 01010, 01023, 01027, 01011, 01035, ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (N free), ชุดควบคุมที่ใส่แบคทีเรียยัยยั้งรา (N13/2) และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (Plus N₂)



รูปที่ 4.12 บริเวณรากของต้นถั่วเหลืองจากชุดปลูกในหลอดทดลอง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01042 (ก), 01041 (ข), 01010 (ค), 01023 (ง), 01027 (จ), 01011 (ฉ), 01035 (ช), ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (ซ), และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (ฌ)

4.6 การใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง

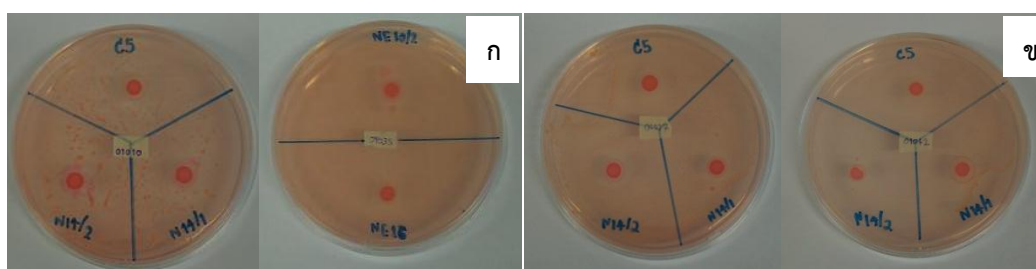
4.6.1 การศึกษาความเข้ากันได้ของแบคทีเรียที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญกับแบคทีเรียยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราและแบคทีเรียปมรากที่ส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองที่สามารถเจริญร่วมกันได้และไม่พบการยับยั้งการเจริญของกันและกัน โดยปีเปิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นวางกระดาษกรองลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMCA ที่เกลี่ยแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองไว้ล่วงหน้า 1 วัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วตรวจผลการยับยั้งกันและกันจากโซนในกรอบแผ่นกระดาษกรอง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.6 ซึ่งไม่พบการยับยั้งการเจริญของกันและกันในแบคทีเรียยับยั้งราก่อโรคทั้ง 11 ไอโซลกับแบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01010, 01011 และ 01023 แบคทีเรียปมราก ไอโซเลต 01035, 01041, 01042 สามารถเจริญร่วมกันได้กับแบคทีเรียยับยั้งราบางไอโซเลต ขณะที่แบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01027 ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรียยับยั้งราเกือบทุกไอโซเลต ยกเว้น NE 10/1 (รูปที่ 4.13)

ตารางที่ 4.6 ความเข้ากันได้ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มเมื่อเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMCA

ไอโซเลต	01010	01011	01023	01035	01041	01042	01027
N13/1	-	-	-	-	-	+	+
N13/2	-	-	-	+	-	-	+
NE6	-	-	-	-	-	+	+
NE10/1	-	-	-	+	-	+	-
NE18	-	-	-	-	+	-	+
NE7	-	-	-	-	-	-	+
NE16	-	-	-	-	-	+	+
NE10/2	-	-	-	-	-	+	+
N14/1	-	-	-	-	-	+	+
N14/2	-	-	-	-	-	+	+
C5	-	-	-	-	-	+	+

เครื่องหมาย + แสดงถึง พบการยับยั้งการเจริญของกันและกัน (antagonistic)

เครื่องหมาย - แสดงถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของกันและกัน (สามารถเจริญร่วมกันได้)



รูปที่ 4.13 ตัวอย่างความเข้ากันได้ของแบคทีเรียซึ่งไม่พบโซนยับยั้งรอบโคโลนี (ก) และ ความเข้ากันได้ไม่ได้ของแบคทีเรียซึ่งเกิดโซนยับยั้งรอบโคโลนี (ข)

4.6.2 การคัดเลือกคู่แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียในการทดสอบ

คัดเลือกคู่แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย จากแบคทีเรียยับยั้งรา 11 ไอโซเลต โดยพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งราของส่วนน้ำใส, การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของรา, การสร้างไซโคโรฟอร และจากแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต โดยพิจารณาจากชุดทดสอบที่ให้น้ำหนักแห้งรวมของต้นและรากของถั่วเหลืองสูงสุด และความสามารถของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มในการเจริญร่วมกัน พบว่าสำหรับแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งรานั้น ไอโซเลต N13/2 สามารถยับยั้งราได้ 5 ชนิด และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *R. solani* ของส่วนน้ำใสสูงสุด ที่ 39.33 และ 66.27 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังผลิตโปรตีนเอสและเซลลูเลส รวมถึงสามารถผลิตไซโคโรฟอรได้ดีด้วย ส่วนแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองนั้น ไอโซเลต 01023 ให้น้ำหนักแห้งรวมต้นและรากโดยเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งแสดงว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตถั่วเหลืองได้ดีที่สุด นอกจากนี้ก็ยังไม่พบการยับยั้งการเจริญของกันและกันของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลต ดังนั้นจึงเลือกใช้ไอโซเลตทั้งสองเป็นเชื้อผสมในการทดสอบต่อไป

4.6.3 ผลการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง

การใช้เชื้อผสมของไอโซเลต 01023 และ N13/2 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง โดยปลูกถั่วเหลืองในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายปราศจากไนโตรเจนร่วมกับเชื้อผสมของแบคทีเรียที่ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร สังเกตการเจริญของต้นถั่วเหลืองและบันทึก ความสูงของลำต้น, ความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักสดและน้ำแห้งของราก, จำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางปม หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วัน เทียบกับชุดควบคุม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่าต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียมีความยาวต้นสูงสุดที่ 36.67 เซนติเมตร โดยมีความยาวลำต้นเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีเชื้อผสมของแบคทีเรียและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (รูปที่ 4.14) รวมถึงมีความยาวรากสูงสุดที่ 20.58 เซนติเมตร (รูปที่ 4.15) ในส่วนของการเกิดปมราก พบว่าต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียมีการสร้างปมเฉลี่ย 6.33 ปม/ต้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.43 เซนติเมตร (รูปที่ 4.16) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนร่วมกับแบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01023 ($P=0.05$) โดยรวมแล้ว การใช้เชื้อผสมของไอโซเลต 01023 และ N13/2 ไม่มีผลด้านลบต่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง แต่มีผลที่ดีในแง่ผลผลิตของถั่วเหลือง เช่น ความยาวของลำต้น, ความยาวของราก, และน้ำหนักแห้งรวม

ตารางที่ 4.7 การเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย ไอโซเลต 01023

และ N13/2

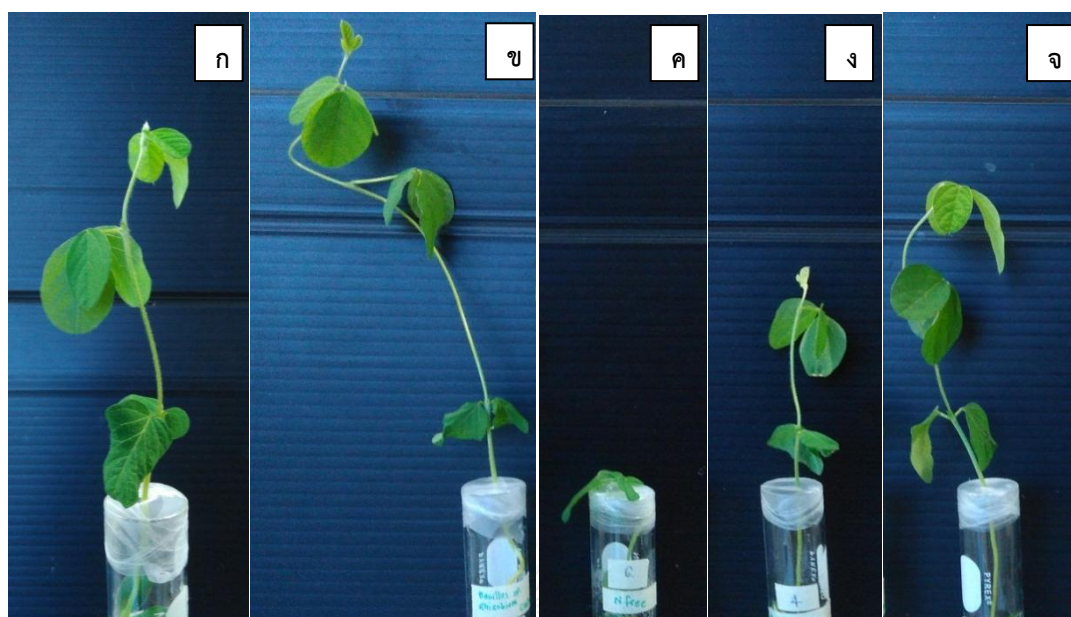
ไอโซเลต	ความยาว ลำต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนปม (ปม)	เส้นผ่าน ศูนย์กลางปม (ซม.)	น้ำหนักสด ของต้น (กรัม)	น้ำหนักสด ของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง ของต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้ง ของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง รวม (กรัม)
N13/2	20.75±4.99 ^a	15.72±4.80 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.82±0.16 ^a	0.36±0.07 ^a	0.10±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a
01023	35.00±7.06 ^b	14.17±1.47 ^a	7.00±2.37 ^b	1.94±0.47 ^c	1.23±0.14 ^b	0.66±0.11 ^b	0.16±0.02 ^b	0.06±0.01 ^b	0.22±0.02 ^b
plus N ₂	24.33±5.57 ^a	15.50±2.24 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.96±0.15 ^a	0.49±0.24 ^{ab}	0.13±0.04 ^{ab}	0.05±0.02 ^{ab}	0.18±0.02 ^{ab}
N-free	23.72±6.58 ^a	15.86±2.85 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.86±0.10 ^a	0.44±0.85 ^a	0.11±0.04 ^a	0.05±0.01 ^{ab}	0.15±0.05 ^a
01023+N13/2	36.67±4.73 ^b	20.58±6.36 ^b	6.33±2.66 ^b	1.43±0.41 ^c	0.98±0.19 ^a	0.54±0.10 ^{ab}	0.14±0.04 ^{ab}	0.05±0.01 ^{ab}	0.19±0.04 ^{ab}

plus N₂ ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

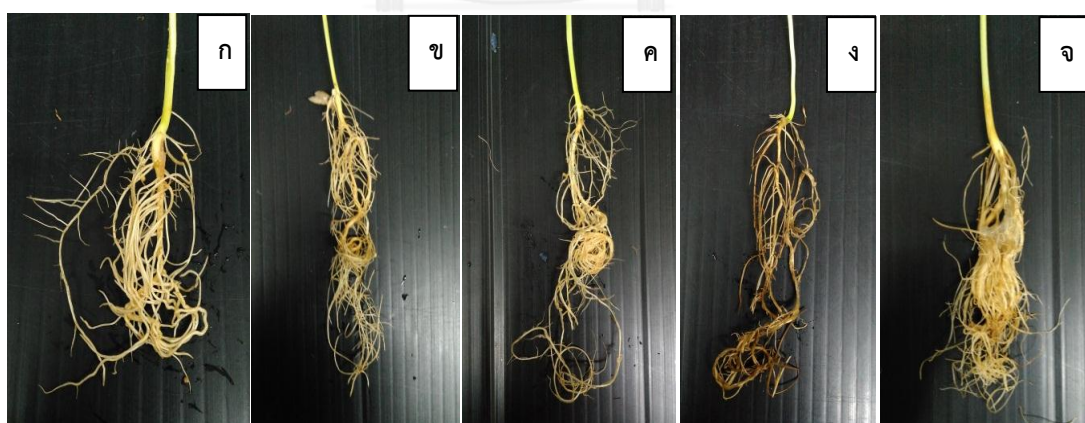
N-free ชุดควบคุม ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

ตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT แสดงโดยตัวอักษร (ตัวย) ที่แตกต่างกัน

กัน



รูปที่ 4.14 การเจริญของต้นถั่วเหลืองบริเวณลำต้น ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01023 (ก), ชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย (ข), ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (ค), ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและมีแบคทีเรียยับยั้งราไอโซเลต N13/2 (ง), และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (จ)



รูปที่ 4.15 บริเวณรากของต้นถั่วเหลือง ในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01023 (ก), ชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย (ข), ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง (ค), ชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและมีแบคทีเรียยับยั้งราไอโซเลต N13/2 (ง), และชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน (จ)



รูปที่ 4.16 การใช้เชื้อผสมของ 01023 และ N13/2 ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง และการเกิดปมรากในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรีย ไอโซเลต 01023 และ N13/2 ในชุดขวด Leonard's jar

4.7 การก่อโรคในถั่วเหลืองโดยรา

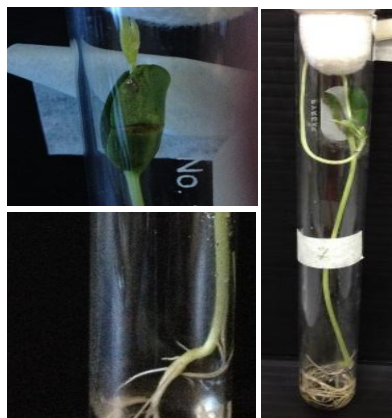
ทดสอบการก่อโรคในถั่วเหลืองโดยราก่อโรคในพีช 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *R. solani* โดยปลูกถั่วเหลืองร่วมกับราก่อโรคในพีช 4 ชนิดข้างต้น ในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน บันทึกผลความเปลี่ยนแปลง อาการของโรค และบริเวณที่แสดงอาการจนครบ 14 วัน

จากการสังเกต ไม่พบการก่อโรคในถั่วเหลืองของรา *F. oxysporum* (รูปที่ 4.17), *Curvularia* sp. (รูปที่ 4.18) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.19) อย่างไรก็ตามพบการก่อโรคที่ชัดเจนในหลอดทดสอบที่มีการเติมรา *R. solani* ซึ่งถั่วเหลืองเริ่มติดโรคและแสดงอาการของโรคหลังจากเติมราเป็นระยะเวลา 5 วัน (ดังรูปที่ 4.20) และการก่อโรคในระบบรากในหลอดทดสอบที่มีการเติมรา *Colletotrichum* sp. (รูปที่ 4.21)

จากการทดสอบแสดงให้เห็น *R. solani* เป็นราที่สามารถก่อโรคในถั่วเหลืองได้อย่างชัดเจนและรวดเร็ว โดยแสดงอาการรากเน่าและอาการช้ำน้ำบริเวณลำต้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ *R. solani*



รูปที่ 4.17 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม *F. oxysporum* ในหลอดทดลอง ซึ่งไม่พบการก่อโรคในถั่วเหลืองทั้งในระบบรากและใบ



รูปที่ 4.18 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม *Curvularia* sp. ในหลอดทดลอง ซึ่งไม่พบการก่อโรคในถั่วเหลืองทั้งในระบบรากและใบ



รูปที่ 4.19 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดควบคุมในหลอดทดลอง พบว่าถั่วเหลืองเจริญได้ดี และมีการพัฒนาของระบบรากที่สมบูรณ์อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.20 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม *R. solani* ในหลอดทดลอง ซึ่งพบอาการของโรคบริเวณใบเลี้ยง ลำต้น และระบบรากของถั่วเหลือง

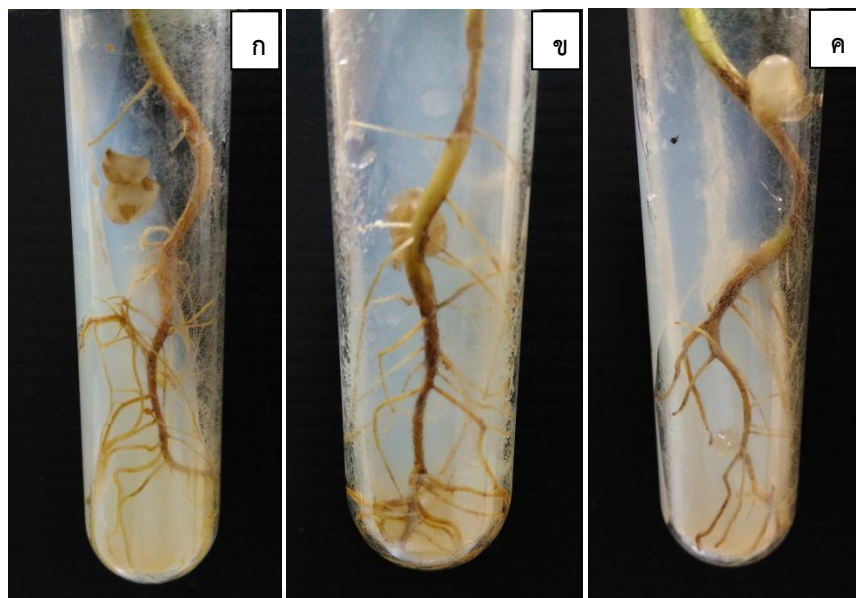


รูปที่ 4.21 การเจริญของต้นถั่วเหลืองชุดทดสอบที่มีการเติม *Colletotrichum* sp. ในหลอดทดลอง ซึ่งพบการเจริญของราบริเวณใบเลี้ยง และระบบรากของถั่วเหลือง

4.8 ประสิทธิภาพของเชื้อผสมในการยับยั้งราโรคในถั่วเหลือง

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อผสมของแบคทีเรียยับยั้งรา ไอโซเลต N13/2 และแบคทีเรียปรามาก ไอโซเลต 01023 ในการยับยั้งราโรค และในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง โดยการปลูกถั่วเหลืองในหลอดทดลอง แล้วสังเกตอาการของโรค รวมถึงการเจริญของต้นถั่วเหลือง และบันทึก ความสูงของลำต้น, ความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักสดและน้ำแห้งของราก, จำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางปม หลังจากปลูกเป็นเวลา 30-45 วัน เทียบกับชุดควบคุมต่างๆ

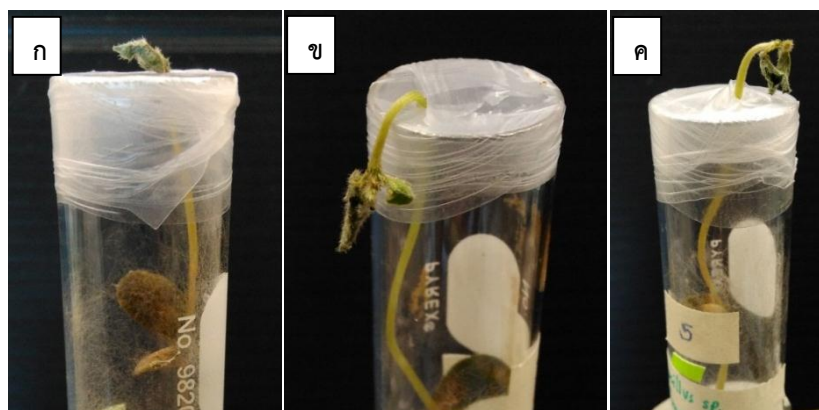
ผลการทดสอบพบว่าทั้งในชุดควบคุมหนึ่งซึ่งปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน ไม่มีแบคทีเรียใดๆ และใส่ราก่อโรค, ชุดทดสอบสองซึ่งปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค, และชุดทดสอบหนึ่งซึ่งปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน, มีแบคทีเรียยับยั้งรา และใส่ราก่อโรค (3 วันหลังใส่แบคทีเรีย) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน เกิดอาการช้ำน้ำบริเวณรากที่ชัดเจนเหมือนกัน (รูปที่ 4.22) ที่ระยะ 7 วันนี้ ความสูงของต้นถั่วของชุดที่ปลูกในอาหารที่มีไนโตรเจนและใส่ราก่อโรค (รูปที่ 4.23 ก) และของชุดที่ปลูกในอาหารที่มีไนโตรเจน และมีแบคทีเรียยับยั้งรา (รูปที่ 4.23 ค) มีความสูงใกล้เคียงกัน ซึ่งต่ำกว่าความสูงของต้นถั่วที่ปลูกในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค (รูปที่ 4.23 ข) เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าบริเวณใบของทั้งสามชุดเหล่านี้เริ่มมีอาการใบเหี่ยว (รูปที่ 4.24) โดยสังเกตพบเพิ่มเติมว่าในชุดที่ปลูกในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค ที่บริเวณรากเริ่มมีการสร้างปม (รูปที่ 4.25)



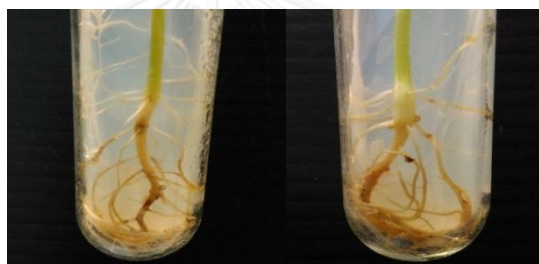
รูปที่ 4.22 อาการของโรคหลังจากลงรากเป็นเวลา 7 วัน ของชุดควบคุมที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจนและใส่ราก่อโรค (ก), ชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค (ข) และชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน มีแบคทีเรียยับยั้งรา และใส่ราก่อโรค (ค)



รูปที่ 4.23 การเจริญบริเวณต้นของถั่วเหลือง หลังจากลงรากเป็นเวลา 7 วัน ของชุดควบคุมที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจนและใส่ราก่อโรค (ก), ชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค (ข) และชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน มีแบคทีเรียยับยั้งรา และใส่ราก่อโรค (ค)



รูปที่ 4.24 อาการใบเหี่ยว หลังจากลงรากเป็นเวลา 14 วัน ของชุดควบคุมที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจนและใส่ราก่อโรค (ก), ชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค (ข) และชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน มีแบคทีเรียยับยั้งรา และใส่ราก่อโรค (ค)



รูปที่ 4.25 แสดงการเกิดปมบริเวณรากถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค

จากผลการทดสอบ ไม่พบการยับยั้งการเกิดโรคจาก *R. solani* ทั้งในชุดทดสอบสองซึ่งปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน มีเชื้อผสมของแบคทีเรีย และใส่ราก่อโรค, และชุดทดสอบหนึ่งซึ่งปลูกเมล็ดถั่วในอาหารที่มีไนโตรเจน, มีแบคทีเรียยับยั้งรา และใส่ราก่อโรค จึงทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยทดสอบความสามารถของแบคทีเรียยับยั้งรา N13/2 ในการยับยั้งราก่อโรคด้วยวิธี dual culture บนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและบนอาหารที่มีไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.26 พบว่าแบคทีเรียยับยั้งรา N13/2 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนและอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *R. solani* ได้



รูปที่ 4.26 ผลการทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture บนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (ก) และบนอาหารที่มีไนโตรเจน (ข) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ค) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

4.9 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

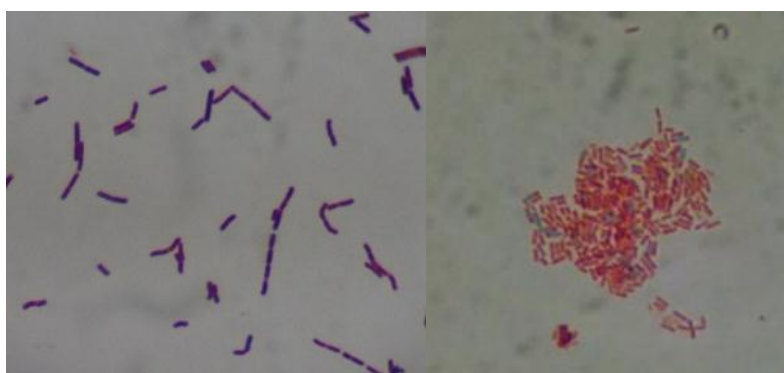
4.9.1 การทดสอบทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่ยับยั้งราและแบคทีเรียปรามาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของ ได้แก่ ตรวจสอบการติดสีแกรม, รูปร่างและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์, การทดสอบคะตะเลส, การทดสอบออกซิเดส, การสร้างสปอร์, การเคลื่อนที่, การหมักน้ำตาล ได้แก่ แลคโทส, กลูโคส, มอลโทส และเด็คซ์โทรส, การทดสอบ MR-VP, การย่อยแป้ง, การรีดิวส์ไนเตรต, การทดสอบเลซิทีเนส, การทดสอบอินโดล, การทดสอบการใช้ซิเตรต, การทดสอบความทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) และการทดสอบทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 4.27) พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราทั้ง 11 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง และพบการสร้างสปอร์ ซึ่งน่าจะจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ส่วนแบคทีเรียปรามา ทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (รูปที่ 4.28) และไม่มีการสร้างสปอร์

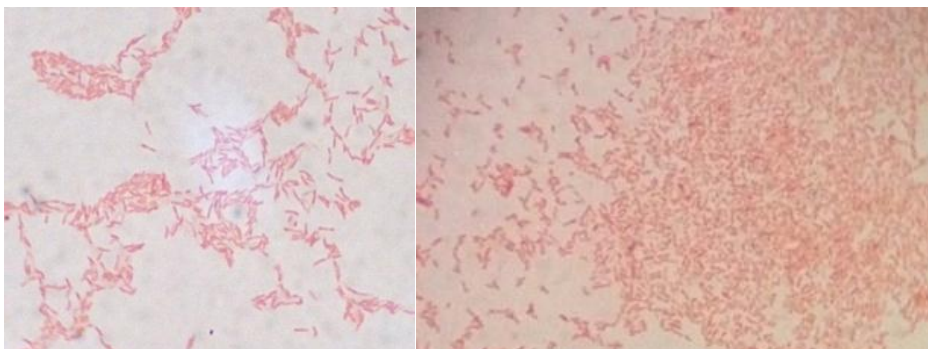
ตารางที่ 4.8 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค

ไอโซเลต ปฏิกิริยาที่ทดสอบ	NE10/1	C5	N13/2	NE16	NE10/2	NE18	NE7	N13/1	NE6	N14/1	N14/2
การติดสีแกรม	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
การสร้างเอนโดสปอร์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
รูปร่างของเซลล์	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
การเคลื่อนที่	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การไฮโดรไลซ์แป้ง	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
การทดสอบเลซิทีเนส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
การทดสอบการใช้ซีเตรต	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
การทดสอบออกซิเดส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบคะตะเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การรีดิวส์ไนเตรต	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Methyl red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
การทดสอบอินโดล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบความทน เกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ 5 เปอร์เซ็นต์	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
การทดสอบความทน เกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ 7 เปอร์เซ็นต์	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
การหมักมอลโทส	-	A	+	A	-	A	A	A	-	A	A
การหมักแลคโตส	-	ALK	ALK	ALK	-	-	ALK	ALK	ALK	ALK	-
การหมักเด็กซ์โทรส	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A
การหมักซูโครส	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

หมายเหตุ +ve แสดง แกรมบวก, + แสดงผลทดสอบเป็นบวก, - แสดงผลทดสอบเป็นลบ, A = acid, ALK=alkaline



รูปที่ 4.27 ตัวอย่างภาพได้อัล้องจุลทรรศน์ (1000X) ของการย้อมแกรมและการย้อมสปอร์ของไอโซเลต NE10/2

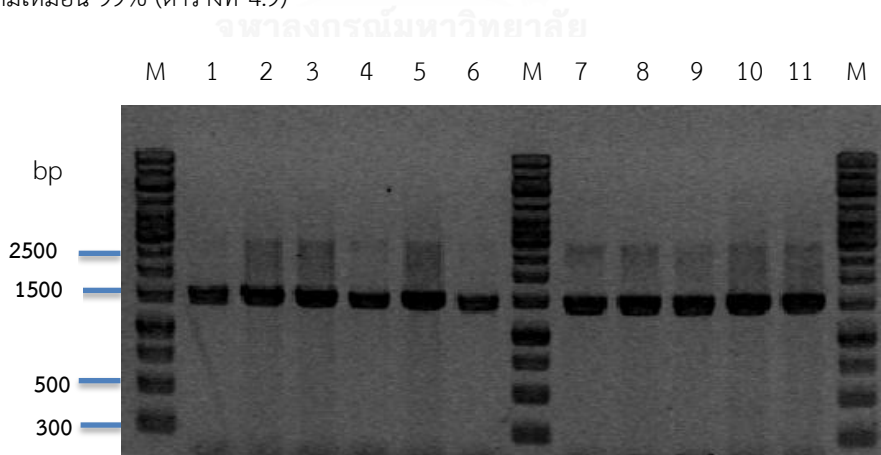


รูปที่ 4.28 ตัวอย่างภาพได้กล้องจุลทรรศน์ (1000X) ของการย้อมแกรมแบคทีเรียจากปมราก ไอโซเลต 01027 และ 01041

4.9.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

สกัดจีโนมิก DNA ด้วย DNAzol® ตามวิธีการของ Chomczynski และคณะ (1997) และเพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1kb DNA Ladder เป็น marker

ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียยั้งยั้งทั้ง 11 ไอโซเลตให้แถบของผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1500 bp (รูปที่ 4.29) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของทั้ง 11 ไอโซเลตมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus* spp. ที่ระดับความเหมือน 99% (ตารางที่ 4.9)

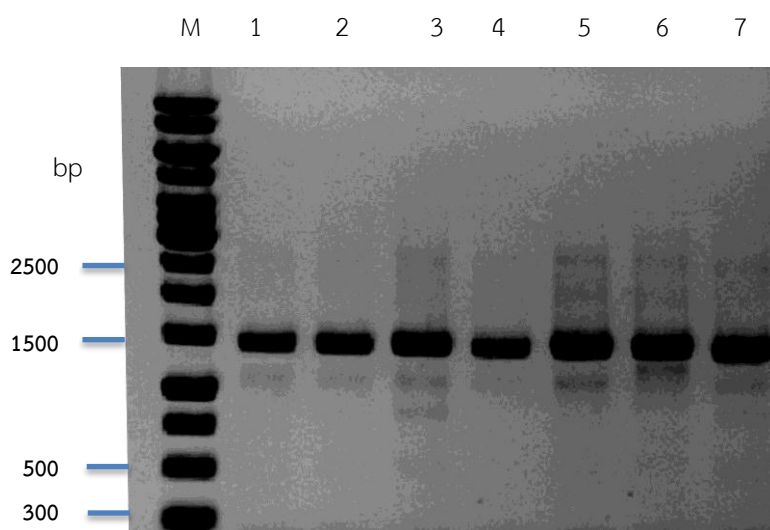


รูปที่ 4.29 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยั้งยั้ง ไอโซเลต NE10/1 (ช่องที่ 1), C5 (ช่องที่ 2), N13/2 (ช่องที่ 3), NE16 (ช่องที่ 4), NE10/2 (ช่องที่ 5), NE18 (ช่องที่ 6), NE7 (ช่องที่ 7), N13/1 (ช่องที่ 8), NE6 (ช่องที่ 9), N14/1 (ช่องที่ 10) และ N14/2 (ช่องที่ 11) เมื่อเทียบกับ 1kb DNA Ladder (M)

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ยังระบุเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

ไอโซเลต	ใกล้เคียง 16rDNA ของแบคทีเรีย	Accession	Query cover	Identity
N13/1	<i>Bacillus</i> sp.	KM979099.1	100	99
NE10/2	<i>Bacillus</i> sp.	KF157957.1	100	99
N13/2	<i>Bacillus</i> sp.	KM979099.1	100	99
N14/1	<i>B. cereus</i>	HE660034.1	98	99
N14/2	<i>B. cereus</i>	HE660034.1	98	99
C5	<i>B. subtilis</i>	KP215279.1	98	100
NE6	<i>Bacillus</i> sp.	KT583543.1	98	99
NE7	<i>Bacillus</i> sp.	KJ601743.1	98	97
NE 16	<i>B. subtilis</i>	KT982217.1	98	100
NE18	<i>Bacillus</i> sp.	CP009938.1	98	99
NE10/1	<i>Bacillus</i> sp.	KF157957.1	100	99

สำหรับแบคทีเรียปนเปื้อนทั้ง 7 ไอโซเลตเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า แบคทีเรียปนเปื้อนทั้ง 7 ไอโซเลตให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1500 bp เมื่อเทียบกับ 1kb DNA Ladder (รูปที่ 4.30) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ได้ผลดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง หมายเลข 2 เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของแบคทีเรียปนเปื้อน 6 ไอโซเลต มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ต่างๆที่ระดับความเหมือน 99% และหนึ่งไอโซเลต (01027) มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bradyrhizobium elkanii* (ตารางที่ 4.10)



รูปที่ 4.30 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลือง ไอโซเลต 01027 (ช่องที่ 1), 01010 (ช่องที่ 2), 01042 (ช่องที่ 3), 01041 (ช่องที่ 4), 01035 (ช่องที่ 5), 01023 (ช่องที่ 6) และ 01011 (ช่องที่ 7) เมื่อเทียบกับ 1kb DNA Ladder (M)

ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

ไอโซเลต	ใกล้เคียง 16rDNA ของแบคทีเรีย	Accession	Query cover	Identity
01010	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	EU481826.1	98	99
01011	<i>B. japonicum</i>	AB601640.1	97	99
01023	<i>B. japonicum</i>	AB070569.2	98	99
01035	<i>B. japonicum</i>	AB601640.1	98	100
01041	<i>B. japonicum</i>	CP007569.1	98	98
01042	<i>B. japonicum</i>	EU481826.1	98	99
01027	<i>B. elkanii</i>	KX242475.1	100	100

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราก่อโรคและส่งเสริมการเจริญในแก้วเหียงจากแบคทีเรียในดิน จากจำนวน 93 ไอโซเลต และแบคทีเรียปมรากแก้วเหียง จำนวน 7 ไอโซเลต โดยทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในแก้วเหียง, สมบัติการเป็น PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ได้แก่ การผลิต IAA, การสร้างสารไซโตโร-ฟอร, การสร้างปมรากในแก้วเหียง ทั้งแบบ *in vitro* และ *in planta* การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค พบว่าแบคทีเรียในดิน 11 ไอโซเลต ได้แก่ NE6, NE7, NE10/1, NE10/2, NE16, NE18, N13/1, N13/2, N14/1, N14/2 และ C5 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพีช 5 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *R. solani* ทั้งโดยวิธี dual culture และในสภาพน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ (cell free culture filtrate) จึงเลือกใช้ 11 ไอโซเลตดังกล่าวนี้ในการทดสอบต่อไป เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลต มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรีย ทั้ง 11 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ และให้ผลบวกกับการทดสอบแคทาเลส เมื่อศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* มากถึง 99% แต่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ชัดเจนเนื่องจากยังมีความคล้ายคลึงระหว่างผลลัพธ์ที่ได้ (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) ดังนั้นจึงระบุได้เบื้องต้นว่าเป็น *Bacillus* sp. โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียในดินที่พบได้ทั่วไป ทนทานต่อสภาพแวดล้อม และเป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในด้านควบคุมชีวภาพ (Shoda, 2000)

จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลตมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ที่มีรายงานว่ามียับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ เซลลูเลส, โปรตีเอส และไคติเนส พบว่าแบคทีเรีย 11 ไอโซเลตที่ยับยั้งราได้ดังกล่าว มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ได้น้อย 1 ชนิด โดยไอโซเลต N13/2 ยับยั้งราได้ 5 ชนิด และยับยั้ง *C.gloeosporioides* และ *R. solani* ได้สูงสุด ที่ 39.33% และ 66.27% ตามลำดับ และยังสามารถผลิตเซลลูเลสและโปรตีเอสได้ด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้จะเป็นหนึ่งในกลไกที่ใช้ในการยับยั้งรา (Chantawannakul และคณะ, 2002; Koo, 2001; Koumoutsi และคณะ, 2004; 2008)

สำหรับแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลตที่ทดสอบไม่มีความสามารถในการยับยั้งราและไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นได้ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลตได้รับการยืนยันจากผลการทดลองว่าสามารถสร้างปมรากได้ในแก้วเหียง โดยไอโซเลต 01023 สามารถส่งเสริมการเจริญของแก้วเหียงได้ดี โดยต้นแก้วเหียงในชุดขวด Leonard's jar ที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01023 นี้ มีความยาวลำต้นเฉลี่ยและน้ำหนักแห้งรวมต้นและรากเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากแก้วเหียงและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากแก้วเหียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$)

เมื่อนำแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เมื่อศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01027 มีความใกล้เคียงกับ *B. elkanii* มากถึง 100% และแบคทีเรียปมรากอีก 6 ไอโซเลตมีความใกล้เคียงกับ *B. japonicum* มากถึง 99% จึงสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียปมรากไอโซเลต 01027 เป็น *B. elkanii* และแบคทีเรียปมรากอีก 6 ไอโซเลตเป็น *B. japonicum* (ภาคผนวก ง หมายเลข 2) *B. japonicum* และ *B. elkanii* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมรากและมีส่วนช่วยในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในพืชถั่วเหลือง (Fuhrmann และ Wollum, 1989; Kaneko และคณะ, 2002) และมีสมบัติเป็น PGPR ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชถั่วเหลือง (Kumar และคณะ, 2011)

แบคทีเรียยั้ยั้งรา 11 ไอโซเลตและแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต ต่างมีความสามารถในการผลิตสารไซโตโรเฟอร์ โดยแบคทีเรียยั้ยั้งรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเปลี่ยนสีรอบโคโลนีบนอาหาร CAS ที่กว้างและชัดเจนกว่าแบคทีเรียปมราก โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเปลี่ยนสีแสดงถึงความเข้มข้นของสารประกอบ chelator-iron (III) complex ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการผลิตไซโตโรเฟอร์ (Milagres และคณะ, 1999) ซึ่งปริมาณของไซโตโรเฟอร์ที่ผลิตได้มากกว่าโดยแบคทีเรียยั้ยั้งรายังสามารถเกิดจากการเจริญที่เร็วกว่าของแบคทีเรียพวก *Bacillus* เมื่อเปรียบเทียบกับพวก *Bradyrhizobium* ซึ่งเจริญช้าอีกด้วย Yu และคณะ (2011) รายงานการผลิตไซโตโรเฟอร์บนอาหาร CAS โดยแบคทีเรียยั้ยั้งราก่อโรคในพืชเมื่อทดสอบโดยวิธี dual culture ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ยั้ยั้งราก่อโรค (Adesina และคณะ, 2007; Joseph และคณะ, 2007) Rossum และคณะ (1994) รายงานว่าการผลิตไซโตโรเฟอร์ของแบคทีเรียปมรากในกลุ่ม *Bradyrhizobium* มีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการเกิดปม (nodulation effectiveness) โดยช่วยเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช (rhizospheric) และเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะบริเวณราก (root colonization) รวมถึงการเกิดปมราก (nodulation) อีกด้วย

เมื่อนำแบคทีเรียยั้ยั้งรา 11 ไอโซเลตและแบคทีเรียปมราก 7 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้าง IAA พบว่า *B. japonicum* 01010 และ *B. elkanii* 01027 สามารถผลิต IAA ได้ที่ 80 µg/ml และ 42 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบ ร่วมกับแบคทีเรียปมรากพบว่า *B. japonicum* 01010 ให้ความยาวรากมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่แบคทีเรียปมรากอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$) รวมถึง *B. japonicum* 01010 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของปมที่กว้างกว่า ทั้งนี้ขนาดของปมที่กว้างนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณ IAA ที่ผลิตได้มากโดยไอโซเลตนี้ ดังที่มีรายงานไว้โดย Boiero และคณะ (2007) ว่า *B. japonicum* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช โดยสามารถควบคุมการเจริญของพืชผ่านการทำงานของฮอร์โมนที่ผลิตขึ้นและปล่อยออกมา โดย IAA มีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นกระบวนการทางสรีรวิทยา (physiological processes) อาทิ การเกิดปมรากและการเจริญของราก (Kaneshiro และ Kwolek, 1985) IAA ยังมีส่วนช่วยเพิ่มความยาวรากและการสร้างปมในถั่วเหลืองด้วย (Fukuhara และคณะ, 1994; Kaneshiro และ Kwolek, 1985)

ความเข้มข้นของ IAA มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของพืชที่แตกต่างกัน มีรายงานถึงบทบาทของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของพืช อาทิ *Pseudomonas* spp. ผลิต IAA ใน

ปริมาณสูงถึง 5–10 mg/ml มีผลในการลดการยืดตัวของราก (root elongation) และเพิ่มอัตราส่วนต้นต่อรากในชุกการบีท (*Beta vulgaris*) (Schroth, 1986) Yuttavanichakul และคณะ (2012) รายงานถึงการผลิต IAA ใน *B. japonicum* พบว่าปริมาณ IAA ในช่วง 40 และ 60 µg/ml มีผลต่อชั้นคอร์เท็กซ์และเอพิเดอร์มิสของลำต้น และ IAA ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR น่าจะมีผลต่อสัณฐานวิทยาของรากหรือมีผลต่อเชื้อก่อโรคโดยตรง ซึ่งส่งผลดีต่อพืช Reetha และคณะ (2014) ศึกษา *P. fluorescens* และ *B. subtilis* ที่ผลิต IAA ที่ 15.38±0.5 µg/ml และ 12.67±0.32 µg/ml ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยเพิ่มความยาวราก, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและของรากในหัวหอมเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย Sheng และคณะ (2008) ศึกษา *P. fluorescens* และ *Microbacterium* ที่ผลิต IAA ที่ 15.80±2.1 µg/ml และ 27.90±3.6 µg/ml ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยเพิ่มความยาวรากในต้นเรป (rape) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นปริมาณ IAA ที่ผลิตโดย *B. japonicum* 01010 และ *B. elkanii* 01027 ถือว่ามีปริมาณสูง และอาจมีบทบาทต่อการส่งเสริมการเจริญของลำต้นเหลือง โดย IAA จะส่งผลดีต่อราก เมื่อความยาวรากเพิ่มขึ้น จะเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมแร่ธาตุในดิน รวมถึงการมีขนาดปมที่ใหญ่อาจจะมีส่วนช่วยในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Dobbelaere และคณะ, 1999)

จากการทดสอบแสดงว่าแบคทีเรียปมรากมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญในลำต้นเหลือง แต่ไม่สามารถยับยั้งราได้ ดังนั้นจึงทดสอบการใช้เชื้อผสมกันระหว่างแบคทีเรียยับยั้งราและแบคทีเรียปมรากทั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญและการยับยั้งราก่อโรค โดยจำเป็นต้องศึกษาความเข้ากันได้ของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มก่อนที่จะนำมาทำเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย การทดสอบความเข้ากันได้ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มเมื่อเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMCA พบการยับยั้งกันและกันในบางไอโซเลต กลไกการยับยั้งหนึ่งที่มีการรายงานไว้โดย Fuhrmann และ Wollum (1989) ระบุว่าในเชื้อผสมที่มีแบคทีเรียยับยั้งรา ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม pseudomonad ที่มีความสามารถในการผลิตไซโต-โรฟอรินปริมาณสูงนั้น มีผลไปแข่งขันแย่งธาตุเหล็ก และทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียปมราก *B. japonicum* สายพันธุ์ USDA 110 ที่มีอยู่ในเชื้อผสมนั้น

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้ พบว่าคู่แบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียคือ *Bacillus* sp. N13/2 และ *B. japonicum* 01023 ซึ่งนำไปใช้ในการทดสอบการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญและยับยั้งราก่อโรคในลำต้นเหลืองในขั้นต่อไป

ในการศึกษาผลแบบ *in planta* ชั้นแรกเป็นการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในลำต้นเหลืองโดยราก่อโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *R. solani* เพื่อคัดเลือกชนิดของราที่ก่อโรคได้ชัดเจนไปทดสอบต่อไป จากผลการทดสอบ พบว่า *R. solani* สามารถก่อโรคในลำต้นเหลืองและแสดงอาการของโรค โดยพบอาการรากเน่าและอาการช้ำน้ำบริเวณลำต้นอย่างชัดเจนและรวดเร็ว จึงเลือกใช้ *R. solani* ในการทดลองแบบ *in planta* ต่อไป

การทดสอบการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียในแง่การส่งเสริมการเจริญพบว่า ต้นลำต้นเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียมีความยาวต้นเฉลี่ยสูงกว่าชุด

ควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีเชื้อผสมของแบคทีเรียและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง 1.54 และ 1.51 เท่า ตามลำดับ ในส่วนของความยาวราก พบว่าถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียมีความยาวรากเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีเชื้อผสมของแบคทีเรียและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง 1.33 และ 1.30 เท่า ตามลำดับ

ต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียให้น้ำหนักแห้งของต้นสูงกว่าชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและไม่มีเชื้อผสมของแบคทีเรียและชุดควบคุมที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจนและไม่มีแบคทีเรียจากปมราก 1.10 และ 1.06 เท่า ตามลำดับ รวมถึงให้น้ำหนักแห้งของรากสูงกว่า 1.34 และ 1.11 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้พบการสร้างปมในต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน และมีเชื้อผสมของแบคทีเรียโดยมีจำนวนและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบที่ปลูกในสารละลายสารอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนร่วมกับ *B. japonicum* 01023 ($P=0.05$) ซึ่งแสดงว่าการมีแบคทีเรียยับยั้งราไม่กระทบต่อการสร้างปมโดย *B. japonicum* 01023 แต่ช่วยเสริมประสิทธิภาพการเจริญให้แก่ถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Masciarelli และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* LL2012 และ *B. japonicum* E109 สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นอ่อนและช่วยในการสร้างปมรากในถั่วเหลือง และยังพบว่าเชื้อผสมของแบคทีเรียช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นและรากในถั่วเหลืองด้วย

มีรายงานถึงการใช้เชื้อผสมของ *Bacillus* sp. และ *B. japonicum* เพื่อช่วยส่งเสริมกันและกันในด้านการเจริญของพืช โดย Halverson และ Handelsman (1991) รายงานว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ UW85 ช่วยส่งเสริมการเกิดปมรากในถั่วเหลือง เมื่อเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย Mishra และคณะ (2009) รายงานว่า การใช้เชื้อผสมของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ KR1 และ *B. japonicum* สายพันธุ์ SB1 ช่วยเพิ่มจำนวนปมราก น้ำหนักราก ความยาวราก และน้ำหนักลำต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ *B. japonicum* สายพันธุ์ SB1 อย่างเดียว นอกจากนี้งานวิจัยบางส่วนแสดงว่าแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ส่งผลดีต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยเพิ่มจำนวนและขนาดปมราก (Kaneko และคณะ, 2002; Polonenko และคณะ, 1987) รวมถึงช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนโตร-จีเนส (Alagawadi และ Gaur, 1988)

การทดสอบการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคนั้น ในขณะที่พบการยับยั้งราในหลอดทดลอง (*in vitro*) แต่ในการเลี้ยงร่วมกับถั่วเหลือง (*in planta*) กลับพบว่าแบคทีเรียยับยั้งรา *Bacillus* sp. N13/2 อย่างเดียว หรือเมื่อร่วมกับ *B. japonicum* 01023 ไม่สามารถยับยั้งรา *R. solani* ที่ก่อโรคในถั่วเหลืองได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภาวะในหลอดทดลองและในพืชมีความแตกต่างกัน ภาวะที่ใช้เลี้ยงพืช อาจไม่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus* sp. N13/2 ในการผลิตสารยับยั้งรา (Nalisha และคณะ, 2006), *R. solani* สามารถเจริญได้ดีกว่าในภาวะที่ทดสอบกับพืช จึงส่งผลให้ *Bacillus* sp. N13/2 ไม่สามารถยับยั้งได้ทัน (Lumsden และ Locke, 1989), หรือ

รากกล้วยเหลืองอาจมีการหลั่งสารบางอย่างที่อาจยับยั้ง *Bacillus* sp. N 13/2 หรือส่งเสริมการเจริญของ *R. solani* (Lameta และ Jay, 1987) เป็นต้น

มีรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งราในหลอดทดลอง (*in vitro*) แต่ไม่พบการยับยั้งราในพืช (*in planta*) ดังนี้

Chin-A-Woeng และคณะ (1998) ได้คัดแยก *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 ที่สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* เมื่อทดสอบในเพลท (*in vitro* antifungal activity) แต่ไม่พบการยับยั้งราดังกล่าวเมื่อทดสอบในมะเขือเทศ Cazorla และคณะ (Cazorla และคณะ, 2007) ศึกษา *B. subtilis* ที่สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชบนเพลทและผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ แต่กลับไม่พบการยับยั้งราก่อโรคเมื่อนำไปใช้ร่วมกับอาโวคา Hammami และคณะ (2009) พบว่า แม้ว่า *B. subtilis* จะผลิตสารต้านราที่ยับยั้งราได้ดีในเพลท แต่ประสิทธิภาพของสารต้านแบคทีเรียลดลงเมื่อทดสอบในพืช (*in planta*) และคาดว่ากระบวนการยับยั้งราน่าจะเกิดจากกลไกอื่นๆ อาทิ การแข่งขันแย่งอาหารและที่อยู่อาศัย

จากการทดสอบการยับยั้งราเพิ่มเติมด้วยวิธี dual culture บนอาหารแข็งสังเคราะห์ (synthetic medium) ที่มีไนโตรเจนและอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งเป็นอาหารสมบูรณ์ (complete medium) พบว่า *Bacillus* sp. N13/2 สามารถเจริญได้บนทั้งอาหารแข็งสังเคราะห์และอาหารแข็งสมบูรณ์ แต่ในอาหารแข็งสังเคราะห์ไม่พบว่าสามารถยับยั้ง *R. solani* ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีซีสเตรตสำหรับการสังเคราะห์สารยับยั้งรา (Calam, 1986; Vahidi และคณะ, 2004)

งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในด้านการหาเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ร่วมกันที่ให้ประโยชน์สองด้าน คือ ด้านการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยเหลือง และด้านการส่งเสริมการเจริญในกล้วยเหลือง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดราและปุ๋ยเคมีได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนการพัฒนาเชื้อผสมนี้ไปใช้ให้ได้ผลต่อไป ยังจำเป็นต้องศึกษาแปรผันภาวะต่างๆที่กล่าวไว้ข้างต้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคและในการส่งเสริมการเจริญของกล้วยเหลืองให้ดีขึ้นต่อไป

รายการอ้างอิง

- Adesina, M.F., Lembke, A., Costa, R., Speksnijder, A. and Smalla, K., 2007. Screening of bacterial isolates from various European soils for *in vitro* antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11): 2818-2828.
- Ahemad, M. and Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1): 1-20.
- Alagawadi, A. and Gaur, A., 1988. Associative effect of *Rhizobium* and phosphate-solubilizing bacteria on the yield and nutrient uptake of chickpea. *Plant and Soil*, 105(2): 241-246.
- Alexander, M., 1984. Ecology of *Rhizobium*. In: M. Alexander (Editor), *Biological nitrogen fixation*. Springer USA, pp. 39-50.
- Allen, T., Aerial web blight of soybean, 2016, Feb 25, <http://www.mississippi-crops.com/2011/07/22/aerial-web-blight-of-soybean/>.
- Anderson, N.A., 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1): 329-347.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. and Rodríguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3): 215-237.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. and Lalande, R., 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204(1): 57-67.
- Asaka, O. and Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4081-4085.
- Athow, K., 1987. Soybeans: improvement, production, and uses. In: J.R. Wilcox (Editor), *Fungal diseases*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 687-727.
- Atieno, M., Herrmann, L., Okalebo, R. and Lesueur, D., 2012. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(7): 2541-2550.
- Barker, D.G. et al. , 2006. Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. *The Medicago truncatula Handbook*. The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1044-1051.

- Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1): 11-18.
- Boiero, L. et al. , 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4): 874-880.
- Bottini, R., Cassan, F. and Piccoli, P., 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5): 497-503.
- Bromfield, K.R., 1984. Soybean rust. Monograph, American Phytopathological Society. American Phytopathological Society
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L., 2000. Biochemistry & molecular biology of plants, 40. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Buonassisi, A., Copeman, R., Pepin, H. and Eaton, G., 1986. Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(2): 140-146.
- Calam, C., 1986. Shake-flask fermentations. In: A. Solomon (Editor), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology Journals, Washington, pp. 59-65.
- Cassan, F. et al. , 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1): 28-35.
- Cazorla, F. et al. , 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1950-1959.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. and Lumyong, S., 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28(4): 241-245.
- Chebotar, V.K., Asis, C.A. and Akao, S., 2001. Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology and Fertility of Soils*, 34(6): 427-432.
- Cherry, J.H., 1985. Differences in the fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the USA. *Phytochemistry*, 24(2): 237-241.

- Chin, A.W.T.F. et al. , 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11): 1069-1077.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R. and Wilfinger, W., 1997. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*, 22(3): 550-553.
- Choudhary, D.K., Prakash, A. and Johri, B.N., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4): 289-297.
- Clear, R.M., Nowicki, T.W. and Daun, J.K., 1989. Soybean seed discoloration by *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp., effects on quality and production of fusariotoxins. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(3): 308-312.
- Conley, S., Cullen, E., Davis, V., Esker, P. and Laboski, C., Top 10 yield limiting factors in Wisconsin soybean, Article, 2015, Oct 18, http://fyi.uwex.edu/fieldcroppathology/2012/02/15/10_soybean_yield_factors/.
- Cook, R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1): 53-80.
- Costacurta, A., Mazzafera, P. and Rosato, Y.B., 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiology Letters*, 159(2): 215-220.
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. and Smith, D., 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant and Soil*, 200(2): 205-213.
- Datnoff, L.E. and Sinclair, J.B., 1988. The interactions of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in causing root rot of soybeans. *Phytopathology*, 78(6): 771-777.
- Davies, P., 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: P. Davies (Editor), *Plant Hormones*. Springer Netherlands, pp. 1-15.
- de Souza, J.T. et al. , 2003. Effect of 2, 4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*, 93(8): 966-975.
- de Weger, L.A. et al. , 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 17(4): 221-227.
- Devine, T.E., 1977. Genetic control of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. *Basic Life Sciences*, 9: 417-418.
- Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E., 2008. Nitrogen-fixing leguminous symbioses. *Nitrogen fixation : origins, applications, and research progress* 7. Springer Science & Business Media.

- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A.V. and Vanderleyden, J., 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212(2): 153-162.
- Dowling, D.N. and O'Gara, F., 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12(4): 133-141.
- Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J.M., 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1): 501-538.
- Erickson, D.R., 1995. Practical handbook of soybean processing and utilization. AOCS press.
- Fuhrmann, J. and Wollum, A.G., 1989. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biology and Fertility of Soils*, 7(2): 108-112.
- Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao, S. and Minamisawa, K., 1994. The involvement of Indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant and Cell Physiology*, 35(8): 1261-1265.
- Galindo, J., Abawi, G., Thurston, H. and Galvez, G., 1983. Effect of mulching on web blight of beans in Costa Rica. *Phytopathology*, 73(4): 610-615.
- Gao, X. et al. , 2012. Co-inoculation with rhizobia and AMF inhibited soybean red crown rot: from field study to plant defense-related gene expression analysis. *PLoS ONE*, 7(3): e33977.
- George, B., 2014. Oilseeds: World Markets and Trade, U.F.A. Service, Washington, D.C. , Washington, D.C. , <http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>.
- Gerhardson, B., 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20(8): 338-343.
- Giraud, E. et al. , 2007. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic *bradyrhizobia*. *Science*, 316(5829): 1307-1312.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2): 109-117.
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1): 30-39.
- Goellner, K. et al. , 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, 11(2): 169-177.
- Good Health (Thailand), คุณสมบัติในการรักษาและป้องกันโรคจากถั่วเหลือง, 2014, Oct 11, http://www.goodhealth.co.th/new_page_29.htm.
- Grau, C.R. and Martison, C.A., 1971. Inhibition of soybean hypocotyl elongation by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 69(7): 706-709.
- Gray, E. and Smith, D., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3): 395-412.

- Guo, J. et al. , 2012. Population structure of the wild soybean (*Glycine soja*) in China: implications from microsatellite analyses. *Annals of Botany*, 110(4): 777-785.
- Halverson, L. and Handelsman, J., 1991. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9): 2767-2770.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. and Nesme, X., 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2): 253-260.
- Hernandez, M.E., Kappler, A. and Newman, D.K., 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 921-928.
- Herrera-Cervera, J.A. et al. , 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1): 87-97.
- Hicks, D.R., 1978. 2 - Growth and Development. In: A.G. Norman (Editor), *Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization*. Academic Press, pp. 17-44.
- Hill, D. et al. , 1994. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1): 78-85.
- Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Baltimore, USA.
- Hwang, S.-F., Howar, R.J. and Chang, K.J., 1996. Forage and oil seed legume diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: S. Kuninaga, B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Editors), *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*, pp. 294-296.
- Iruthayathas, E.E., Vlassak, K. and Gunasekaran, S., 1983. The influence of *Azospirillum* cell content and some amino-acids on winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) *Rhizobium* symbiosis. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 146(3): 405-407.
- Joseph, B., Patra, R.R. and Lawrence, R., 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, 2: 141-152.
- Joye, G.F., Berggren, G.T. and Berner, D.K., 1990. Effects of row spacing and within-row plant population on *Rhizoctonia* aerial blight of soybean and soybean yield. *Plant disease*, 74(2): 158-160.

- Jung, H.K. and Kim, S.D., 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper Phytophthora blight disease. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(3): 235-241.
- Kaneko, T. et al. , 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Research, 9(6): 189-197.
- Kaneshiro, T. and Kwolek, W., 1985. Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. Plant Science, 42(3): 141-146.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S. and Rasheed, M., 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1(1): 48-58.
- Kim, J. and Rees, D.C., 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry, 33(2): 389-397.
- Kloepper, J. and Schroth, M., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Angers, France, pp. 879-882.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. Current Microbiology, 4(5): 317-320.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94(11): 1259-1266.
- Koo, Y.M., 2001. Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(2): 229-233.
- Koumoutsis, A. et al. , 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. Journal of Bacteriology, 186(4): 1084-1096.
- Kucharek, T., 1982. Effect of chloroneb seed treatment fungicide on soybean yield and nodulation. Soil & Crop Science Society Of Florida Proceedings, 41: 59-62.
- Kumar, A., Prakash, A. and Johri, B., 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem, Bacteria in agrobiology: crop ecosystems. Springer, pp. 37-59.
- Kumar, B.D., 1999. Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chick pea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Biology and fertility of soils, 29(1): 87-91.
- Kumar, H., Bajpai, V.K., Dubey, R., Maheshwari, D. and Kang, S.C., 2010. Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. Crop Protection, 29(6): 591-598.

- Lameta, A.d.A. and Jay, M., 1987. Study of soybean and lentil root exudates. III. Influence of soybean isoflavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms. *Plant and Soil (Netherlands)*, 101(2): 267-272.
- Lebman, P.S., Mochado, C.C., Tarrago, M.T. and Correo, C.F., 1976. Evaluation of recommended soybean, maize and sorghum cultivars and soybean lines for resistance to "dead patch". *Summa Phytopathologica*, 2(1): 47-49.
- Lee, Y.-J. et al. , 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99(2): 378-386.
- Leite, V.M., Rosolem, C.A. and Rodrigues, J.D., 2003. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. *Scientia Agricola*, 60: 537-541.
- Liu, K., 1997. Chemistry and nutritional value of soybean components, *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Springer US, pp. 25-113.
- Long, S.R., 1989. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56(2): 203-214.
- Lucas, J., 1998. *Plant pathology and plant pathogens*. Oxford, UK, Blackwell Science.
- Lumsden, R. and Locke, J., 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology*, 79(3): 361-366.
- Mahmodi, F. et al. , 2013. First report of Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. *Plant Disease*, 97(6): 841-841.
- Maksimov, I., Abizgil'dina, R. and Pusenkova, L., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(4): 333-345.
- Masciarelli, O., Llanes, A. and Luna, V., 2014. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169(7-8): 609-615.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M.J. and Zapata-Revilla, M.A., 2008. Soybean, a promising health source. *Nutrición Hospitalaria*, 23(4): 305-312.
- Mathesius, U. et al. , 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal*, 14(1): 23-34.
- Menendez, A.B. and Godeas, A., 1998. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants: degradation of the cell wall of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). *Mycopathologia*, 142(3): 153-160.
- Messina, M.J., 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3 Suppl): 439S-450S.

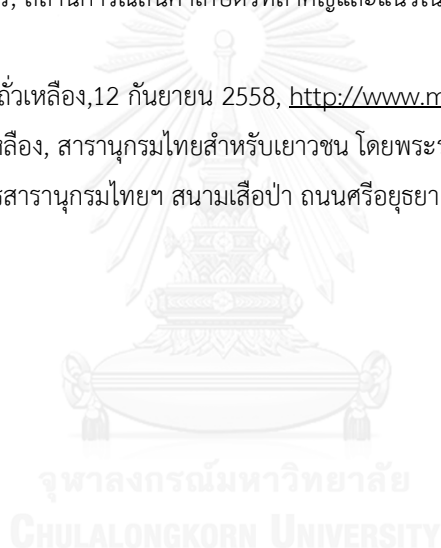
- Milagres, A.M., Machuca, A. and Napoleao, D., 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1): 1-6.
- Mishra, P.K., Mishra, S., Selvakumar, G., Kundu, S. and Shankar Gupta, H., 2009. Enhanced soybean (*Glycine max* L.) plant growth and nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*-SB1 in presence of *Bacillus thuringiensis*-KR1. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 59(2): 189-196.
- Mislivec, P.B. and Brunce, V.R., 1977. Incidence of toxic and other mold species and genera in soybeans. *Journal of Food Protection*, 40: 309-312.
- Mizumoto, S., Hirai, M. and Shoda, M., 2007. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6): 1267-1274.
- Mueller, T., Soybean seedling diseases, 2015, Sep 19, <https://extension.purdue.edu/extmedia/CPN/CPN-1008.pdf>.
- Nalisha, I., Muskhazli, M. and Nor Farizan, T., 2006. Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(2): 19-23.
- Nath, R. and Lambat, A., 1971. Fungi reported on the imported seed and other plant materials in India, *Indian Phytopathology*, pp. 189-192.
- Nilsson, W.B. and Strom, M.S., 2002. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(3): 175-185.
- Ogoshi, A., 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1): 125-143.
- Orellana, R.G., Sloger, C. and Miller, V.L., 1976. *Rhizoctonia-Rhizobium* interactions in relation to yield parameters of soybean [*Rhizoctonia solani*, *Rhizobium japonicum*, fungal root rot, nitrogen fixing bacteria]. *Phytopathology*: 464-467.
- Pal, K.K. and Gardener, B.M., 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2: 1117-1142.
- Parmar, P. and Sindhu, S., 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1): 25-31.
- Perez-Montano, F. et al. , 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5-6): 325-336.
- Polonenko, D. et al. , 1987. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(6): 498-503.

- Pongsamrangun, S. and Rerngsamran, P., 2015. Biocontrol activity by soil bacteria and plant growth promoting ability by PGPR for fungal disease management in soybean, the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2015), Mandarin Hotel Bangkok, pp. 479-486.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N. and Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3): 142-149.
- Reddy, P.P., 2014. Plant growth promoting Rhizobacteria for horticultural crop protection. Springer, India.
- Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P. and Mycin, T.R., 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allim cepa*. L). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2): 568-574.
- Rodríguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4): 319-339.
- Rossum, D.v., Muyotcha, A., van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. and Boogerd, F.C., 1994. Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating groundnut. *Plant and Soil*, 163(2): 177-187.
- Roy, K.W., Baird, R.E. and Abney, T.S., 2001. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. *Mycopathologia*, 150(1): 15-27.
- Saharan, B. and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1-30.
- Sato, T., 2014. Effects of Rhizobium Inoculation on nitrogen fixation and growth of leguminous green manure crop hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). In: T. Ohyama (Editor), *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*.
- Sayyed, R., Chincholkar, S., Reddy, M., Gangurde, N. and Patel, P., 2013. Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In: D.K. Maheshwari (Editor), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer, pp. 449-471.
- Schnebly, S.R. and Fehr, W.R., 1993. Effect of years and planting dates on fatty acid composition of soybean genotypes. *Crop Science*, 33: 716-719.
- Schouten, A. et al. , 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2, 4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11): 1201-1211.

- Schroth, L., 1986. Influence of bacteria sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.
- Senthilkumar, M., Swarnalakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y.K. and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology*, 58(4): 288-293.
- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y. and Qian, M., 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156(3): 1164-1170.
- Shoda, M., 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6): 515-521.
- Siddiqui, Z.A., Khan, A.M. and Husain, S.I., 2006. PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Netherlands.
- Sinclair, J.B., 1989. Compendium of soybean diseases. American phytopathological society Illinois, USA
- Smith, A., Biology 190A Lab Final, 2 June 2016, <https://www.studyblue.com/notes/n/biology-190a-lab-final/deck/3153716>.
- Somasegaran, P. and Hoben, H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume *Rhizobium* Technology. Springer, USA.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448.
- Sundaramoorthy, S. and Balabaskar, P., 2012. Consortial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria for the management of early blight of tomato Incited by *Alternaria solani*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 3(7): 4.
- Tadlibana, H., 1968. *Rhizoctonia solani* root rot epidemic of soybesns in Central Iowa in 1967. *Plant Disease Report*, 52: 613-614.
- The United States Department of Agriculture, Global soybean production, 2016, June 2, <http://www.globalsoybeanproduction.com/>.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. and Tillberg, E., 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13): 1847-1852.
- Tredway, L. and Burpee, L., Rhizoctonia diseases of turfgrass, 19 Sep 2016, <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoctonia.aspx>.

- Tripathi, M., Johri, B.N. and Sharma, A., 2006. Plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strains reduce natural occurrence of anthracnose in soybean (*Glycine max* L.) in central Himalayan region. *Current Microbiology*, 52(5): 390-394.
- Tu, C.M., 1982. Effect of pyrethroid insecticides on soybean and its pathogen *Rhizoctonia solani* Kuehn. *Journal of Environmental Science and Health*, 17(1): 43-50.
- Vahidi, H., Kobarfard, F. and Namjoyan, F., 2004. Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptcephala*. *African Journal of Biotechnology*, 3(11): 606-609.
- Van Loon, L., Bakker, P. and Pieterse, C., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1): 453-483.
- Vasudevan, P. and Briggs, M., 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 421-430.
- Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K. and Lavakush, S.V., 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5: 954-983.
- Verma, V.C. and Kharwar, R.N., 2006. Efficacy of neem leaf extract against it's own fungal endophyte *Curvularia lunata*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2: 329-335.
- Vincent, J., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Press, Oxford, UK.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(suppl 1): 487-511.
- Wilson, R.F., 2004. Seed Composition. In: H.R. Boerma and J.E. Specht (Editors), *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. American Society of Agronomy, Inc, Madison,WI,USA, pp. 621-678.
- Wise, K. et al. , Soybean seedling diseases,2 June 2016, <https://extension.purdue.edu/extmedia/CPN/CPN-1008.pdf>.
- Wong, M.H., Tang, L.Y. and Kwok, F.S., 1996. The use of enzyme-digested soybean residue for feeding common carp. *Biomedical and Environmental Sciences* 9(4): 418-423.
- Yang, X.B., Snow, J.P. and Berggren, G.T., 1991. Patterns of *Rhizoctonia* foliar blight on soybean and effect of aggregation on disease development. *Phytopathology*, 81(3): 287-293.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L. and Zhou, G., 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2): 138-145.

- Yuttavanichakul, W. et al. , 2012. Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*. *Biological Control*, 63(2): 87-97.
- Zhang, D., Lax, A.R., Raina, A.K. and Bland, J.M., 2009. Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(8): 516-522.
- จิระเดช แจ่มสว่าง, 2546. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. In: จ. แจ่มสว่าง (Editor), การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน คณะเกษตร ภาควิชาโรคพืช, นครปฐม.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, สถิติการนำเข้า, 12 กุมภาพันธ์ 2558, http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/import.php.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มในปี 2558, 12 กันยายน 2558, www.oae.go.th.
- องค์การตลาดเพื่อเกษตรกร, ถั่วเหลือง, 12 กันยายน 2558, <http://www.mof.or.th/>.
- อาวุธ ณ ลำปาง, 2538. ถั่วเหลือง, สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, โครงการสารานุกรมไทยฯ สยามเสื่อป่า ถนนศรีอยุธยา เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300.





ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 7 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น (ยกเว้นผงวุ้น) 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 7 จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. อาหารเหลว Yeast Mannitol broth (YMB)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปยีสต์แมนนิทอล (Yeast Mannitol Broth)	12.8	กรัม
---	------	------

HiMedia Laboratories, India

เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.6-6.8 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง Yeast Mannitol Agar w/ Congo Red (YMCA)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป ยีสต์แมนนิทอลที่มีคองโกเรด (Yeast Mannitol Agar w/congo red)	31.82	กรัม
--	-------	------

บริษัท HiMedia Laboratories, India

เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.6-6.8 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Potato Dextrose Broth (PDB)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
--	----	------

HiMedia Laboratories, India

เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 5.1-5.3 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
--	----	------

HiMedia Laboratories, India

ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม
---------------	----	------

ละลาย PDB ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 5.1-5.3 จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7. 2% (w/v) 1-carboxymethylcellulose (CMC) agar

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC)	20	กรัม
------------------------------	----	------

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
---------------------------------	---	------

ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.7	กรัม
---	-----	------

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	1	กรัม
--	---	------

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
--	-----	------

ไอออน (III) ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
--	------	------

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.8-7.2 จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. 3% (w/v) powdered skim milk agar plates

ผงนมขาดมันเนย (skim milk powder)	30	กรัม
----------------------------------	----	------

เคซีนเอนไซม์ไฮโดรไลเซต ไทป์ I	5	กรัม
-------------------------------	---	------

casein enzymatic hydrolysate, type-I)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.5	กรัม
---------------------------------	-----	------

กลูโคส	1	กรัม
--------	---	------

ผงวุ้น	15	กรัม
--------	----	------

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 7 จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. 1% (w/v) colloidal chitin agar plates

Colloidal chitin	10	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	0.5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม

เตรียม colloidal chitin โดยชั่ง Chitin 10 กรัม เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น (H_3PO_4) 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยฟรอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชม. จากนั้นนำมาเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้า ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 3-4 ชั้น และล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.8-7.2 จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS ประกอบด้วย 3 ส่วน ดังนี้

สารละลาย CAS	100	มิลลิลิตร
Basal agar medium	880	มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคส 50 เปอร์เซนต์	20	มิลลิลิตร

การเตรียม สารละลายCAS

เตรียมสารละลาย CAS โดยชั่ง โครมอะซัวร์อลเอส (chrome azurol S, CAS) 60.5 mg ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม สารละลายเหล็ก (Fe(III)solution) 10 มิลลิลิตร สารละลายเหล็ก (Fe(III)solution) เตรียมจากละลาย 27 มิลลิกรัมของ ไอรอน (III) คลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ใน กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 83.3 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม สารละลาย HDTMA โดยเตรียมจาก 72.9 มิลลิกรัมของ HDTMA ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 40 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Basal agar medium 880 มิลลิลิตร

3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	30	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.3	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ NH_4Cl	0.1	กรัม
แอสพาราจีน (L-Asparagine)	0.5	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 6M NaOH จากนั้นเติมผงวุ้นคนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 880 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

ละลาย 50 กรัม กลูโคส ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CAS จะเตรียมโดยการเติม สารละลายกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ ลงใน Basal agar medium อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส คนตลอดเวลา จากนั้นค่อยๆเติม สารละลาย CAS ช้าๆ พยายามอย่าให้เกิดฟอง ผสมให้เข้ากันและเทลงบนเพลทปลอดเชื้อ 25 มิลลิลิตรต่อเพลท

11. สารละลายสารอาหารที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจน

สารละลาย 1

แคลเซียมคลอไรด์ดีไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	294.1	กรัม
--	-------	------

สารละลาย 2

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	136.1	กรัม
---	-------	------

สารละลาย 3

ไอออน (III) ซิเตรต ($FeC_6H_6O_7$)	6.7	กรัม
--------------------------------------	-----	------

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	123.3	กรัม
---	-------	------

โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	87.0	กรัม
--------------------------------	------	------

แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.338	กรัม
--	-------	------

สารละลาย 4

กรดบอริก (H_3BO_3)	0.247	กรัม
------------------------	-------	------

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.288	กรัม
---	-------	------

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.1	กรัม
--	-----	------

โคบอลต์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.056	กรัม
---	-------	------

โซเดียมโมลิบเดต ดีไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.048	กรัม
--	-------	------

ผสม 5 มิลลิลิตรของสารละลายแต่ละชนิด (1-4) ใส่ในน้ำกลั่น 5 ลิตร และเจือจางให้ได้ปริมาตร 10 ลิตร สำหรับสารละลายสารอาหารที่มีไนโตรเจน เต็ม 0.05% KNO_3 (0.5 กรัม/ลิตร) ปรับ pH ให้เป็น 6.6-6.8 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. อาหารแข็งเอียง Fahræus ที่มีหรือที่ปราศจากไนโตรเจน (ดัดแปลงจาก Vincent (1970))

สารอาหารหลัก (Macronutrient)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 M ⁽¹⁾	1	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) 0.7 M ⁽¹⁾	1	มิลลิลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4 M ⁽¹⁾	2	มิลลิลิตร
Fe-EDTA 20 mM ⁽²⁾	2.5	มิลลิลิตร

สารอาหารรอง (Micronutrient)

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร
โคบอลต์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร
โซเดียมโมลิบเดต ไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร
กรดบอริก (H_3BO_3) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1 mg/ml ⁽³⁾	0.1	มิลลิลิตร

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ ปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วย 1M NaOH จากนั้นเติมผงวุ้น 15 กรัม คนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ปลอดเชื้อ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน และตั้งหลอดเอียง 45 องศา รอจนอาหารแข็ง

สารอาหารหลัก (Macronutrient)⁽¹⁾ เตรียมและเก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อเปิดใช้ Fe-EDTA 20 mM⁽²⁾ เตรียมสารละลาย 2 ชนิด โดย ชั่ง 5.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ของ FeSO_4 และ 7.4 กรัม ของ Na_2EDTA ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายทั้งสองไปให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียสจนละลาย และนำมาผสมกัน

สารอาหารรอง (Micronutrient)⁽³⁾ เตรียมที่อุณหภูมิห้องและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 15% กลีเซอรอล
นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 17.24 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 82.76 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. สารละลายคองโกเรด (congo red solution) 0.1%

คองโกเรด	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

 ละลายคองโกเรดในน้ำกลั่น คนให้ละลาย
3. Salkowsky reagent

0.5 M FeCl_3	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	490	มิลลิลิตร
70% perchloric acid	490	มิลลิลิตร

 เตรียม 0.5 M FeCl_3 โดยชั่ง FeCl_3 135.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
4. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate (TAE)
 เตรียมจาก บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Trisma base	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	กรัม

 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ จนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X
5. สีติดตาม 10X Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %	
ซูโครส	40 %	

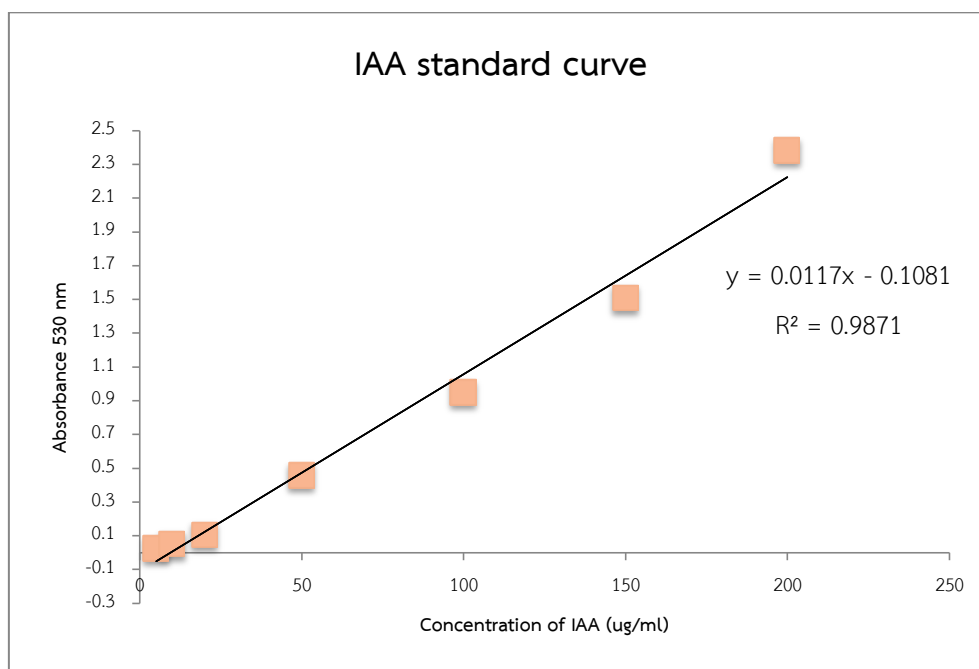
 ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุตลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
ซึ่งเอธิเดียมโบรไมด์ 0.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะปิดมิดชิด
และพ้นจากแสง



ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐาน IAA



2. ตารางแสดงความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียในดินและแบคทีเรียปมราก 100 ไอโซเลต

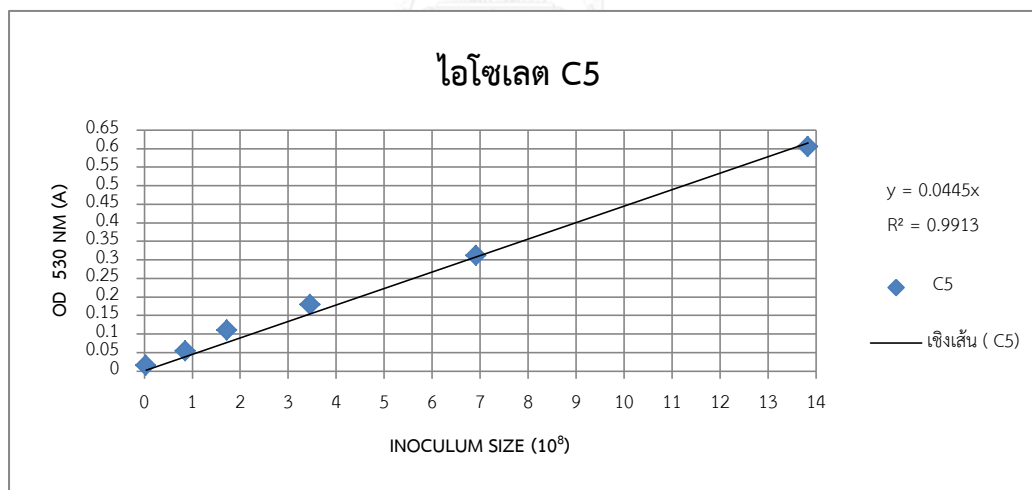
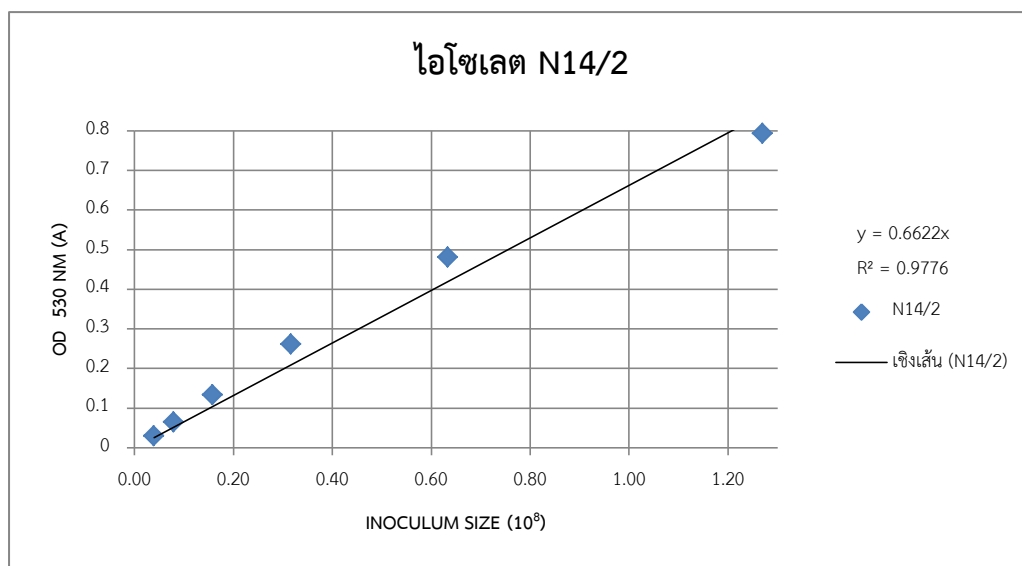
ไอโซเลต/ รา	ความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค					
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	<i>R. solani</i>	<i>Pythium</i> sp.
N1	-	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-	-
N4	-	-	-	-	-	-
N5	-	-	-	-	-	-
N6	-	-	-	-	-	-
N7	-	-	-	-	-	-
N8	-	-	-	-	-	-
N9	-	-	-	-	-	-
N10	-	-	-	-	-	-
N11	-	-	-	-	-	-
N12	-	-	-	-	-	-
N13	-	+	+	+	+	-
N14	-	-	+	+	+	-
N15	-	-	-	-	-	-
N16	-	-	-	-	-	-
N17	-	-	-	-	-	-
N18	-	-	-	-	-	-
N19	-	-	-	-	-	-

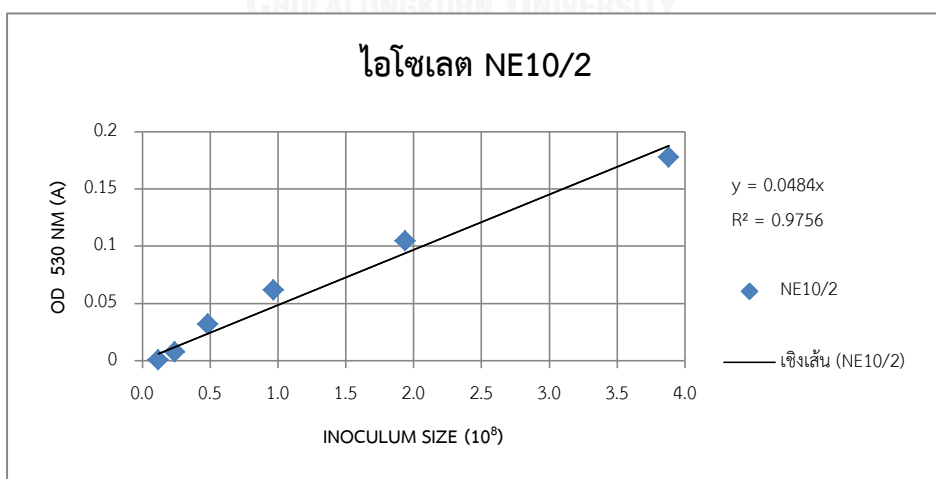
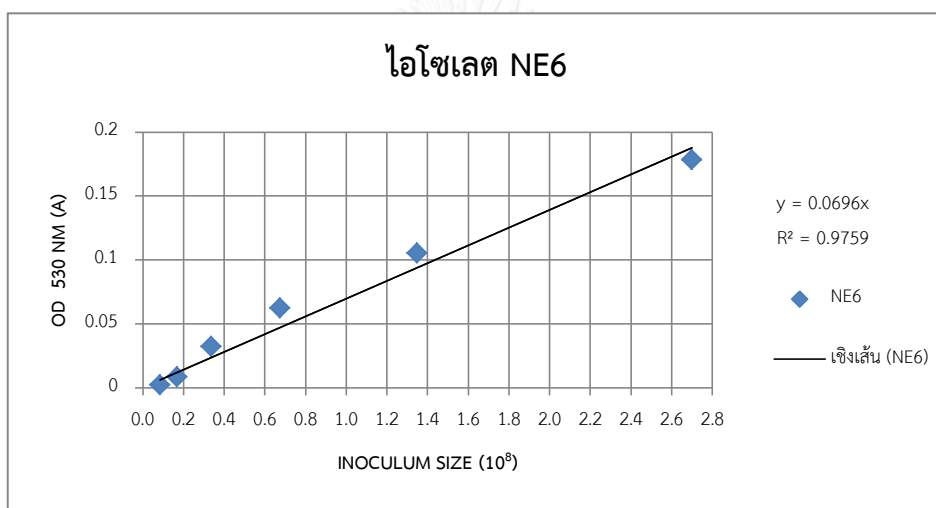
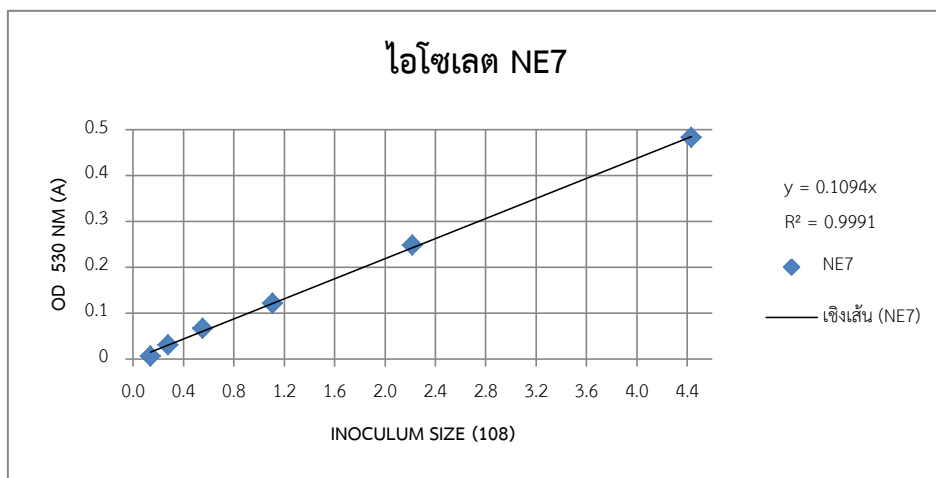
N20	-	-	-	-	-	-
C1	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-
C5	+	+	-	+	+	-
C6	-	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	-
C9	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-
NE1	-	-	-	-	-	-
NE2	-	-	-	-	-	-
NE3	-	-	-	-	-	-
NE5	-	-	-	-	-	-
NE6	+	+	+	+	+	-
NE7	+	+	+	+	+	-
NE8	-	-	-	-	-	-
NE9	-	-	-	-	-	-
NE10	+	+	+	+	+	-
NE11	-	-	-	-	-	-
NE12	-	-	-	-	-	-
NE13	-	-	-	-	-	-
NE14	-	-	-	-	-	-
NE15	-	-	-	-	-	-
NE16	-	-	-	-	-	-
NE17	-	-	-	-	-	-
NE18	-	-	-	-	-	-
NE19	-	-	-	-	-	-
NE20	-	-	-	-	-	-
01002	-	-	-	-	-	-
01007	-	-	-	-	-	-
01008	-	-	-	-	-	-
01010	-	-	-	-	-	-
01011	-	-	-	-	-	-
01014	-	-	-	-	-	-
01015	-	-	-	-	-	-
01017	-	-	-	-	-	-
01019	-	-	-	-	-	-
01023	-	-	-	-	-	-
01024	-	-	-	-	-	-
01027	-	-	-	-	-	-
01028	-	-	-	-	-	-
01029	-	-	-	-	-	-
01034	-	-	-	-	-	-
01041	-	-	-	-	-	-
01042	-	-	-	-	-	-

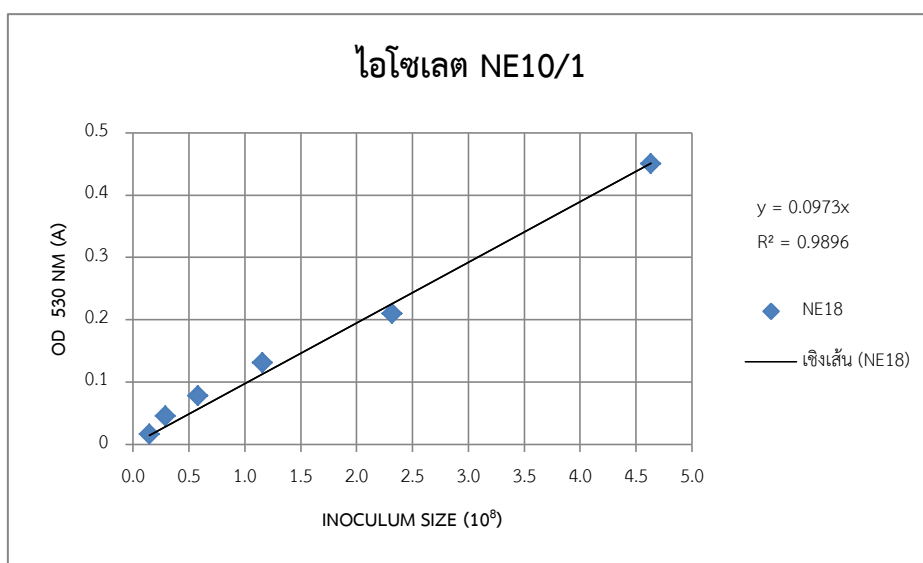
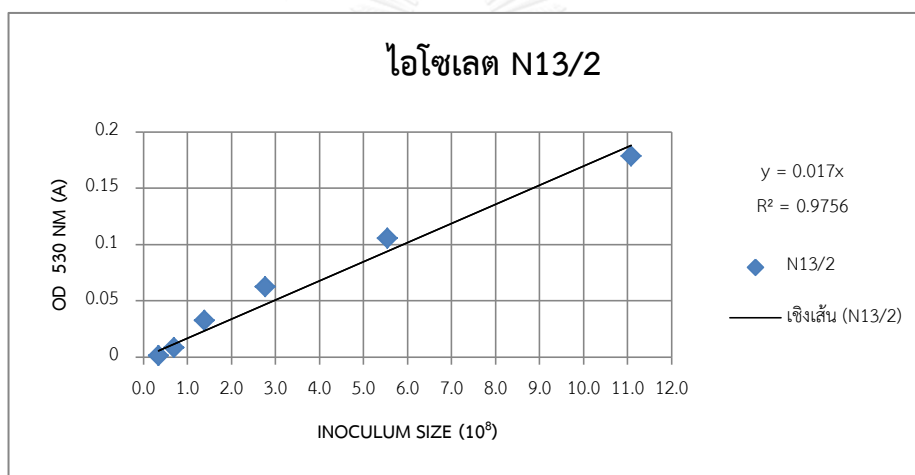
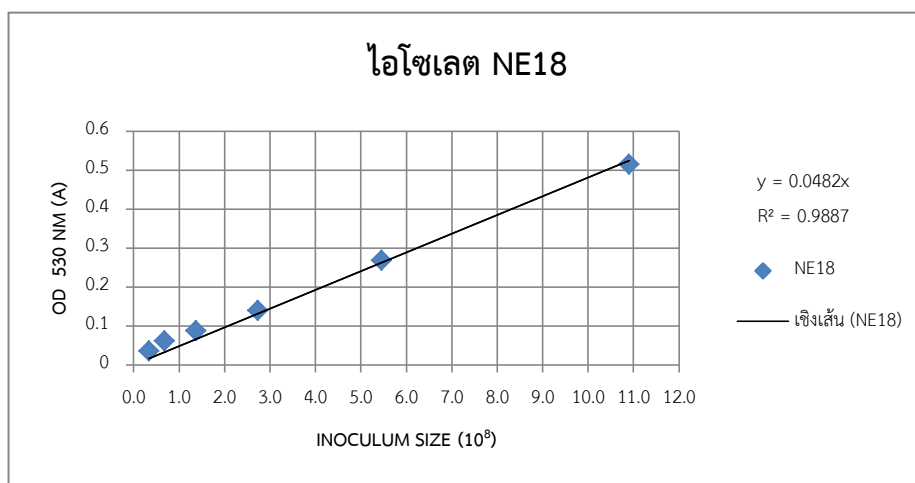
01054	-	-	-	-	-	-
01134	-	-	-	-	-	-
01135	-	-	-	-	-	-
03017	-	-	-	-	-	-
03018	-	-	-	-	-	-
03027	-	-	-	-	-	-
03028	-	-	-	-	-	-
03034	-	-	-	-	-	-
03043	-	-	-	-	-	-
03057	-	-	-	-	-	-
03059	-	-	-	-	-	-
03061	-	-	-	-	-	-
03063	-	-	-	-	-	-
03066	-	-	-	-	-	-
03069	-	-	-	-	-	-
03071	-	-	-	-	-	-
03084	-	-	-	-	-	-
03085	-	-	-	-	-	-
03093	-	-	-	-	-	-
03094	-	-	-	-	-	-
03114	-	-	-	-	-	-
03118	-	-	-	-	-	-
55001	-	-	-	-	-	-
55002	-	-	-	-	-	-
55003	-	-	-	-	-	-
55004	-	-	-	-	-	-
55006	-	-	-	-	-	-
55008	-	-	-	-	-	-
55009	-	-	-	-	-	-
55011	-	-	-	-	-	-
55012	-	-	-	-	-	-
55013	-	-	-	-	-	-

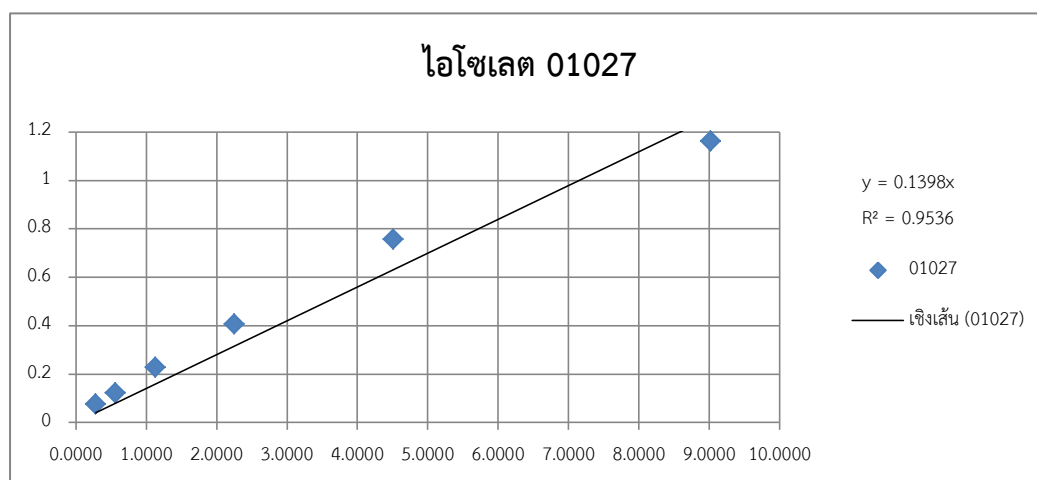
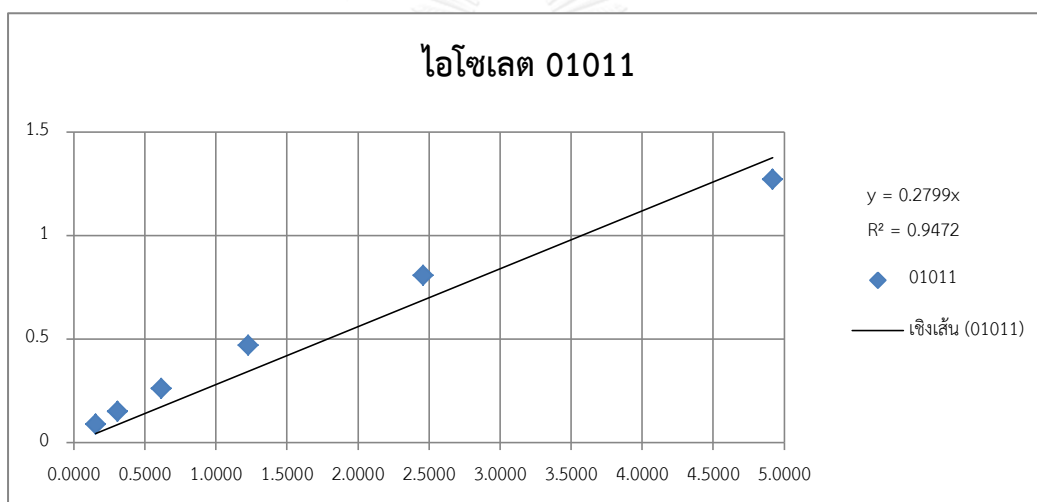
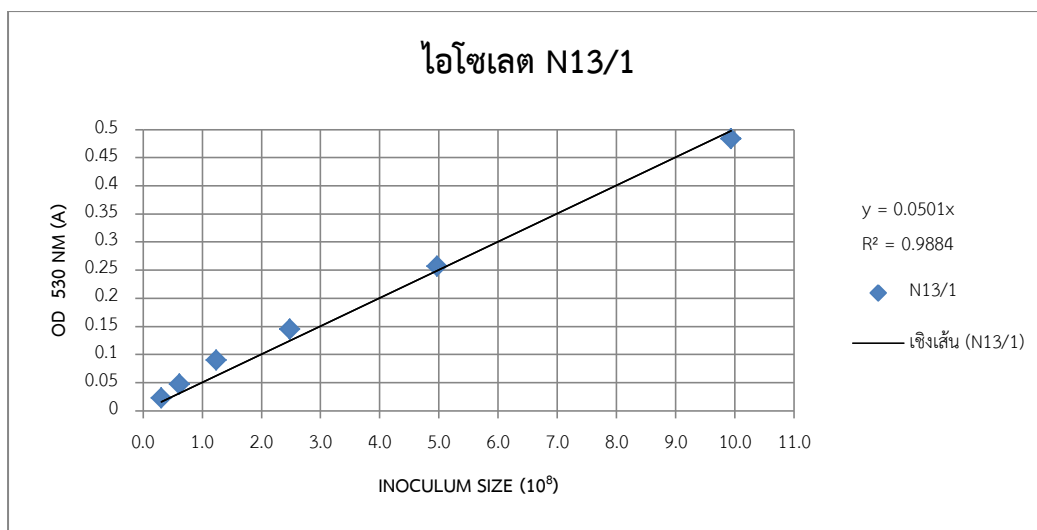
หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงว่า พบการยับยั้งการเจริญของรา, เครื่องหมาย - แสดงว่า ไม่พบการยับยั้งการเจริญ
ของรา

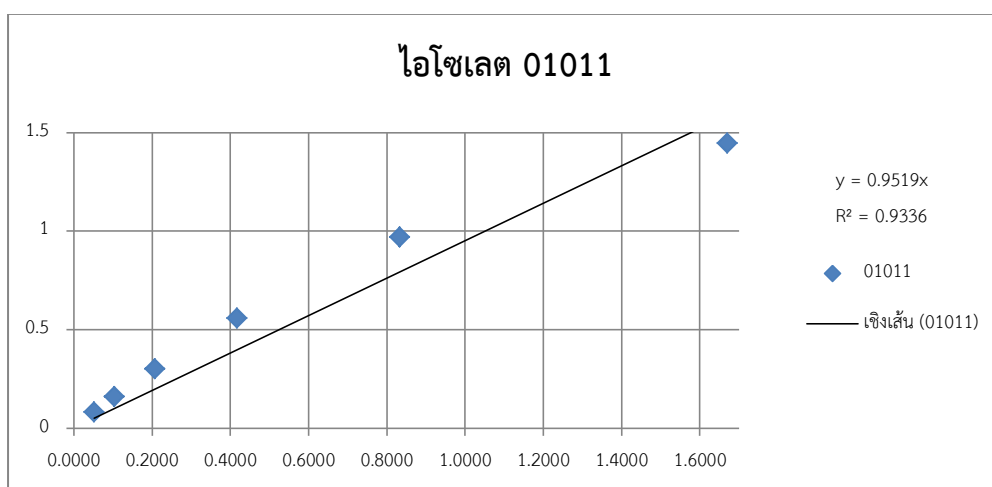
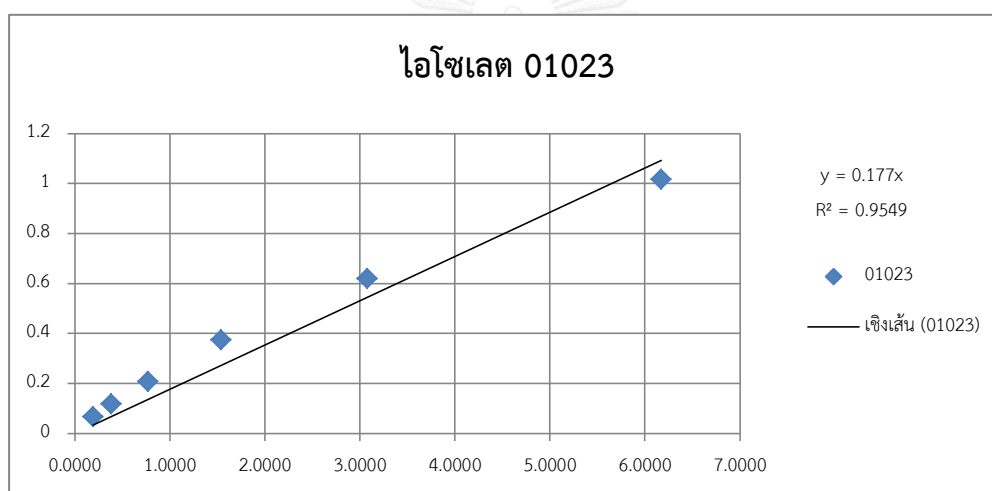
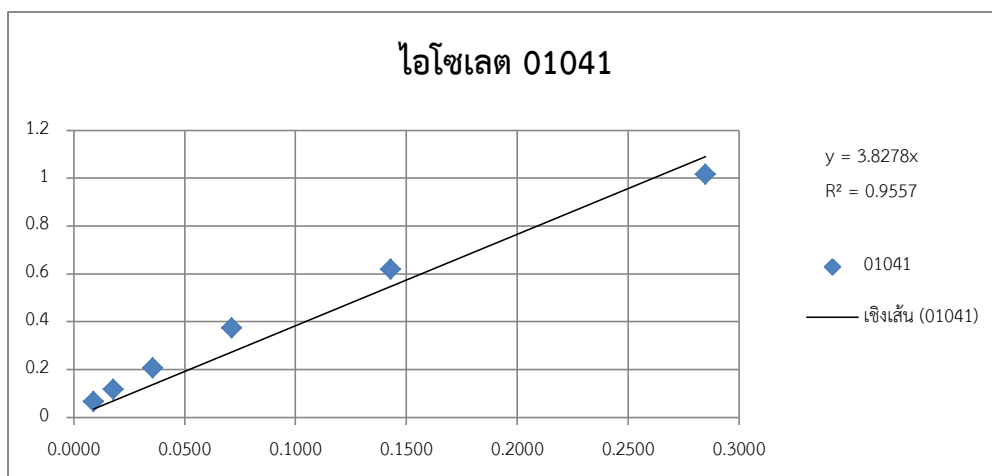
3. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อ (inoculum size) และค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร (OD) ของไอโซเลตต่างๆ

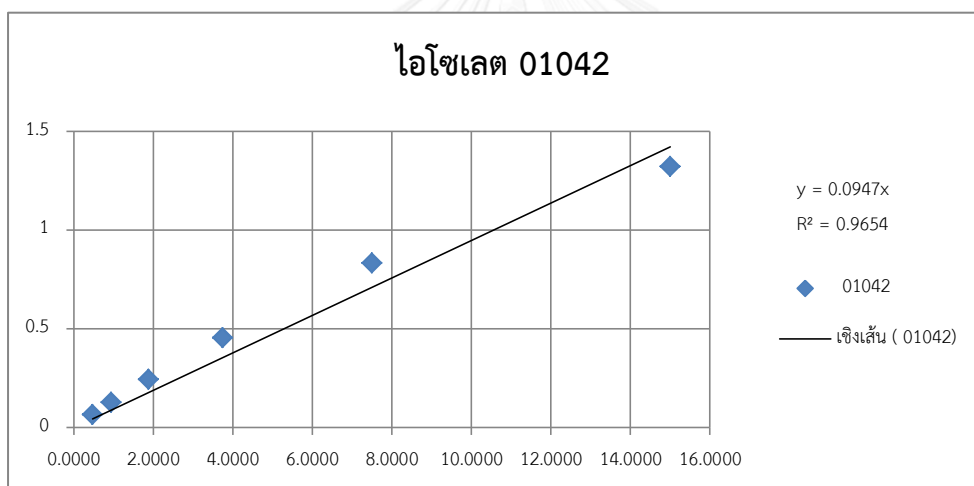
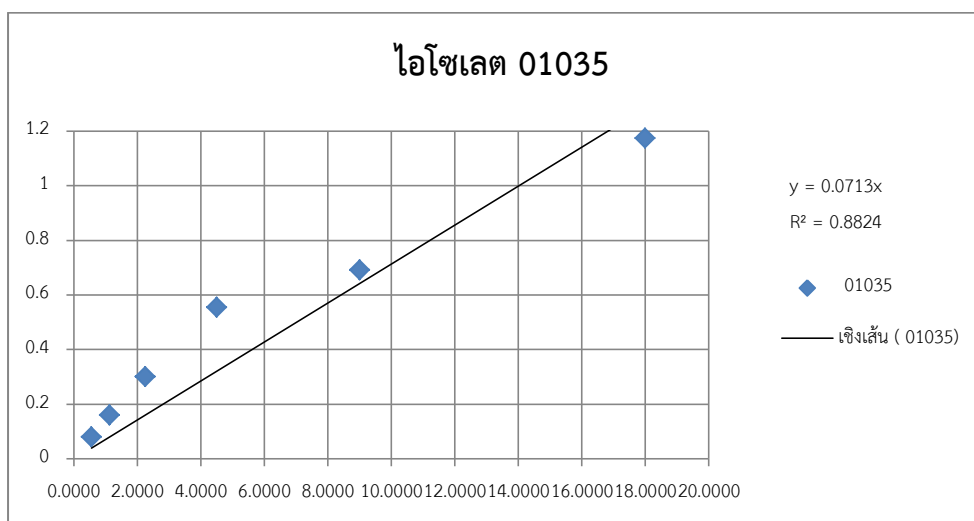












ภาคผนวก ง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสต์ราโอโซเลต NE10/2

1 CTTGCTCCCT GATGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACT GCCTGTAAGA
 61 CTGGGATAAC TCCGGGAAAC CGGGGCTAAT ACCGGATGGT TGTTTGAACC GCATGGTTCA
 121 GACATAAAAG GTGGCTTCGG CTACCACTTA CAGATGGACC CGCGGCGCAT TAGCTAGTTG
 181 GTGAGGTAAC GGCTCACCAA GCGACGATG CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC
 241 ACTGGGGACT GGAGACACGG CCCAGACTC CTTACGGGAG GCAGCCAGTA GGGAAATCTTC
 301 CGCCAATGGA CGAAAATTCT GACGGAGCAA CCCC CGCGTG AGTGATGAAG GTTTTCGGAT
 361 CGTAAAGCTC TGTGTTAGG GAAGAACAAG TGCCGTTCAA ATAGGGCGGC ACCTTGACGG
 421 TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTGGC
 481 AAGCGTTGTC CGGAATTAAT GGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT
 541 GAAAGCCCCC GGCTCAACCG GGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGGAACTTGA GTGCAGAAGA
 601 GGAGAGTGGA ATTCCACGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCACTGG
 661 CGAAGGCGAC TCTCTGGTCT GTAACCTGACG CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG
 721 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CAGCCCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GGGGGTTTCC
 781 GCCCCTTAGT GCTGCAGCTA ACGCATTAAAG CACTCCGCCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC
 841 TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCTGA
 901 AGCAACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAATCCTAGA GATAGGACGT
 961 CCCCTTCGGG GGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
 1021 TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTTGGG
 1081 CACTCTAAGG GTGACTGCCC GGTGACAAAC CCGAAGGAAG GTGGGGGATG ACGTCAAATC
 1141 ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACAGAACA AAGGGCAGCG
 1201 AAACCGCGAG GTTAAGCCAA TCCCACAAAT CTGTTCTCAG TTCGGATCGC AGTCTGCAAC
 1261 TCGACTGCGT GAAGCTGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG GTGAATACGT
 1321 TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA CCACGAGAGT TTGTAACACC CGAAGTCGGT
 1381 GAG

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสต์ราโอโซเลต N13/1

1 TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAACCCGG
 61 GAAACCGGGG CTAATACCGG ATGGTTGTTT GAACCGCATG GTTCAAACAT AAAAGGTGGC
 121 TTCGGCTACC ACTTACAGAT GGACCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAATGGCTC
 181 ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA
 241 CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAACTCTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA
 301 CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTT TTCGGATCGT AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA
 361 GAACAAGTAC CGTTCGAATA GGGCGGTACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT
 421 AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCCG AATTATGTTG
 481 CGTAAAGGGC TCGCAGGCGG TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCCGGC TCAACCGGGG
 541 AGGGTCATTG GAAACTGGGG AACTTGAGTG CAGAAGAGGA GAGTGGAAAT CCACGTGTAG
 601 CCGTGAAATG CGTAGAGATG TGGAGGAACA CCAGTGGCGA AGGCGACTCT CTGGTCTGTA
 661 ACTGACGCTG AGGAGCGAAA GCGTGGGGAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 721 GCCGTAAACG ATGAGTGCTA AGTGTAGGGG GGTTCGCCCT CCTTAGTGCT GCAGCTAACG
 781 CATTAAAGCAC TCCGCTGGG GAGTACGGTC GCAAGACTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
 841 GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACCGGAAGA ACCTTACCAG
 901 GTCTTGACAT CCTCTGACAA TCCTAGAGAT AGGACGTCCC CTTCGGGGGC AGAGTGACAG
 961 GTGGTGCATG GTTGTGCTCA GCTCGTGTG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACCGAG
 1021 CGCAACCCCT TGATCTTAAG TTGCCAGCAT TTCAGTTTGG GCACCTAAG GTGACTGCCG
 1081 GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCTTA TGACCTGGCC
 1141 TACACACGTC CTACAATGGA CAGAACAAG GGCAGCGAAA CCGCAGGTT AAGCCAATCC
 1201 CACAAATCTG TTCTCAGTTC GGATCGCAGT CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GCTGGAAATCG
 1261 CTAGTAATCG CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTC CCGGCCTTGT ACACACCGCC
 1321 CGTACACCA

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสราโอโซเลต N13/2

1 CTGATGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC CTGCCTGTAA GACTGGGATA
 61 ACTCCGGGAA ACCGGGGCTA ATACCGGATG GTTGTTTGAA CCGCATGGTT CAAACATAAA
 121 AGGTGGCTTC GGCTACCACT TACAGATGGA CCCGCGGCGC ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA
 181 ATGGCTCACC AAGGCAACGA TCGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACGACTGGAC
 241 TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGACGAA
 301 AGTCTGACGG AGCAACCCCC GCGTGAGTGA TGAAGGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG
 361 TTAGGGAAGA ACAAGTACCG TTCGAATAGG GCGGTACCTT GACGGTACCT AACGAGAAAG
 421 CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA
 481 TTATTGGGCG TAAAGGGCTC GCAGGCGGTT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCCCGGCTC
 541 AACCGGGGAG GGTCAATTGA AACTGGGGAA CTGAGTGCA GAAGAGGAGA GTGGAATTCC
 601 ACGTGTACGG GTGAAATGCG TAGAGATGTG GAGGAAACACC AGTGGCCGAG CCGACTCTCT
 661 GGTCTGTAAC TGACGCTGAG GAGCGAAAGC GTGGGGAGCG AACAGGATTA GATACCTTGG
 721 TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAGTGCTAAG TGTTAGGGGG TTTCCGCCCC TTAGTGCTGC
 781 AGCTAACGCA TTAAGCACTC CGCTGGGGA GTACGGTCGC AAGACTGAAA CTCAAAGGAA
 841 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC
 901 CTTACCAGGT CTTGACATCC TCTGACAATC CTAGAGATAG GACGTCCCCT TCGGGGGCAG
 961 AGTGACAGGT GGTGCATGGT TGTGCTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCC
 1021 CAACGAGCGC AACCCTTGAT CTTAGTTGCC AGCATTCACT TGGGCACTCT AAGTGACTG
 1081 CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTAGTACCTG
 1141 GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACAGAACA AAGGGCAGCG AAACCGCGAG GTTAAGCCAA
 1201 TCCCACAAAT CTGTTCTCAG TTCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGCTGGAA
 1261 TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCCGG GTGAATACGT TCCCAGGCCT TGTACACACC
 1321 GCCCGTCACA CCACGAGAGT

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสราโอโซเลต N14/1

1 AGAGCTTGCT CTTATGAAGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT AACCTGCCCA
 61 TAAGACTGGG ATAACCTCCG GAAACCGGG CTAATACCGG ATAACATTTT GAACCCCATG
 121 GTTCGAAATT GAAAGGCGGC TTCGGCTGTC ACTTATGGAT GGACCCCGCT CGCATTAGCT
 181 AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG
 241 GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC
 301 CGCCAATGGA CGAAAATTCT GACGGGAGCA ACCCCCGCGT GAGTGATGAA GGCTTTCGGG
 361 GTCGTAAAAC TCTGTTGTTA GGAAGAACA AGTGCTAGTT GAATAAGCTG GCACCTTGAC
 421 GGTACCTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCCGGTAA TACGTAGGTG
 481 GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGCGGCA GGTGGTTTCT TAAGTCTGAT
 541 GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC CGTGGAGGGT CATTGGAAC TGGGAGACTT GAGTGCAGAA
 601 GAGGAAAGTG GAATTCCATG TGTAGCCGTG AAATGCGTAG AGATATGGAG GAACACCAGT
 661 GGCGAAGCGG ACTTCTGGT CTGTAAGTGA CACTGAGGCG CGAAAGCGTG GGGAGCAAC
 721 AGGATTAGAT ACCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAG TGCTAAGTGT TAGAGGGTTT
 781 CCGCCCTTTA GTGCTGAAGT TAACGCATTA AGCACTCCG CTGGGGAGTA CGGCCCAAG
 841 GCTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC
 901 GAAGCAACGC GAAGAACCCT ACCAGGTCTT GACATCCTCT GAAAACCTA GAGATAGGGC
 961 TTCTCCTTCG GGAGCAGAGT GACAGGTGGT GCATGGTGT CGTCAGCTCG TGTCTGAGA
 1021 TGTTGGGTAA AGTCCCAGCA CGAGCGCAAC CCTTGATCTT AGTTGCCATC ATTAAGTTGG
 1081 GGCACCTTAA GGGTGACTGG CCGGTGACAA ACCCGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAT
 1141 CATCATGCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGTACAA TGGACGGTAC AAAGAGCTGC
 1201 AAGACCGCGA GGTGGAGCTA ATCTCATAAA ACCGTTCTCA GTTCGGATTG TAGGCTGCAA
 1261 CTCGCCTACA TGAAGCTGGA ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCATGCCG GGTGAATACG
 1321 TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCGTCAC ACCACGAGAG TT

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสราโอโซเลต C5

1 TGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG GGTAACCTGC CTGTAAGACT GGGATAACTC
 61 CGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATGGTTG TTTGAACCGC ATGGTTCAAA CATAAAAGGT
 121 GGCTTCGGCT ACCACTTACA GATGGACCCG CGGCGCATTA GCTAGTTGGT GAGGTAATGG
 181 CTCACCAAGG CAACGATGCG TAGCCGACCT GAGAGGGTGA TCGGCCACAC TGGGACTGAG
 241 ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCGCAATG GACGAAAGTC
 301 TGACGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGATGAAG GTTTTCGGAT CGTAAAGCTC TGTGTTAGG
 361 GAAGAACAAG TACCGTTTCA ATAGGGCGGT ACCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG
 421 GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTGTC CGGAATTATT

481 GGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT GAAAGCCCC GGCTCAACCG
 541 GGGAGGGTCA TTGGAACTG GGAACCTGA GTGCAGAGA GGAGAGTGA ATTCCACGTG
 601 TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCAGTGG CGAAGGCGAC TCTCTGGTCT
 661 GTAACGTGAC CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC
 721 CACGCCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GGGGGTTTCC GCCCCTTAGT GCTGCAGCTA
 781 ACGCATTAAG CACTCCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC TGAAACTCAA AGGAATTGAC
 841 GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACCGGA AGAACCTTAC
 901 CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAATCCTAGA GATAGGACGT CCCCTTCGGG GGCAGAGTGA
 961 CAGGTGGTGC ATGGTTGTCTG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTAAAG TCCCGCAACG
 1021 AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT
 1081 GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTAGT ACCTGGGCTA
 1141 CACACGTGCT ACAATGGACA GAACAAAGG CAGCGAAACC GCGAGTTAA GCCAATCCCA
 1201 CAAATCTGTT CTCAGTTCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TCGGTGAAGC TGGAATCGCT
 1261 AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGATC ACACCGCCCC
 1321 TCACACCACG AGAGTTTGTG ACACCCGAAG TCGGTGAGG

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสราโฮโซเลต N14/2

1 AGAGCTTGCT CTTATGAAGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT AACCTGCCCA
 61 TAAGACTGGG ATAACCTCCG GAAACCGGG CTAATACCGG ATAACATTTT GAACCGCATG
 121 GTTCGAAAT GAAAGGCGGC TTCGGCTGTC ACTTATGGAT GGACCCGCGT CGCATTAGCT
 181 AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG
 241 GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC
 301 CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACC CCCGCGTGAG TGATGAAGGC TTTCGGGTCCG
 361 TAAAACCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTG CTAGTTGAAT AAGCTGGCAC CTTGACGGTA
 421 CCTAACCCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CCGTAATACG TAGGTGGCAA
 481 GCGTTATCCG GAATTATTGG GCGTAAAGCG CGCGCAGGTG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA
 541 AAGCCACGG CTAACCCGTG GAGGGTCATT GGAAACTGGG AGACTTGAGT GCAGAAGAGG
 601 AAAGTGGAAT TCCATGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT ATGGAGGAAC ACCAGTGGCG
 661 AAGGCGACTT TCTGGTCTGT AACTGACACT GAGGCGCGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA
 721 TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGA GGGTTTCCGC
 781 CCTTAGTGC TGAAGTTAAC GCATTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTAGCGC CGCAAGGCTG
 841 AAACCTCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG
 901 CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT
 961 CCTTCGGGAG CAGAGTGCAT GGTGTGTCAT GGTGTGTCGTC AGCTCGTGTG GCAGATGTT
 1021 GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCATCATTG AGTTGGGCAC
 1081 TCTAAGGGGA CTGCCGGTGA CAAACCCGAA GGAAGGGGGG GATGACGTCA AATCATCATG
 1141 CCCCTTATGA CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGACGG TACAAAGAGC TGCAAGACCG
 1201 CGAGGTGGAG CTAATCTCAT AAAACCGTTC TCAGTTCGGA TTGTAGGCTG CAACTCGCCT
 1261 ACATGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG
 1321 GCCTTGATACA CACCGCCCGT CACACCACGA GAGTTTGTA CACCCGAAGT CGGTGGGGTA
 1381 A

7. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสราโฮโซเลต NE6

1 TGATGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA
 61 CTCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGGATGG TTGTCTGAAC CGCATGGTTC AGACATAAAA
 121 GGTGGCTTCG GCTACCACCT ACAGATGGAC CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA
 181 CGGCTACCA AGGCGACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT
 241 GAGACACGGC CCCAGACTCC TTACGGGGAG GCAGCCAGTA GGAATCTTC CGCCAATGGA
 301 CGAAAATTCT GACGGAGCAA CCCCAGCTG AGTGATGAAG GTTTTCGGAT CGTAAAGCTC
 361 TGTGTTAGG GAAGAACAAG TGCCGTTCAA ATAGGGCGGC ACCTTGACGG TACCTAACCA
 421 GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTGTC
 481 CGGAATTAT GGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT GAAAGCCCC
 541 GGCTCAACCG GGGAGGGTCA TTGGAACTG GGAACCTGA GTGCAGAAGA GGAGAGTGGGA
 601 ATTCCACGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCAAGTG CGAAGGCGAC
 661 TCTCTGGTCT GTAACGTGAC CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC
 721 CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GGGGGTTTCC GCCCCTTAGT
 781 GCTGCAGCTA ACGCATTAAG CACTCCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC TGAAACTCAA
 841 AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACCGGA
 901 AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAATCCTAGA GATAGGACGT CCCCTTCGGG
 961 GGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCTG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTAAAG

1021 TCCGCAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTGGGC ACTCTAAGGT
 1081 GACTGCCGGT GACAAAACCG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG
 1141 ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACA GAACAAAGGG CAGCGAAACC GCGAGGTTAA
 1201 GCCAATCCCA CAAATCTGTT CTCAGTTCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TGCCTGAAGC
 1261 TGGAAATCGT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
 1321 ACACCGCCCG TCACACCACG AGAGTTT

8. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสร์ราไอโซเลต NE7

1 CTGTAAGACT GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATGGTTG TTTGAACCGC
 61 ATGGTTCAGA CATAAAAGGT GGCTTCGGCT ACCACTTACA GATGGACCCG CGGCGCATTA
 121 GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATGCG TAGCCGACCT GAGAGGGTGA
 181 TCGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC
 241 TTCCGCAATG GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGATGAAG GTTTTTCGGAT
 301 CGTAAAGCTC TGTGTTAGG GAAGAACAAG TGCCGTTCOA ATAGGGCGGC ACCTTGACGG
 361 TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTGGC
 421 AAGCGTTGTC CGGAATTATT GGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT
 481 GAAAGCCCC CGGCTCAACC CGGGGAGGGT CATTGAAAA CTGGGGAAC TGAAGTGCAGA
 541 AGAGGAGAGT GGAATTCCTA CGTGTAGCGG TGAATGCGT AGAGATGTGG AGGAACACCA
 601 GTGGCGAAGG CGACTCTCTG TCTGTAACT GACGCTGAGG AGCGAAACCG TGGGGAGCGA
 661 ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG AGTGCTAAGT GTTAGGGGGT
 721 TTCCGCCCTT TAGTGCTGCA GCTAACGCAT TAAGCACTCC GCCTGGGGAG TACGGTCGCA
 781 AGACTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGC CCGCACAAAG GGTGGAGCAT GTGGTTAAT
 841 TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATCCT CTGACATCC TAGAGATAGG
 901 ACGTCCCCTT CGGGGGCAGA GTGACAAGGT GGTGCATGGG TTGTCTCAG CTCCGTGTCG
 961 GGGAGATGTT GGGGTAAAGT CCCGCAACCA AGCGCAACCC TTTGATCTTA AGTTGCCAGG
 1021 CATTTCAGTT TGGGGCACTC TTAAGGGTGA CTGGCCGGGT GACAAAACCC GGAAGGAAGG
 1081 TGGGGGATG AACGTCAAAA TCATCCATGG CCCCTTATN GAACCTTGGG GCTACACACG
 1141 TGCTACAATG GACAGAACAA AGGGCAGCGA AACCGCAGG TTAAGCCAAT CCCACAAATC
 1201 TGTCTCAGT TCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGCTGGAAT CGCTAGTAAT
 1261 CGCGGATCAG CATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GT

9. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสร์ราไอโซเลต NE16

1 TGATGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA
 61 CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGATGG TTGTTTGAAC CGCATGGTTC AAACATAAAA
 121 GGTGGCTTCG GCTACCACTT ACAGATGGAC CCGCGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA
 181 CCGCTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT
 241 GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA
 301 GTCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG AAGGTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTGTGT
 361 AGGGAAGAAC AAGTACCGTT CGAATAGGGC GGTACCTTGA CCGTACCTAA CCAGAAAGCC
 421 ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT
 481 ATTTGGCGTA AAGGGCTCGC AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGTCAA
 541 CCGGGGAGGG TCATTGGAAA CTGGGGAAC TGAAGTGCAGA AGAGGAGAGT GGAATCCAC
 601 GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATGTGGA GGAACACCAG TGGCGAAGGC GACTCTCTGG
 661 TCTGTAAC TGACGAGGTA GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCTGGTA
 721 GTCCACGCCG TAAACGATGA GTGCTAAGTG TTAGGGGGTT TCCGCCCTT AGTGCTGCAG
 781 CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT ACGGTGCGAA GACTGAACT CAAAGGAATT
 841 GACGGGGGCC CGCACAAAGC GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG CGAAGAACCT
 901 TACCAGGTCT TGACATCCTC TGACAATCCT AGAGATAGGA CGTCCCCTT GGGGGCAGAG
 961 TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGTCT GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA
 1021 ACGAGCGCAA CCCTGATCT TAGTTGCCAG CATTCAAGTT GGCACCTAA GGTGACTGCC
 1081 GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG
 1141 CTACACACGT GCTACAATGG ACAGAACAAA GGGCAGCGAA ACCGCGAGGT TAAGCCAATC
 1201 CCACAAATCT GTTCTCAGTT CCGATCGCAG TGTGCAACT GACTGCGTGA AGCTGGAATC
 1261 GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT GAATACGTT CCGGGCCTTG TACACACCGC
 1321 CCGTCACACC ACGAGAGTTT GTAACACCCG AAGTCGGTGA GGTAACCTT A

10. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสต์ราโอโซเลต NE18

1 GATGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCTGTAAGA CTGGGATAAC
 61 TCCGGGAAAC CGGGGCTAAT ACCGGATGGT TGTTTGAACC GCATGGTTCA GACATAAAAG
 121 GTGGCTTCGG CTACCACTTA CAGATGGACC CGCGGCGCAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC
 181 GGCTCACCAA GGCAACGATG CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCA CACTGGGAAT
 241 TGAGACACCG GCCCCAGACT CCTTACGGGG AGGCAACCAG TAGGGAATCT TTCCGCAATG
 301 GACGAAAATC TGACGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGATGAAG GTTTTCGGAT CGTAAAGCTC
 361 TGTTGTTAGG GAAGAACAAG TGCCGTTCAA ATAGGGCGGC ACCTTGACGG TACCTAACCA
 421 GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTGTC
 481 CGGAATTAT TGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT GAAAGCCCC
 541 GGCTCAACCG GGGAGGGTCA TTGGAACTG GGAACCTGA GTGCAGAAGA GGAGGTTGGA
 601 ATTCACCGT TAGCGGTGAA ATCGGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCACTGG CGAAGGCGAC
 661 TCTCTGGTCT GTAACCTGACG CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC
 721 CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA GGGGGTTTCC GCCCCTTAGT
 781 GCTGCAGCTA ACGCATTAAG CACTCCGCTT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC TGAAACTCAA
 841 AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGA
 901 AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAATCCTAGA GATAGGACGT CCCCTTCGGG
 961 GGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG
 1021 TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTGGGC ACTCTAAGGT
 1081 GACTGCCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG
 1141 ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGGCA GAACAAAGGG CAGCGAAACC GCGAGGTTAA
 1201 GCCAATCCCA CAAATCTGTT CTCAGTTCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TCGGTGAAGC
 1261 TGGAAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
 1321 ACACCGCCCC TCACAC

11. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียยีสต์ราโอโซเลต NE10/1

1 CTTGCTCCCT GATGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG CGGGGTAACC TGACCTGTAA
 61 GACTGGGATA ACTCCGGGAA ACCGGGGGCTA ATACCGGATG GTTGTTTGAA CCGCATGGTT
 121 CAGACATAAA AGGTGGCTTC GGCTACCACT TACAGATGGA CCCGCGGCGC ATTAGCTAGT
 181 TGGTGAGGTA ACGGCTCAC AAGGCGACGA TGCGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC
 241 ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC
 301 AATGGACGAA AGTCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTTTTT GGATCGTAAA
 361 GCTCTGTTGT TAGGGAAGAA CAAGTGCCGT TCAAATAGGG CGGCACCTTG ACGGTACCTA
 421 ACCAGAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT
 481 TGTCCGGAAT TATGGGGCT AAAGGGCTCG CAGGCGGTTT CTTAAGTCTG ATGTGAAAGC
 541 CCCC GGCTCA ACCGGGGAGG GTCATTGGAA ACTGGGGAAC TTGAGTGCGA AAGAGGAGAG
 601 TGGAAATCCA CGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGAGATGTGG AGGAACACCA GTGGCGAAGG
 661 CACTCTCTG TCTGTAACT GACGTGAGG AGCGAAAGCG TGGGGAGCGA ACAGGATTAG
 721 ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAACGATG AGTGCTAAGT GTTAGGGGGT TTCCGCCCTT
 781 TAGTGCTGCA GCTAACGCAT TAAGCACTCC GCCTGGGGAG TACGGTCCGA AACTGAAAC
 841 TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAAG GGTGGAGCAT TTGGTTTAAAT TCGAAGCAAC
 901 GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATCCT CTGACAATCC TAGAGATAGG ACGTCCCTTT
 961 CGGGGG CAGA GTGACAGGTG GGTGCATGGG TTGTCTGCAA CCCC GTGTCG TGGAGATGTT
 1021 GGGGTTAAGT CCCC GCAACC AAGCGCAACC CTTTGATCTT AGTTTGCCAG CATTTCAGTT
 1081 GGGGCACTCT AAGGGGGACT GGCCGGTGAC AAACCCGGAA GGAAGGTGGG GATGACGTCA
 1141 AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGACAG AACAAAGGCG
 1201 AGCGAAACCG CGAGGTTAAG CCAATCCAC AAATCTGTTC TCAGTTCCGA TCGCAGTCTG
 1261 CAACTCGACT GCGTGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT
 1321 ACGTTCCCGG GCCTTG TACA CACCGC

12. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากแก้วเหลืองโอโซเลต 01010

1 CGTCAGCGGC AGACGGGTGA GTAACGCGTG GGAACGTACC TTTTGGTTTC GAACAACACA
 61 GGGAAACTTG TGCTAATACC GGATAAGCCC TTACGGGGAA AGATTTATCG CCGAAAGATC
 121 GGCCCGCGTC TGATTAGCTA GTTGGTGAGG TAATGGCTCA CCAAGGCGAC GATCAGTAGC
 181 TGGTCTGAGA GGATGATCAG CCACATTTGG ACTGAGACAC GGCCCAAACCT CCTACGGGAG
 241 GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGGG CAACCTGAT CCAGCCATGC TCGCGTGAGT
 301 GATGAAGCCC CTAGGGTTGT AAAGCTCTTT TGTGCGGAA GATAATGACG GTACC GCAAG
 361 AATAAGCCCC GGCTAAATTC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGAAGGGGG CTAGCGTTGC
 421 TCAGAATCAC TGGGCGTAAA GGTGCGTAG GCGGGTCTTT AAGTCAGGGG TGAATCCTG

481 GAGCTCAACT CCAGAACTGC ATTTGATACT GAAGATCTTG AGTTCGGGAG AAGTGAGTGG
 541 AACTGCGAGT GTAGAGGTGA AATTCGTAGA TATTCGCAAG AACACCCAGT GCGAAGGCGG
 601 CTCCTGGCC CGATACTGAC GCTGAGGCAC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA
 661 CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAAT GCCAGCCGTT AGTGGGTTTA CTCAC TAGTG
 721 GCGCAGCTAA CGCTTTAAGC ATTCGCGCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA
 781 GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTGAC GCAACGCGCA
 841 GAACCTTACC AGCCCTTACC ATGTCCAGGA CCGGTCGCAG AGATGTGACC TTCTCTTCGG
 901 AGCCTGGAAC ACAGGTGCTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA
 961 GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CCCGTCCCTA GTTGCTACCA TTTAGTTGAG CACTCTAAGG
 1021 AGACTGCCGG TGATAAGCCG CGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAGTCCCT ATGGCCCTTA
 1081 CGGGCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGC GGTGACAATG GGATGCTAAG GGGCGACCCT
 1141 TCGCAAATCT CAAAAGCCG TCTCAGTTCG GATTGGGCTC TGCAACTCGA GCCCCTAAG
 1201 TTGGAATCGC TAGTAATCGT GGATCAGCAC GCCACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA
 1261 CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTTGGT TTTACCTGAA GACGGTGCGC TAACCCGCAA
 1321 GGGAGGCAGC CGGCCACGGT AGGGTCAGCG ACT

13. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01023

1 TAGCAATACG TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACGCGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA
 61 ACAACACAGG GAAACTTGTG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAG ATTTATCGCC
 121 GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTAGGTA ACGGCCTACC AAGGCGACGA
 181 TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAACTCC
 241 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGGCA ACCCTGATCC AGCCATGCCG
 301 CGTGAGTGAT GAAGGCCCTA GGTTGTAAA GCTCTTTTGT GCGGGGAGAT AATGACGGTA
 361 CCGCAAGAAT AAGCCCCGGC TAACCTTCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA
 421 GCGTTGCTCG GAATCACTGG GCGTAAAGGG TCGTAGGGG GGTCTTTAAG TCAGGGGTGA
 481 AATCCTGGAG CTCAACTCCA GAACTGCCTT TGATACTGAA GATCTTGAGT TCGGGAGAGG
 541 TGAGTGGAAC TGGCAGTGTA GAGGTGAAAT TCGTAGATAT TCGCAAGAAC ACCAGTGGCG
 601 AAGGCGGCTC ACTGGCCCCA TACTGACGCT GAGGCACGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA
 661 TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAATGCC AGCCGTTAGT GGGTTTACTC
 721 ACTAGTGGCG CAGCTAACGC TTTAAGCATT CCGCCTGGGG AGTACGGTCG CAAGATTAAA
 781 ACTCAAAGGA ATTAGCGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGACGCA
 841 ACGCGCAGAA CCTTACCAGC CCTTGACATG TCCAGGACCG GTCGCAGAGA TGTGACCTTC
 901 TCTTCGGAGC CTGGAACACA GGTGCTGCAT GGCTGTGCTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT
 961 GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCG GTCCTTAGTT GCTACCATTG ACTGTAGCAC
 1021 TCTAAGGAGA CTGCCGGTGA TAAGCCGCCA GGAAGGTGGG GATGACGTC AACTCCTCATG
 1081 GCCCTTACGG GCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGCGGT GACAATGGGA TGCTAAGGGG
 1141 CGACCCTTCG CAAATCTCAA AAAGCCGTCT CAGTTCGGAT TGGGCTCTGC AACTCGAGCC
 1201 CATGAAGTTG GAATCGCTAG TAATCGTGA TCAGCAGGCC ACGGTGAATA CGTTCGCGGG
 1261 CCTTGACAC ACCGCCCGTC ACACCATGGG AGTTGGCTTT ACCTGAAGAC GGTGCGCTAA
 1321 CCAGCAATGG AGGCAGCCGG CCACGGTAGG GTCAGCGACT

14. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01035

1 CGTAGCAATA CGTCAGCGGC AGACGGGTGA GTAACGCGTG GGAACATACC TTTTGGTTCG
 61 GAACAACACA GGGAACTTGG TGCTAATACC GGATAAGCCC TTACGGGGAA AGATTTATCG
 121 CCGAAAGATT GGCCCGCGTC TGATTAGCTA GTTGGTGAGG TAATGGCTCA CCAAGGCGAC
 181 GATCAGTAGC TGGTCTGAGA GGATGATCAG CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCAAACT
 241 CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGGG CAACCTGAT CCAGCCATGC
 301 CCGGTGAGTG ATGAAGGCC TAGGGTTGTA AAGCTCTTTT GTGCGGGAAG ATAATGACGG
 361 TACCGCAAGA ATAAGCCCGG GCTAACTTCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGAAGGGGGC
 421 TAGCGTTGCT CGGAATCACT GGGCGTAAAG GGTGCGTAGG CGGGCTTTTA AGTCAGGGGT
 481 GAAATCCTGG AGCTCAACTC CAGAAGTCC TTTGATACTG AAGATCTTGA GTTCGGGAGA
 541 GGTGAGTGGG ACTGCGAGTG TAGAGGTGAA ATTCGTAGAT ATTCGCAAGA ACACCAAGTGG
 601 CGAAGGCGGC TCACTGGCCC GATACTGACG CTGAGGCACG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG
 661 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGAATG CCAGCCGTTA GTGGGTTTAC
 721 TCACTAGTGG CGCAGCTAAC GCTTTAAGCA TTCCGCTGCG GGAGTACGGT CGCAAGATTA
 781 AACTCAAAG GAATGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGACG
 841 CAACGCGCAG AACCTTACCA GCCCTTGACA TGTCCAGGAC CGGTTCGCAGA GATGTGACCT
 901 TCTCTTCGGA GCCTGGAACA CAGGTGCTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
 961 TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC CCGTCCCTAG TTGCTACCAT TTAGTTGAGC
 1021 ACTCTAAGGA GACTGCCGGT GATAAGCCGC GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCCCTCA
 1081 TGGCCCTTAC GGGCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG GTGACAATGG GATGCTAAGG

1141 GGCGACCCTT CGCAAATCTC AAAAAGCCGT CTCAGTTCGG ATTGGGCTCT GCAACTCGAG
 1201 CCCATGAAGT TGAATCGCT AGTAATCGTG GATCAGCACG CCACGGTGAA TACGTTCCCG
 1261 GGCCTTGATC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTTGGTT TTACCTGAAG ACGGTGCGCT
 1321 AACCCGCAAG GGAGGCAGCC GGCACGGTA GGGTCA

15. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01041

1 TAGCAATACG TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA
 61 ACAACACAGG GAAACTTGTG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAAG ATTTATCGCC
 121 GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA ATGGCTCACC AAGGCGACGA
 181 TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAAACTCC
 241 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC AGCCATGCCG
 301 CGTGAGTGAT GAAGCCCTA GGGTTGTAAA GCTCTTTTGT GCGGGAAGAT AATGACGGTA
 361 CCGCAAGAA T AAGCCCGGC TAACTTCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA
 421 GCGTTGCTCG GAATCACTGG GCGTAAAGGG TCGTAGGGC GGTCTTTAAG TCAGGGGTGA
 481 AATCCTGGAG CTCAACTCCA GAAGTGCCTT TGATACTGAG GATCTTGAGT TCGGGAGAGG
 541 TGAGTGGAAC TGCGAGTGTA GAGGTGAAAT TCGTAGATAT TCGCAAGAAC ACCAGTGGCG
 601 AAGGCGGCTC ACTGGCCCGA TACTGACGCT GAGGCACGAA AGCGTGGGGA GCAAAACAGGA
 661 TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAATGCC AGCCGTTAGT GGGTTTACTC
 721 ACTAGTGGCG CAGCTAACGC TTTAAGCATT CCGCCTGGGG AGTACGGTCG CAAGATTAAA
 781 ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCGCCACA ACCGGTGGAA CATGGTGGTT TAATTCAACG
 841 CAACGCGCAA AACCTTACCA GCCCTTGACA GGTCCAGGAC CGGTCCGAGA GATTGGACCT
 901 TCTCTCGAA CCCGGGAGCA CAGGGGCTGC ATGGCTGTCC TCAGCTCCGT GCCGGGAGAA
 961 TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCCCGTCCTT AGTTGTACC ATTTAGTTGA
 1021 GCACTCTAAG GAGACTGCCG GTGATAAGCC GCGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCCT
 1081 CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TCGGTGACAA TGGGATGCTA
 1141 AGGGGCGACC CTTCGCAAAT CTCAAAAAGC TGTCTCAGTT CGGATTGGGA TGTGCAACTC
 1201 GAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ACGCCACGGT GAATACGTTT
 1261 CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC ATGGGAGTTG GTTT

16. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01042

1 GTAGCAATAC GTCAGCGGCA GACGGGTGAG TAACCGGTGG GAACGTACCT TTTGGTTCGG
 61 AACACACAG GGAACCTTGT GCTAATACCG GATAAGCCCT TACGGGAAA GATTTATCGC
 121 CGAAAGATCG GCCCGCTCT GATTAGCTAG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC CAAGGCGACG
 181 ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACAGG GCCCAAACCTC
 241 CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGGAC AACCTTGATT CCCAGCCAT
 301 GCTCGCGTGA ATGATGAAG CCCTTAGGGT GTAAAGCTC TTTGTGCGG GAAGATAATG
 361 ACGGTACCGC AAGAATAAGC CCCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG
 421 GGGCTAGCGT TGCTCGGAAT CACTGGGCGT AAAGGGTGGC TAGGCGGGTC TTTAAGTCAG
 481 GGGTGAAATC CTGGAGCTCA ACTCCAGAAC TGCCTTTGAT ACTGAAGATC TTGAGTTCGG
 541 GAGAAGTGAG TGAAGTGGC AGTGTAGAGG TGAATTCGT AGATAATCGC AAGAACACCA
 601 GTGGCGAAGG CGGCTCACTG GCCGATACT GACGCTGAGG CACGAAAGCG TGGGGAGCAA
 661 ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG AATGCCAGCC GTTAGTGGGT
 721 TTAATCACTA TTGGCGCAGC TAACGCTTTA AGCATTCCGC CTGGGGAGTA CGGTGCAAG
 781 ATTAACACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC
 841 GACGCAACGC GCAGAACCTT ACCAGCCCTT GACATGTCCA GGACCGGTCG CAGAGATGTG
 901 ACCTTCTCTT CGGAGCCTGG AACACAGGTG CTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCTGTA
 961 GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCCCGTCC TTAGTTGCTA CCATTTAGTT
 1021 GAGCACTCTA AGGAGACTGC CGGTGATAAG CCGCGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC
 1081 CTCATGGCCC TTACGGGCTG GGTACACAC GTGCTACAAT GGCGGTGACA ATGGGATGCT
 1141 AAGGGGCGAC CCTTCGCAA TCTCAAAAAG CCGTCTCAGT TCGGATTGGG CTCTGCAACT
 1201 CGAGCCCATG AAGTTGGAAT CGTAGTAAT CFTGGATCAG CAGCCACGGT TGAATACGTT
 1261 CCCGGCCCTT GTACACACCG CCCGTACAC CATGGGAGTT GGTTTTACCT GAAGACGGTG
 1321 CGCTAACCCG CAAGGGAGGC AGCCGGCCAC GGTAGGGTCA GC

17. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01027

1 TATGTCAGCG GCAGACGGGT GAGTAACGCG TGGGAACGTA CCTTTTGGTT CGGAACAACT
 61 GAGGGAAACT TCAGCTAATA CCGGATAAGC CCTTACGGGG AAAGATTTAT CGCCGAAAGA
 121 TCGGCCCGCG TCTGATTAGC TAGTTGGTGA GGTAATGGCT CACCAAGGCG ACGATCAGTA
 181 GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACATTG GGAATGAGAC ACGGCCAAA CTCCTACGGG

241 AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG CGCAAGCCTG ATCCAGCCAT GCCGCGTGAG
 301 TGATGAAGGC CCTAGGGTTG TAAAGCTCTT TTGTGCGGGA AGATAATGAC GGTACCGCAA
 361 GAATAAGCCC CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGAAGGGG GCTAGCGTTG
 421 CTCGGAATCA CTGGGCGTAA AGGGTGCCTA GCGGGGTCTT TAAGTCAGGG GTGAAATCCT
 481 GGAGCTCAAC TCCAGAACTG CCTTTGATAC TGAAGATCTT GAGTTCGGGA GAGGTGAGTG
 541 GAACTGCGAG TGTAGAGGTG AAATTCGTAG ATATTTCGAA GAACACCAGT GGCGAAGGCG
 601 GCTCACTGGC CCGATACTGA CGCTGAGGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT
 661 ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAA TGCCAGCCGT TAGTGGGTTT ACTCACTAGT
 721 GGCGCAGCTA ACGCTTTAAG CATTCGCTT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT TAAAACCTCAA
 781 AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTTCGA CGCAACGCGC
 841 AGAACCTTAC CAGCCCTTGA CATCCCGGTC GCGGATCTCC AGAGACGGAG TTCGAACACC
 901 TCGGTCAAGA CCGAAGACAG GTGACCGCAT GGCACGTCTT AAACCTCAGT TCGAACACAT
 961 GGTGGGTAT AAGTCCCGTC AACGAGCGCC AGACCCCGT CCTTAGTTCA AGCTACCCAT
 1021 TTAGACAGGG AATTCGGCCA AGACCCTCGA CGATAATTTCG GGAGNAAGGG GGGGAAGTAT
 1081 TCAAGTCGTC ATTTGCCCTG CGCCCCGCAC CTTCCCTGAG ATGTTGGCAT CGTCACCGGC
 1141 GCCGCGCAAG CGCCGTTCTT CAGCGGATCC CAAAAACCG TGTCATTAAG GAGGATTTCT
 1201 TCAAACCGTG CCCCCAACCA CATCGGCTAG GTATAGACAC CCCCAAATCA AGGTGATGGA
 1261 ATTCCCGCAC CATCACACAC TGCCCGTAC CTCATGGGAT TTAGCCCCG GAAAAAGGCC
 1321 GCCTTCCCGA AAAGGGCCAA CCG

18. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองไอโซเลต 01011

1 GTAGCAATAC GTCAGCGGCA GACGGGTGAG TAACGCGTGG GAACGTACCT TTTGGTTCGG
 61 AACAAACACAG GGAAACTTGT GCTAATACCG GATAAGCCCT TACGGGAAA GATTTATCGC
 121 CGAAAGATCG GCCCGCTCT GATTAGCTAG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC CAAGGCGACG
 181 ATCAGTAGCT GGCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACCTC
 241 CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGGG AACCCTGATC CAGCCATGCC
 301 GCGTGAGTGA TGAAGCCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTG TCGGGGAAGA TAATGACGGT
 361 ACCGCAAGAA TAAGCCCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGC GCGGTAATAC GAAGGGGGCT
 421 AGCGTTGCTC GGAATCACTG GCGTAAAGG GTGCGTAGGC GGGTCTTTAA GTCAGGGGTG
 481 AAATCCTGGA GCTCAACTCC AGAACTGCCT TTGATACTGA AGATCTTGAG TTCGGGAGAA
 541 GTGAGTGGA CTGCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGCAAGAA CACCAGTGGC
 601 GAAGCGGCT CACTGGCCCG ATACTGACGC TGAGGCACGA AAGCGTGGG AGCAAACAGG
 661 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGAATGC CAGCCGTTAG TGGGTTTACT
 721 CACTAGTGGC GCAGCTAACG CTTAAGCAT TCCGCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA
 781 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGACGC
 841 AACGCGCAGA ACCTTACCAG CCCTTGACAT GTCCAGGACC GGTCCGAGAG ATGTGACCTT
 901 CTCTTCGGAG CCTGGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT
 961 TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCC CGTCCTTAGT TGCTACCATT TAGTTGAGCA
 1021 CTCTAAGGAG ACTGCCGGTG ATAAGCCCG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT
 1081 GGCCCTTACG GGCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCGG TGACAATGGG ATGCTAAGGG
 1141 GCGACCCTTC GCAAATCTCA AAAAGCCGTC TCAGTTCGGA TTGGGCTCTG CAACTCGAGC
 1201 CCATGAAGTT GGAATCGCTA GTAATCGTGG ATCAGCACGC CACGGTGAAT ACGTTCCCGG
 1261 CCCTTGATCA CACGCCCCG CACACCATGG GAGTTGGTTT TACCTGAAGA CGGTGGCCTA
 1321 ACCGCAAGG GAGGACGCG GCCACGGTAG G

ภาคผนวก จ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโปรแกรม SPSS ชุดขวด Leonard jar

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ความสูงต้น	01035	6	32.1667	6.14546	2.50887	25.7174	38.6159	24.00	40.00
	01010	6	27.6667	16.40020	6.69535	10.4557	44.8776	12.50	57.00
	01027	6	30.5833	5.66936	2.31451	24.6337	36.5330	26.50	40.00
	01011	6	24.1333	8.42631	3.44003	15.2905	32.9762	13.30	30.70
	01023	6	42.3333	12.89444	5.26413	28.8014	55.8652	23.00	59.00
	01041	6	29.7500	7.27839	2.97139	22.1118	37.3882	18.00	38.00
	01042	6	26.2833	9.24563	3.77451	16.5806	35.9860	15.50	40.00
	N free	6	26.1500	8.30391	3.39006	17.4356	34.8644	17.00	41.00
	N plus	6	26.2292	4.38065	1.78839	21.6320	30.8264	18.00	30.00
	Total	54	29.4773	10.12985	1.37850	26.7124	32.2422	12.50	59.00
ความยาวราก	01035	6	5.5833	3.21585	1.31286	2.2085	8.9582	3.00	11.00
	01010	6	7.9167	3.20026	1.30650	4.5582	11.2751	4.00	11.00
	01027	6	5.3333	3.20416	1.30809	1.9708	8.6959	3.00	11.00
	01011	6	4.8333	1.96638	.80277	2.7697	6.8969	2.50	8.00
	01023	6	6.8333	2.06559	.84327	4.6656	9.0010	3.00	9.00
	01041	6	5.2500	2.48495	1.01448	2.6422	7.8578	3.00	8.00
	01042	6	7.3667	2.03044	.82892	5.2359	9.4975	4.00	9.50
	N free	6	5.1167	3.52727	1.44000	1.4150	8.8183	1.50	11.00
	N plus	6	2.8958	1.32254	.53992	1.5079	4.2838	1.50	5.00
	Total	54	5.6810	2.83850	.38627	4.9063	6.4558	1.50	11.00
จำนวนปม	01035	6	6.5000	4.72229	1.92787	1.5443	11.4557	3.00	15.00
	01010	6	3.8333	1.72240	.70317	2.0258	5.6409	2.00	6.00
	01027	6	3.3333	2.06559	.84327	1.1656	5.5010	1.00	7.00
	01011	6	1.8333	1.32916	.54263	.4385	3.2282	1.00	4.00
	01023	6	3.6667	2.06559	.84327	1.4990	5.8344	1.00	6.00
	01041	6	3.1667	2.04124	.83333	1.0245	5.3088	1.00	7.00
	01042	6	1.6667	1.21106	.49441	.3957	2.9376	1.00	4.00
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N plus	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	54	2.6667	2.77455	.37757	1.9094	3.4240	.00	15.00

เส้นผ่าน ศูนย์กลางปม	01035	6	1.9550	.29541	.12060	1.6450	2.2650	1.67	2.43
	01010	6	1.7900	.78223	.31934	.9691	2.6109	1.33	3.22
	01027	6	1.1483	.30003	.12249	.8335	1.4632	1.00	1.75
	01011	6	1.1667	.40825	.16667	.7382	1.5951	1.00	2.00
	01023	6	1.8333	.68313	.27889	1.1164	2.5502	1.00	2.50
	01041	6	1.8817	.80236	.32756	1.0396	2.7237	1.00	3.00
	01042	6	2.3750	.80234	.32755	1.5330	3.2170	2.00	4.00
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N plus	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	54	1.3500	.95784	.13035	1.0886	1.6114	.00	4.00
น้ำหนักสดต้น	01035	6	1.0146	.66432	.27121	.3174	1.7117	.20	1.80
	01010	6	.6691	.73932	.30183	-.1068	1.4450	.17	1.76
	01027	6	.7710	.71336	.29123	.0224	1.5196	.15	1.73
	01011	6	.1514	.08265	.03374	.0647	.2381	.07	.29
	01023	6	1.9390	1.42848	.58318	.4399	3.4381	.22	3.74
	01041	6	1.1460	1.14272	.46651	-.0532	2.3452	.11	2.72
	01042	6	.1676	.05220	.02131	.1128	.2224	.09	.23
	N free	6	.3820	.72379	.29549	-.3776	1.1416	.04	1.86
	N plus	6	.2329	.18013	.07354	.0439	.4220	.12	.58
	Total	54	.7193	.90576	.12326	.4721	.9665	.04	3.74
น้ำหนักสดราก	01035	6	.5478	.34014	.13886	.1909	.9048	.16	.98
	01010	6	.9370	.67632	.27611	.2272	1.6467	.09	1.61
	01027	6	.5898	.40502	.16535	.1648	1.0149	.11	1.02
	01011	6	.5464	.23715	.09681	.2975	.7952	.26	.84
	01023	6	.6062	.83255	.33989	-.2675	1.4799	.12	2.29
	01041	6	.5513	.33222	.13563	.2027	.8999	.15	.97
	01042	6	.8316	.35988	.14692	.4539	1.2092	.18	1.17
	N free	6	.5749	.30153	.12310	.2585	.8914	.19	.88
	N plus	6	.9358	.68858	.28111	.2132	1.6584	.05	1.96
	Total	54	.6801	.49226	.06699	.5457	.8144	.05	2.29
น้ำหนักแห้งต้น	01035	6	.2132	.11984	.04893	.0874	.3390	.05	.37
	01010	6	.1435	.09313	.03802	.0458	.2413	.06	.28
	01027	6	.1773	.11777	.04808	.0537	.3009	.06	.34
	01011	6	.0228	.01619	.00661	.0058	.0398	.01	.05
	01023	6	.3431	.20643	.08428	.1264	.5597	.04	.59
	01041	6	.2218	.14184	.05790	.0729	.3706	.09	.42
	01042	6	.0726	.08193	.03345	-.0134	.1585	.01	.20
	N free	6	.0813	.10265	.04191	-.0264	.1890	.02	.29
	N plus	6	.0608	.01289	.00526	.0473	.0744	.04	.08
	Total	54	.1485	.14267	.01941	.1095	.1874	.01	.59

น้ำหนักแห้งราก	01035	6	.1089	.05859	.02392	.0474	.1703	.05	.19
	01010	6	.1051	.04854	.01982	.0541	.1560	.05	.16
	01027	6	.0910	.06031	.02462	.0277	.1543	.03	.20
	01011	6	.1224	.03936	.01607	.0811	.1637	.07	.16
	01023	6	.1199	.14278	.05829	-.0300	.2697	.04	.40
	01041	6	.0925	.03812	.01556	.0525	.1325	.04	.15
	01042	6	.1209	.06192	.02528	.0560	.1859	.06	.24
	N free	6	.0876	.04847	.01979	.0367	.1384	.03	.16
	N plus	6	.0935	.06778	.02767	.0223	.1646	.01	.16
	Total	54	.1046	.06551	.00891	.0867	.1225	.01	.40
น้ำหนักแห้งรวม	01035	6	.3087	.11179	.04564	.1914	.4260	.17	.50
	01010	6	.2486	.06566	.02681	.1797	.3175	.17	.33
	01027	6	.2684	.09194	.03753	.1719	.3648	.16	.37
	01011	6	.1452	.05287	.02158	.0897	.2006	.08	.20
	01023	6	.4629	.17512	.07149	.2792	.6467	.32	.72
	01041	6	.3142	.15750	.06430	.1489	.4795	.16	.57
	01042	6	.1935	.10820	.04417	.0799	.3070	.10	.38
	N free	6	.1689	.08876	.03624	.0757	.2621	.07	.32
	N plus	6	.1543	.06778	.02767	.0832	.2254	.06	.22
	Total	54	.2516	.13991	.01904	.2134	.2898	.06	.72

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูงต้น	Between Groups	1424.802	8	178.100	1.997	.069
	Within Groups	4013.731	45	89.194		
	Total	5438.533	53			
ความยาวราก	Between Groups	109.667	8	13.708	1.944	.076
	Within Groups	317.359	45	7.052		
	Total	427.026	53			
จำนวนปม	Between Groups	202.000	8	25.250	5.516	.000
	Within Groups	206.000	45	4.578		
	Total	408.000	53			
เส้นผ่านศูนย์กลางปม	Between Groups	35.075	8	4.384	14.560	.000
	Within Groups	13.550	45	.301		
	Total	48.625	53			
น้ำหนักสดต้น	Between Groups	16.436	8	2.054	3.418	.004
	Within Groups	27.045	45	.601		
	Total	43.481	53			
น้ำหนักสดราก	Between Groups	1.386	8	.173	.680	.706
	Within Groups	11.457	45	.255		

	Total	12.843	53			
น้ำหนักแห้งต้น	Between Groups	.492	8	.062	4.720	.000
	Within Groups	.587	45	.013		
	Total	1.079	53			
น้ำหนักแห้งราก	Between Groups	.009	8	.001	.245	.980
	Within Groups	.218	45	.005		
	Total	.227	53			
น้ำหนักแห้งรวม	Between Groups	.499	8	.062	5.211	.000
	Within Groups	.539	45	.012		
	Total	1.037	53			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความสูงต้น			
Duncan ^a			
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
01011	6	24.1333	
N free	6	26.1500	
N plus	6	26.2292	
01042	6	26.2833	
01010	6	27.6667	
01041	6	29.7500	
01027	6	30.5833	
01035	6	32.1667	32.1667
01023	6		42.3333
Sig.		.216	.069
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.			

ความยาวราก			
Duncan ^a			
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
N plus	6	2.8958	
01011	6	4.8333	4.8333
N free	6	5.1167	5.1167
01041	6	5.2500	5.2500
01027	6	5.3333	5.3333
01035	6	5.5833	5.5833
01023	6		6.8333
01042	6		7.3667
01010	6		7.9167
Sig.		.131	.091
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.			

จำนวนปม				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N free	6	.0000		
N plus	6	.0000		
01042	6	1.6667	1.6667	
01011	6	1.8333	1.8333	
01041	6		3.1667	
01027	6		3.3333	
01023	6		3.6667	
01010	6		3.8333	
01035	6			6.5000
Sig.		.183	.131	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

เส้นผ่านศูนย์กลางปม				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N free	6	.0000		
N plus	6	.0000		
01027	6		1.1483	
01011	6		1.1667	
01010	6		1.7900	1.7900
01023	6		1.8333	1.8333
01041	6			1.8817
01035	6			1.9550
01042	6			2.3750
Sig.		1.000	.053	.106
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

น้ำหนักสดต้น			
Duncan ^a			
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
01011	6	.1514	
01042	6	.1676	
N plus	6	.2329	
N free	6	.3820	
01010	6	.6691	
01027	6	.7710	
01035	6	1.0146	1.0146
01041	6	1.1460	1.1460
01023	6		1.9390
Sig.		.061	.056
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.			

น้ำหนักสดราก		
Duncan ^a		
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05
		1
01011	6	.5464
01035	6	.5478
01041	6	.5513
N free	6	.5749
01027	6	.5898
01023	6	.6062
01042	6	.8316
N plus	6	.9358
01010	6	.9370
Sig.		.263
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.		
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.		

น้ำหนักแห้งต้น					
Duncan ^a					
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
01011	6	.0228			
N plus	6	.0608	.0608		
01042	6	.0726	.0726	.0726	
N free	6	.0813	.0813	.0813	
01010	6	.1435	.1435	.1435	
01027	6		.1773	.1773	
01035	6			.2132	.2132
01041	6			.2218	.2218
01023	6				.3431
Sig.		.109	.122	.051	.068
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.					

น้ำหนักแห้งราก		
Duncan ^a		
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05
		1
N free	6	.0876
01027	6	.0910
01041	6	.0925
N plus	6	.0935
01010	6	.1051
01035	6	.1089
01023	6	.1199
01042	6	.1209
01011	6	.1224
Sig.		.469
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.		
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.		

น้ำหนักแห้งรวม					
Duncan ^a					
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
01011	6	.1452			
N plus	6	.1543			
N free	6	.1689	.1689		
01042	6	.1935	.1935	.1935	
01010	6	.2486	.2486	.2486	
01027	6	.2684	.2684	.2684	
01035	6		.3087	.3087	
01041	6			.3142	
01023	6				.4629
Sig.		.093	.052	.094	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.					

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโปรแกรม SPSS ชุดหลอดทดลอง

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ความสูงต้น	01035	6	25.3333	2.01660	.82327	23.2170	27.4496	23.00	27.50
	01010	6	26.3333	4.92612	2.01108	21.1637	31.5030	20.00	30.00
	01027	6	32.3333	2.69568	1.10050	29.5044	35.1623	29.50	35.50
	01011	6	23.3333	4.29729	1.75436	18.8236	27.8431	19.00	28.50
	01023	6	34.7500	9.93856	4.05740	24.3201	45.1799	23.00	47.00
	01041	6	34.6667	2.25093	.91894	32.3045	37.0289	32.00	37.00
	01042	6	33.9000	5.28621	2.15809	28.3525	39.4475	28.20	40.00
	N free	6	23.7194	6.58070	2.68656	16.8134	30.6255	13.00	31.00
	N plus	6	24.3333	5.57375	2.27547	18.4840	30.1826	18.50	31.00
	Total	54	28.7448	6.88634	.93711	26.8651	30.6244	13.00	47.00
ความยาวราก	01035	6	11.8333	4.15532	1.69640	7.4726	16.1941	8.00	17.00
	01010	6	20.6667	7.44759	3.04047	12.8509	28.4824	14.00	30.00
	01027	6	17.6667	3.61478	1.47573	13.8732	21.4602	14.00	22.00
	01011	6	13.6667	1.86190	.76012	11.7127	15.6206	12.00	16.00
	01023	6	12.6667	4.88535	1.99444	7.5398	17.7935	3.00	16.00
	01041	6	16.3333	4.22690	1.72562	11.8975	20.7692	11.00	20.00
	01042	6	12.3333	1.36626	.55777	10.8995	13.7671	11.00	14.00
	N free	6	15.8611	2.84881	1.16302	12.8715	18.8508	12.00	19.00
	N plus	6	15.5000	2.23607	.91287	13.1534	17.8466	11.50	18.00
	Total	54	15.1698	4.61023	.62737	13.9114	16.4281	3.00	30.00
จำนวนปม	01035	6	6.0000	1.54919	.63246	4.3742	7.6258	4.00	7.00
	01010	6	3.6667	1.36626	.55777	2.2329	5.1005	2.00	5.00
	01027	6	4.6667	1.03280	.42164	3.5828	5.7505	4.00	6.00
	01011	6	5.0000	1.78885	.73030	3.1227	6.8773	3.00	7.00
	01023	6	6.1667	2.78687	1.13774	3.2420	9.0913	3.00	9.00
	01041	6	6.3333	1.36626	.55777	4.8995	7.7671	5.00	8.00
	01042	6	5.3333	.51640	.21082	4.7914	5.8753	5.00	6.00
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N plus	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	54	4.1296	2.70601	.36824	3.3910	4.8682	.00	9.00

เส้นผ่าน ศูนย์กลางปม	01035	6	1.8433	.45959	.18763	1.3610	2.3256	1.25	2.14
	01010	6	2.1667	.25820	.10541	1.8957	2.4376	2.00	2.50
	01027	6	2.1400	.38084	.15548	1.7403	2.5397	1.67	2.50
	01011	6	1.4300	.46017	.18787	.9471	1.9129	1.00	2.00
	01023	6	1.7350	.57688	.23551	1.1296	2.3404	1.00	2.25
	01041	6	1.7267	.49286	.20121	1.2094	2.2439	1.25	2.33
	01042	6	1.9733	.26021	.10623	1.7003	2.2464	1.67	2.25
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N plus	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	54	1.4461	.88038	.11980	1.2058	1.6864	.00	2.50
น้ำหนักสดต้น	01035	6	.9268	.21394	.08734	.7023	1.1513	.68	1.15
	01010	6	.9219	.10718	.04376	.8095	1.0344	.79	1.01
	01027	6	1.1875	.19295	.07877	.9850	1.3900	.99	1.42
	01011	6	.8677	.17617	.07192	.6828	1.0526	.67	1.07
	01023	6	1.2249	.07253	.02961	1.1488	1.3010	1.09	1.29
	01041	6	1.1184	.12704	.05186	.9851	1.2517	.97	1.26
	01042	6	1.0489	.06326	.02583	.9825	1.1153	1.01	1.13
	N free	6	.8616	.10490	.04283	.7515	.9717	.67	.97
	N plus	6	.9585	.14807	.06045	.8031	1.1139	.79	1.13
	Total	54	1.0129	.18542	.02523	.9623	1.0635	.67	1.42
น้ำหนักสดราก	01035	6	.2678	.08495	.03468	.1787	.3570	.19	.37
	01010	6	.6293	.23290	.09508	.3849	.8737	.33	.82
	01027	6	.6171	.06819	.02784	.5455	.6886	.53	.67
	01011	6	.6408	.19855	.08106	.4325	.8492	.49	.90
	01023	6	.6188	.26819	.10949	.3373	.9002	.12	.85
	01041	6	.7643	.24624	.10053	.5059	1.0227	.55	1.08
	01042	6	.4856	.08294	.03386	.3986	.5727	.38	.57
	N free	6	.4367	.08312	.03393	.3495	.5239	.35	.54
	N plus	6	.4887	.24088	.09834	.2359	.7415	.06	.77
	Total	54	.5499	.22020	.02996	.4898	.6100	.06	1.08
น้ำหนักแห้งต้น	01035	6	.1208	.00459	.00187	.1160	.1257	.12	.13
	01010	6	.1005	.00510	.00208	.0951	.1058	.09	.11
	01027	6	.1542	.03466	.01415	.1179	.1906	.11	.19
	01011	6	.1067	.03349	.01367	.0716	.1419	.07	.14
	01023	6	.1766	.05690	.02323	.1169	.2363	.13	.28
	01041	6	.1488	.01669	.00681	.1313	.1663	.13	.17
	01042	6	.1320	.01977	.00807	.1113	.1528	.11	.15
	N free	6	.1062	.03865	.01578	.0657	.1468	.04	.16
	N plus	6	.1280	.03630	.01482	.0899	.1661	.08	.16
	Total	54	.1304	.03800	.00517	.1201	.1408	.04	.28

น้ำหนักแห้ง ราก	01035	6	.0328	.00318	.00130	.0295	.0362	.03	.04
	01010	6	.0361	.00253	.00103	.0334	.0387	.03	.04
	01027	6	.0412	.00999	.00408	.0307	.0517	.03	.05
	01011	6	.0494	.01619	.00661	.0324	.0664	.03	.07
	01023	6	.0564	.00999	.00408	.0459	.0669	.04	.06
	01041	6	.0596	.02095	.00855	.0376	.0816	.04	.09
	01042	6	.0436	.00376	.00153	.0397	.0475	.04	.05
	N free	6	.0464	.01116	.00456	.0346	.0581	.03	.06
	N plus	6	.0484	.01554	.00634	.0321	.0647	.02	.07
	Total	54	.0460	.01385	.00188	.0422	.0498	.02	.09
น้ำหนักแห้ง รวม	01035	6	.1537	.00429	.00175	.1492	.1582	.15	.16
	01010	6	.1365	.00468	.00191	.1316	.1414	.13	.14
	01027	6	.1954	.03420	.01396	.1595	.2313	.15	.22
	01011	6	.1561	.04450	.01817	.1094	.2028	.10	.19
	01023	6	.2330	.04948	.02020	.1811	.2850	.19	.32
	01041	6	.2084	.03368	.01375	.1731	.2438	.18	.25
	01042	6	.1756	.02209	.00902	.1525	.1988	.15	.20
	N free	6	.1526	.04539	.01853	.1050	.2002	.08	.21
	N plus	6	.1764	.04818	.01967	.1258	.2269	.12	.23
	Total	54	.1764	.04436	.00604	.1643	.1885	.08	.32



ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูงต้น	Between Groups	1212.222	8	151.528	5.241	.000
	Within Groups	1301.123	45	28.914		
	Total	2513.345	53			
ความยาวราก	Between Groups	396.560	8	49.570	3.056	.008
	Within Groups	729.912	45	16.220		
	Total	1126.472	53			
จำนวนปม	Between Groups	295.926	8	36.991	18.061	.000
	Within Groups	92.167	45	2.048		
	Total	388.093	53			
เส้นผ่านศูนย์กลางปม	Between Groups	34.688	8	4.336	30.533	.000
	Within Groups	6.390	45	.142		
	Total	41.078	53			
น้ำหนักสดต้น	Between Groups	.903	8	.113	5.525	.000
	Within Groups	.919	45	.020		

	Total	1.822	53			
น้ำหนักสดราก	Between Groups	1.020	8	.128	3.704	.002
	Within Groups	1.550	45	.034		
	Total	2.570	53			
น้ำหนักแห้งต้น	Between Groups	.031	8	.004	3.849	.002
	Within Groups	.045	45	.001		
	Total	.077	53			
น้ำหนักแห้งราก	Between Groups	.004	8	.000	3.189	.006
	Within Groups	.006	45	.000		
	Total	.010	53			
น้ำหนักแห้งรวม	Between Groups	.046	8	.006	4.453	.000
	Within Groups	.058	45	.001		
	Total	.104	53			



Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความสูงต้น				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
01011	6	23.3333		
N free	6	23.7194		
N plus	6	24.3333		
01035	6	25.3333		
01010	6	26.3333	26.3333	
01027	6		32.3333	32.3333
01042	6			33.9000
01041	6			34.6667
01023	6			34.7500
Sig.		.398	.060	.485
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000				

ความยาวราก				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
01035	6	11.8333		
01042	6	12.3333	12.3333	
01023	6	12.6667	12.6667	
01011	6	13.6667	13.6667	
N plus	6	15.5000	15.5000	15.5000
N free	6	15.8611	15.8611	15.8611
01041	6	16.3333	16.3333	16.3333
01027	6		17.6667	17.6667
01010	6			20.6667
Sig.		.100	.051	.051
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

จำนวนปม				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N free	6	.0000		
N plus	6	.0000		
01010	6		3.6667	
01027	6		4.6667	4.6667
01011	6		5.0000	5.0000
01042	6		5.3333	5.3333
01035	6			6.0000
01023	6			6.1667
01041	6			6.3333
Sig.		1.000	.071	.082
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

เส้นผ่านศูนย์กลางปม				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N free	6	.0000		
N plus	6	.0000		
01011	6		1.4300	
01041	6		1.7267	1.7267
01023	6		1.7350	1.7350
01035	6		1.8433	1.8433
01042	6			1.9733
01027	6			2.1400
01010	6			2.1667
Sig.		1.000	.088	.081
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

น้ำหนักสดต้น				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N free	6	.8616		
01011	6	.8677		
01010	6	.9219		
01035	6	.9268		
N plus	6	.9585	.9585	
01042	6	1.0489	1.0489	1.0489
01041	6		1.1184	1.1184
01027	6			1.1875
01023	6			1.2249
Sig.		.050	.073	.056
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

น้ำหนักสตราก				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
01035	6	.2678		
N free	6	.4367	.4367	
01042	6	.4856	.4856	
N plus	6	.4887	.4887	
01027	6		.6171	.6171
01023	6		.6188	.6188
01010	6		.6293	.6293
01011	6		.6408	.6408
01041	6			.7643
Sig.		.065	.105	.229
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

น้ำหนักแห้งต้น				
Duncan ^a				
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
01010	6	.1005		
N free	6	.1062		
01011	6	.1067		
01035	6	.1208	.1208	
N plus	6	.1280	.1280	
01042	6	.1320	.1320	
01041	6		.1488	.1488
01027	6		.1542	.1542
01023	6			.1766
Sig.		.139	.111	.159
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.				

น้ำหนักแห้งราก					
Duncan ^a					
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
01035	6	.0328			
01010	6	.0361	.0361		
01027	6	.0412	.0412	.0412	
01042	6	.0436	.0436	.0436	
N free	6	.0464	.0464	.0464	.0464
N plus	6	.0484	.0484	.0484	.0484
01011	6		.0494	.0494	.0494
01023	6			.0564	.0564
01041	6				.0596
Sig.		.053	.098	.058	.093
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.					

น้ำหนักแห้งรวม					
Duncan ^a					
ไอโซเลต	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
01010	6	.1365			
N free	6	.1526	.1526		
01035	6	.1537	.1537		
01011	6	.1561	.1561		
01042	6	.1756	.1756	.1756	
N plus	6	.1764	.1764	.1764	
01027	6		.1954	.1954	.1954
01041	6			.2084	.2084
01023	6				.2330
Sig.		.099	.075	.157	.093
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.					

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโปรแกรม SPSS ชุดทดลองทดลองหัวเชื้อร่วม

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ความสูงต้น	N13/2	6	20.7500	4.98748	2.03613	15.5160	25.9840	15.00	27.50
	01023	6	35.0000	7.06399	2.88386	27.5868	42.4132	27.00	47.00
	Plus N	6	24.3333	5.57375	2.27547	18.4840	30.1826	18.50	31.00
	N free	6	23.7194	6.58070	2.68656	16.8134	30.6255	13.00	31.00
	01023+N13/2	6	36.6667	4.72934	1.93075	31.7035	41.6298	29.50	42.50
	Total	30	28.0939	8.52573	1.55658	24.9103	31.2774	13.00	47.00
ความยาวราก	N13/2	6	15.7222	4.80586	1.96198	10.6788	20.7657	9.00	23.00
	01023	6	14.1667	1.47196	.60093	12.6219	15.7114	13.00	16.00
	Plus N	6	15.5000	2.23607	.91287	13.1534	17.8466	11.50	18.00
	N free	6	15.8611	2.84881	1.16302	12.8715	18.8508	12.00	19.00
	01023+N13/2	6	20.5833	6.35938	2.59620	13.9096	27.2571	14.00	32.00
	Total	30	16.3667	4.30859	.78664	14.7578	17.9755	9.00	32.00
จำนวนปม	N13/2	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	01023	6	7.0000	2.36643	.96609	4.5166	9.4834	4.00	9.00
	Plus N	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	01023+N13/2	6	6.3333	2.65832	1.08525	3.5436	9.1231	4.00	11.00
	Total	30	2.6667	3.64203	.66494	1.3067	4.0266	.00	11.00
เส้นผ่านศูนย์กลางปม	N13/2	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	01023	6	1.9439	.47423	.19360	1.4462	2.4416	1.33	2.25
	Plus N	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	N free	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	01023+N13/2	6	1.4313	.41486	.16937	.9959	1.8666	.94	2.00
	Total	30	.6750	.89593	.16357	.3405	1.0096	.00	2.25
น้ำหนักสดต้น	N13/2	6	.8150	.16303	.06656	.6439	.9861	.56	1.00
	01023	6	1.2335	.13832	.05647	1.0883	1.3787	1.02	1.42
	Plus N	6	.9585	.14807	.06045	.8031	1.1139	.79	1.13
	N free	6	.8616	.10490	.04283	.7515	.9717	.67	.97
	01023+N13/2	6	.9841	.19112	.07802	.7835	1.1846	.82	1.30
	Total	30	.9705	.20418	.03728	.8943	1.0468	.56	1.42
น้ำหนักสดราก	N13/2	6	.3636	.06612	.02700	.2942	.4330	.28	.45
	01023	6	.6560	.11043	.04508	.5401	.7719	.53	.85

	Plus N	6	.4887	.24088	.09834	.2359	.7415	.06	.77
	N free	6	.4367	.08312	.03393	.3495	.5239	.35	.54
	01023+N13/2	6	.5358	.10322	.04214	.4275	.6442	.44	.68
	Total	30	.4962	.16087	.02937	.4361	.5562	.06	.85
น้ำหนักแห้งต้น	N13/2	6	.1022	.01470	.00600	.0868	.1177	.09	.12
	01023	6	.1624	.02232	.00911	.1390	.1858	.13	.19
	Plus N	6	.1280	.03630	.01482	.0899	.1661	.08	.16
	N free	6	.1062	.03865	.01578	.0657	.1468	.04	.16
	01023+N13/2	6	.1427	.03863	.01577	.1022	.1833	.12	.22
	Total	30	.1283	.03729	.00681	.1144	.1422	.04	.22
น้ำหนักแห้งราก	N13/2	6	.0442	.01223	.00499	.0314	.0570	.03	.06
	01023	6	.0601	.00600	.00245	.0538	.0664	.05	.07
	Plus N	6	.0484	.01554	.00634	.0321	.0647	.02	.07
	N free	6	.0464	.01116	.00456	.0346	.0581	.03	.06
	01023+N13/2	6	.0515	.00812	.00332	.0430	.0601	.04	.06
	Total	30	.0501	.01175	.00215	.0457	.0545	.02	.07
น้ำหนักแห้งรวม	N13/2	6	.1481	.02424	.00990	.1227	.1735	.13	.19
	01023	6	.2225	.02487	.01015	.1964	.2486	.19	.25
	Plus N	6	.1764	.04818	.01967	.1258	.2269	.12	.23
	N free	6	.1526	.04539	.01853	.1050	.2002	.08	.21
	01023+N13/2	6	.1943	.03521	.01438	.1573	.2312	.16	.26
	Total	30	.1788	.04427	.00808	.1622	.1953	.08	.26

จฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูงต้น	Between Groups	1250.383	4	312.596	9.113	.000
	Within Groups	857.570	25	34.303		
	Total	2107.952	29			
ความยาวราก	Between Groups	144.254	4	36.063	2.288	.088
	Within Groups	394.102	25	15.764		
	Total	538.356	29			
จำนวนปม	Between Groups	321.333	4	80.333	31.711	.000
	Within Groups	63.333	25	2.533		
	Total	384.667	29			
เส้นผ่านศูนย์กลางปม	Between Groups	21.293	4	5.323	67.044	.000
	Within Groups	1.985	25	.079		
	Total	23.278	29			
น้ำหนักสดต้น	Between Groups	.633	4	.158	6.872	.001

	Within Groups	.576	25	.023		
	Total	1.209	29			
น้ำหนักสดราก	Between Groups	.290	4	.072	3.930	.013
	Within Groups	.461	25	.018		
	Total	.750	29			
น้ำหนักแห้งต้น	Between Groups	.015	4	.004	3.794	.015
	Within Groups	.025	25	.001		
	Total	.040	29			
น้ำหนักแห้งราก	Between Groups	.001	4	.000	1.861	.149
	Within Groups	.003	25	.000		
	Total	.004	29			
น้ำหนักแห้งรวม	Between Groups	.023	4	.006	4.155	.010
	Within Groups	.034	25	.001		
	Total	.057	29			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

ความยาวราก			
Duncan ^a			
ไอโซเลท	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
01023	6	14.1667	
Plus N	6	15.5000	15.5000
N13/2	6	15.7222	15.7222
N free	6	15.8611	15.8611
01023+N13/2	6		20.5833
Sig.		.507	.051
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.			

จำนวนปม			
Duncan ^a			
ไอซ์เลท	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
N13/2	6	.0000	
Plus N	6	.0000	
N free	6	.0000	
01023+N13/2	6		6.3333
01023	6		7.0000
Sig.		1.000	.475

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิธร พงษ์สำราญกุล เกิดเมื่อวันที่ 31 มกราคม 2534 ณ จังหวัด กาญจนบุรี ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 62 หมู่ 2 ต.ท่าล้อ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี 71000

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2015) จัดขึ้นที่ โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ในชื่อเรื่อง Biocontrol activity by soil bacteria and plant growth promoting ability by PGPR for fungal disease management in soybean