แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasilieansis*)

Antagonistic Bacteria for Controlling White Root Rot Disease of Rubber (*Hevea brasilieansis*)

ศุภรัตน์ สังข์ทอง
Suparat Sungtong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Soil Resource Management
Prince of Songkla University
2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasilieansis*)

Antagonistic Bacteria for Controlling White Root Rot Disease of Rubber (*Hevea brasilieansis*)

ศุภรัตน์ สังข์ทอง
Suparat Sungtong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Soil Resource Management
Prince of Songkla University
2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasilieansis*)
ผู้เขียน นางสาวศุภรัตน์ สังข์ทอง
สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญตา ขาวมี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุขุมาภรณ์ แสงงาม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ .....
(นางสาวศุภรัตน์ สังข์ทอง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวศุภรัตน์ สังข์ทอง)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasilieansis*)
ผู้เขียน นางสาวศุภรัตน์ สังข์ทอง
สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน
ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรครากขาวและเป็นปัญหาสำคัญของประเทศผู้ผลิตยางทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย เพื่อลดการใช้สารกำจัดราในดิน จึงจำเป็นต้องใช้การป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธี ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา ซึ่งจากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 44 ไอโซเลท มีแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้มากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 โดยที่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สูงกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่นๆ สามารถสร้างสารปฏิปักษ์ที่ทนและไม่ทนความร้อน และสารระเหยออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ได้สูงที่สุด (96.67, 63.33 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) มีผลทำให้เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบิดเบี้ยวและกุดตัวลง เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ในขณะที่การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เส้นใยเชื้อราถูกแทงทะลุอย่างชัดเจน ทำให้เส้นใยฝ่อ และเกิดรอยย่นบนพื้นผิว รวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีเมื่อทดสอบบนชิ้นส่วนพืชและในดินผสม โดยเชื้อราสามารถเจริญได้ 28.57 เปอร์เซ็นต์ของท่อนยาง และ 19.00 เปอร์เซ็นต์ของความสูงดิน ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมเชื้อราสามารถเจริญเต็มท่อนยาง และในดินผสมได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว ทำให้ต้นยางแสดงอาการเกิดโรคที่ใบล่าง ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขอบใบไหม้ ทำให้รากมีสีดำ ฝ่อ และเปื่อยยุ่ย โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในส่วนราก 93.78 เปอร์เซ็นต์ และส่วนเหนือดิน 77.78 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การราด *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถลดการเกิดโรครากขาวในส่วนเหนือดินและรากได้ 72.22 และ 65.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ต้นยางเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับต้นที่ไม่ใส่เชื้อรารากขาว โดยส่วนเหนือดินยังคงปกติ ใบส่วนใหญ่มีสีเขียว รากส่วนใหญ่ยังคงปกติ และมีปริมาณรากเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การสะสมธาตุ

อาหารในดินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น รวมทั้งความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีแนวโน้มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งเห็นได้ว่า *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือนทดลอง จึงควรมีการศึกษาพัฒนาต่อเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราและลดการใช้สารเคมี

Thesis Title	**Antagonistic Bacteria for Controlling White Root Rot Disease of Rubber (*Hevea brasilieansis*)**
Author	**Ms. Suparat Sungtong**
Major Program	**Soil Resources Management**
Academic Year	**2020**

ABSTRACT

Soil born fungus, *Rigidoporus microporus* cause of white root rot disease is one of the important problems in rubber producing countries including Thailand. To decrease of fungicide use, therefore, it needs to prevent the disease by biological control. *Bacillus* species show broad-spectrum antimicrobial activity and have been widely used as agricultural biocontrol agents. This study aims to screen *Bacillus* spp. which were effective in inhibiting *R. microporus*. Selection of 44 isolates of antagonist bacteria, 3 isolates were able to inhibit *R. microporus* more than 51 percent viz *B. subtilis* isolate SM1, isolate LPDD3-2 and *B. amyloliquefaciens* isolate PT7. *B. subtilis* isolates SM1 are more effective against in inhibiting *R. microporus* than the antagonist bacteria. *B. subtilis* isolates SM1 can produce sterile and non-sterile of supernatant and volatile, antagonisitic substance and volatile compound of Isolate SM1 inhibited mycelial growth of *R. microporus* with the rate of 96.67, 63.33 and 50.00 percent respectively and soil amended and rubber limb inhibited mycelial growth of *R. microporus* with the rate of 28.57 percent of soil amended and 19.00 percent of rubber limb compared with untreated controls 100 percent of soil amended and rubber limb. Mycelial deforminity of *R. microporus* was observed by microscopy and SEM confirmed the pored and wrinkle mycelia.

R. microporus causes the rubber tree to show signs of disease on the lower leaves, yellow leaves, the edges of the burn and convert to black color then decomposed with percentage disease of root 93.78 percent and aerial stem 77.78 percent. While using *B. subtilis* isolate SM1 can decrese the incidence of white root disease aerial stem and root 72.22 and 65.22, respectively. The rubber tree grows close to the one without white root fungus. The aerial stem remains normal green leaves, normal root and increased root volume. Soil nutrients tend to increase, phosphorus

and potassium concentrations tend to be higher as well. *B. subtilis* isolate SM1 was effective in controlling white root disease in laboratory and green house. Therefore, it should be in formulation for controlling white root disease of rubber tree and reduce the use of chemicals.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดในด้านต่าง ๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบ แก้ไข และชี้แนะแนวทาง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญตา ขาวมี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุขุมาภรณ์ แสงงาม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และ ดร.ภวิกา บุณยพิพัฒน์ ที่คอยให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่อง ในการเขียนวิทยานิพนธ์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ ผลของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และวิชาการด้านต่างๆ ให้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ที่สนับสนุนให้มีโอกาสทางการศึกษา อีกทั้งเป็นแรงผลักดันที่สำคัญทำให้มีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศุภรัตน์ สังข์ทอง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
รายการตารางผนวก	(16)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	14
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	16
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	16
วิธีการทดลอง	18
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	27
3. ผลการทดลอง	28
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	54
5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	62
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	74
ประวัติผู้เขียน	80

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ศักยภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*	28
2	ชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่วิเคราะห์โดยวิธี 16S rDNA	32
3	ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus*	47
4	ความสูงของต้นยางพาราและเส้นรอบวงลำต้นหลังสิ้นสุดการทดลอง	49
5	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง	50
6	สมบัติบางประการของดินก่อนการทดลอง	51
7	ปริมาณธาตุอาหารในดินที่ปลูกยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง	52
8	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง	53

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 1	22
2	การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 2	22
3	การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 3	23
4	ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อราได้ (A) 0-25 เปอร์เซ็นต์, (B) 26-50 เปอร์เซ็นต์, (C) 51-75 เปอร์เซ็นต์ และ (D) ชุดควบคุม ที่เวลา 7 วัน	29
5	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ไอโซเลท SM1, (B) LPDD3-2 และ (C) PT7 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA	29
6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน ด้วยวิธี dual culture plate	30
7	ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน ด้วยวิธี dual culture plate	31
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ไอโซเลท SM1, (B) ไอโซเลท LPDD3-2, (C) ไอโซเลท PT7 และ (D) ชุดควบคุม ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี dual culture plate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	31
9	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Basillus* spp.	32
10	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	34
11	ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	35

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	35
13	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ (A) เซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000 เท่า	36
14	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion	37
15	ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ด้วยวิธี agar well diffusion	37
16	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่งและ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	38
17	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารระเหยจากเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*	39
18	ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7	39

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	40
20	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่ทดสอบบนชิ้นส่วนพืช	41
21	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 บนชิ้นส่วนพืช	41
22	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	42
23	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับเซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ	43
24	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ	43
25	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับสารปฏิปักษ์ที่นึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ	44
26	การเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมแบบต่างๆ	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	ลักษณะต้นยางที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม	47
28	ลักษณะของรากที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม	48
29	ลักษณะรากของยางพาราที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม	48
30	ลักษณะเซลล์รากของยางพาราที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) เซลล์รากยางปกติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า	49

รายการตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ PT7 ด้วยวิธี dual culture plate ที่เวลาต่างๆ	76
2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate	76
3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ด้วยวิธี agar well diffusion	77
4	ประสิทธิภาพของสารระเหยจากเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*	77
5	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 บนชิ้นส่วนพืช	78
6	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการใส่เชื้อ 3 รูปแบบ	79

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasilieansis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งที่มีการส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศ สร้างรายได้จากการส่งออกในรูปของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ เป็นพืชที่ปลูกและดูแลง่าย ให้ผลผลิตยาวนาน และมีความเสี่ยงน้อยกว่าการปลูกพืชชนิดอื่น นับว่าเป็นพืชที่สร้างอาชีพให้กับประชาชนในการเลี้ยงดูตนเองและครอบครัว ปัจจุบันมีการปลูกยางพาราเพิ่มมากขึ้น โดยในปีพ.ศ. 2562 มีเนื้อที่ให้ผลผลิต 20.46 ล้านไร่ ในขณะที่ปีพ.ศ. 2563 มีเนื้อที่ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 20.58 ล้านไร่ (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) นอกจากนี้ยางพารายังเป็นพืชที่มีประโยชน์อีกมากมาย เช่น ผลิตเป็นยางรถยนต์และเฟอร์นิเจอร์ รวมไปจนถึงอุปกรณ์เครื่องใช้ในครัวเรือนต่างๆ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราโดยส่วนใหญ่มักประสบกับปัญหาต่างๆ มากมายโดยเฉพาะปัญหาโรคระบาด ซึ่งโรคระบาดที่พบและร้ายแรงมากที่สุด คือ โรครากขาว (white root disease) โรคนี้จะลุกลามและแพร่ระบาดได้เร็วมาก สร้างความเสียหายให้กับต้นยางพบเข้าทำลายต้นยางตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไปหลังจากปลูก สามารถระบาดได้ตลอดทั้งปี (ภูวดล, 2549) ส่งผลทำให้ผลผลิตของน้ำยางและผลผลิตของไม้ยางลดน้อยลง หากพบการระบาดรุนแรงจะทำให้ระบบรากเสียหายจนไม่สามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของต้นได้ เป็นผลทำให้ต้นยางยืนต้นตายในที่สุด (อุไร, 2548)

โรครากขาวยางพารา เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem เป็นโรคที่ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝน แพร่ระบาดโดยสปอร์ของเชื้อปลิวไปตามลมและลอยไปกับน้ำ เชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน เข้าทำลายต้นยางโดยใช้เส้นใยแทงเข้าสู่รากพืช ทำให้รากไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆของต้นได้ ทำให้ใบยางเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และร่วงจนหมดต้น เมื่อสังเกตบริเวณรากจะเห็นเป็นเส้นใยสีขาวแผ่ปกคลุมไปทั่วบริเวณผิวของราก เมื่อเส้นใยแก่จะนูนกลมและมีสีเหลืองซีด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะแรกจะแข็งกระด้างเป็นสีน้ำตาลซีด ในระยะรุนแรงจะกลายเป็นสีครีม ถ้าอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่ม การป้องกันกำจัดโรครากขาวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปลูกยางในพื้นที่ปลอดโรค ขุดคูล้อมรอบบริเวณต้นที่เป็นโรค เพื่อกั้นระหว่างต้นที่เป็นโรคและต้นที่ไม่เป็นโรค ป้องกันการสัมผัสกันของราก (สุขุม และคณะ, 2550) และการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งวิธีการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่เกษตรกรหาซื้อได้ง่าย มีวิธีการใช้ที่ไม่ซับซ้อน ใช้แล้วได้ผลเร็ว จึงทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งวิธีการใช้สารเคมีถ้าหากเกษตรกร

ใช้ได้ถูกต้องและถูกวิธีก็จะไม่เกิดอันตรายหรือเกิดผลเสียต่อตัวของเกษตรกรเองและสิ่งแวดล้อม แต่ถ้าหากที่ไม่ถูกวิธีหรือใช้มากเกินความจำเป็นต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในดิน น้ำ และอากาศ ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม

การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญที่สามารถนำมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคและการแพร่กระจายของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus species*) ซึ่งสามารถควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Pengnoo *et al.*, 2006) โรคกาบใบแห้งของข้าว (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998; Pengnoo *et al*., 2000; Chumthong *et al*., 2008; Wiwattanapatapee *et al*., 2013) และโรครากเน่าและใบจุดของผักสลัดไฮโดรโพนิกส์ (Rotniam *et al*., 2008) ได้ โดยแบคทีเรียบาซิลลัสมีกลไกในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหลายกลไก เช่น การแย่งอาหาร การสร้างสารปฏิปักษ์ การเป็นปรสิต เป็นต้น (จิระเดช, 2546) อย่างไรก็ตามการควบคุมโรครากขาวโดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ในดินที่สามารถควบคุมเชื้อราและส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารานั้น ถือได้ว่าเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรครากขาวแทนการใช้สารเคมีได้

2. ตรวจเอกสาร

2.1 ยางพารา

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจพืชหนึ่งที่ปลูกกันมากในแถบภาคใต้ ปัจจุบันมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในทุกภาคของประเทศ สร้างรายได้ให้กับประชาชน ยางพารามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea Brasiliensis* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ สำหรับการปลูกยางในประเทศไทยได้นำมาปลูกครั้งแรกโดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี้ ณ ระนอง) เจ้าเมืองตรัง ในปีพ.ศ. 2544 (ภัทรา, 2551)

2.1.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของยางพารา

ราก (root) เป็นส่วนที่สำคัญในการหาอาหารของยางพารา โดยรากที่เริ่มงอกใหม่ๆ จะมีส่วนของ radicle งอกออกมาและเจริญเติบโตเป็นรากแก้ว (tap root) ซึ่งมีขนาดใหญ่และหยั่งลึกลงไปในดินเป็น primary root มีหน้าที่เกาะยึดกับพื้นดิน และจะมีรากแขนง (lateral root) แตกออกมารอบๆ รากแก้วเป็น secondary root มีหน้าที่ดูดซึมธาตุอาหาร น้ำ และเกลือแร่ไปเลี้ยงส่วนต่างๆของต้น

ลำต้น (stem) เป็นส่วนสำคัญที่สุดของต้นยาง เนื่องจากเป็นบริเวณที่เก็บเกี่ยวผลผลิตในรูปน้ำยางสด และใช้ประโยชน์จากไม้ยาง โดยลำต้นที่เจริญเติบโตจากต้นกล้า (seeding)

โดยตรง มีลักษณะเป็นรูปกรวย ส่วนโคนเหนือพื้นดินจะมีขนาดโตกว่าและค่อยๆ เรียวไปสู่ส่วนปลาย ส่วนลำต้นที่เกิดจากการติดตา (stump budding) จะมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ส่วนโคนและส่วนปลายจะมีขนาดไม่แตกต่างกันมาก

ใบ (leaf) ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบ (compound leaf) สีเขียวเข้มเป็นมัน ซึ่งประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ ตรึงอยู่บนก้านใบ ลักษณะและขนาดของใบจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์

ดอก (flower) ดอกมีลักษณะเป็นช่อแบบ compound raceme แต่ละช่อมีหลายกิ่ง มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอกบนช่อเดียวกัน ดอกตัวเมียมีขนาดโตกว่าดอกตัวผู้และตั้งอยู่ปลายสุดของช่อดอก ในช่อดอกหนึ่งๆ จะมีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมีย (ภัทรา, 2551)

ผลยางและเมล็ด (fruit and seed) โดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นพู 3 พู ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะแข็งและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมล็ดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลลายขาวคล้ายสีของเมล็ดละหุ่ง ยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร (เอกชัย, 2547)

อย่างไรก็ตามการปลูกยางพาราให้ได้ผลดีนั้น เกษตรกรผู้ปลูกควรคำนึงถึงพื้นที่ปลูกและสภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของต้นและการให้ผลผลิต ซึ่งพื้นที่ที่เหมาะต่อการปลูกยางพาราควรเป็นพื้นที่ราบจนถึงพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 200 เมตร มีความลาดเทของพื้นที่ไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากถ้าพื้นที่มีความลาดเทมากดินจะเก็บความชื้นได้น้อยลงและมีการชะล้างสูง อุณหภูมิที่เหมาะต่อการปลูกยางอยู่ที่ประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 65-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเลือกมีความเหมาะสมต่อการปลูกยางพารานั้นนับว่าเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากดินเปรียบเสมือนที่ยึดเกาะของรากและเป็นแหล่งแร่ธาตุให้กับต้นยางพารา ลักษณะดินที่เหมาะต่อการปลูกควรมีหน้าดินลึกไม่น้อยกว่า 1 เมตร และไม่มีชั้นหินมาขัดขวางการเจริญของราก เนื้อดินควรเป็นดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย และดินเหนียว ซึ่งดินควรมีอนุภาคขนาดดินเหนียวประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ดินสามารถเก็บความชื้นและดูดซับธาตุอาหารได้ดี และมีอนุภาคขนาดดินทรายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ดินมีการระบายอากาศที่ดี ยางพาราเป็นพืชที่ไม่ชอบดินที่มีน้ำท่วมขัง แต่จะชอบดินที่มีการระบายน้ำดี มีอินทรียวัตถุสูง และมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.0-5.5 (ภูวดล, 2549)

2.2 โรครากขาวของยางพารา

2.2.1 เชื้อสาเหตุโรครากขาวยางพารา

โรครากขาว เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (SW.) Overeem เป็นเชื้อราจำพวกเห็ด (Basidiomycetes) พบครั้งแรกในสิงคโปร์ ปี พ.ศ. 2447 โดยริด

เล่ย์ (H.N. Ridle) ต่อมาได้พบในซีลอน ปี 2449 เชื้อราชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่ต้นยางมากที่สุด ป้องกันกำจัดได้ยาก สามารถเกาะกินและทำลายได้ทั้งไม้แห้งและไม้สด สิ่งที่สามารถสังเกตได้ว่าเป็นเชื้อราชนิดนี้ คือ เส้นใยแตกสาขาเป็นร่างแหและจับตัวกันแน่น เส้นใยเชื้อรา หรือ rhizomorphs ติดต่อกันยาวและอาจยาวถึง 1.50 เมตร มีลักษณะสีขาว ส่วนปลายแบน แต่ถ้าเป็นเชื้อราที่เกิดกับโรครากชนิดอื่น เช่น โรครากแดงและโรครากสีน้ำตาล มักจะมีเส้นใยเชื้อรายาวเพียงไม่กี่เซนติเมตร (รัตน์, 2553)

2.2.2 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

เชื้อรา *R. microporus* จัดเป็นพวกราชั้นสูง ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของอารมณ์ (2541) พบว่า ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นแบบ simple septate ไม่มี clamp connection เส้นใยสีขาวแตกแขนงจับตัวกัน ขนาดกว้าง 1.5-6 ไมโครเมตร สร้างสปอร์แบบ basidospore ลักษณะกลม สีใส-ส้มอ่อน เดี่ยวๆ ผิวเรียบ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-3 ไมโครเมตร ดอกเห็ด (fruiting body) มีลักษณะแบนและกว้าง สามารถกว้างได้ถึง 20 เซนติเมตร ลักษณะบางและซ้อนกันเป็นชั้นๆ รวมเป็นกลุ่ม บริเวณผิวด้านบนของดอกเห็ดเป็นรอยย่น นุ่มคล้ายกัมมะหยี่ เริ่มแรกผิวด้านบนมีสีส้มปนแดงปนน้ำตาล มีรอยย่น เมื่ออายุมากขึ้นผิวจะเรียบ เหี่ยว และสีจะจางลง ส่วนด้านล่าง (ใต้ดอกเห็ด) มีสีส้มสด เมื่ออายุมากขึ้นสีจะจางลง มีรูพรุนขนาดเล็กประมาณ 6-9 รูต่อมิลลิเมตร เมื่อผ่าด้านขวางของดอกเห็ดมีสีซีด เส้นใยเป็นแบบ monomitic ลักษณะบาง สีใส มีเส้นกั้นของเส้นใย (septa) ไม่มี clamps connection สปอร์มีลักษณะรูปร่างกึ่งกลมจนถึงกลม (sub-globose to globose) ผิวเรียบ มีขนาด 3.5-4.5 x 3.5-4 ไมโครเมตร (Hood, 2006)

ลักษณะของเชื้อรา *R. microporus* เมื่อเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth ที่ผสมน้ำสกัดฟางข้าว แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ดีคือ ฟรุคโตส มอลโตส กลูโคส เซลลูโลส และแป้ง ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย พบว่า เชื้อราสามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ แอสพาราจีน เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต เส้นใยสามารถเจริญได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 40 องศาเซลเซียส และยังพบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ที่ระดับ pH 4-10 โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 6-7 (อารมณ์, 2552) สำหรับลักษณะของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) พบว่า เส้นใยเชื้อรามีการเจริญในลักษณะที่แผ่เป็นวงกลม สีขาวและแบน เส้นใยใช้ระยะเวลา 6 วัน

ในการเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ โดยมีอัตราการเจริญเติบโต 1.3 เซนติเมตรต่อวัน เส้นใยไม่มีสี มีผนังกั้นและไม่มี clamp connection มีความกว้าง 2.8-7.2 ไมโครเมตร (Kaewchai *et al*., 2010)

2.2.3 อาการของโรค

เชื้อรา *R. microporus* เป็นเชื้อราที่เข้าทำลายระบบรากของพืช โดยการเกาะติดแน่นและปกคลุมบริเวณรากของยางพารา ซึ่งระยะนี้อาการของต้นยางส่วนที่อยู่เหนือดินยังเห็นไม่ชัดเจน ต่อมากลุ่มเส้นใยของเชื้อรากขาวจะเจริญลุกลามไปยังบริเวณโคนต้น ทำให้รากและโคนต้นเกิดอาการเน่า และต้นยางแสดงอาการที่พุ่มใบ คือ พุ่มใบมีสีเหลืองบางส่วนหรือใบเหลืองทั้งต้น หากพบระบาดรุนแรงก็จะทำให้ต้นยางหรือพืชชนิดอื่นยืนต้นตาย เมื่อขุดรากขึ้นมาดูจะเห็นใยรา (rhizomorphs) สีขาวเกาะแน่นเชื่อมโยงเป็นตาข่ายอยู่รอบรากและอาจเห็นราเป็นสีเหลืองหรือออกเป็นสีแดง แม้ว่าดินรอบรากจะเปียกแต่สีของเชื้อราก็จะยังคงเห็นไม่เปลี่ยนแปลง (รัตน์, 2553) หากระบาดในช่วงที่มีฝนตกจะมีดอกเห็ดเกิดขึ้นตรงบริเวณโคนต้นยางหรือส่วนรากที่โผล่พ้นผิวดิน ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลมแผ่นเดียวหรือซ้อนกันเป็นชั้นๆ ผิวด้านบนเป็นสีเหลืองส้ม โดยมีสีเข้มอ่อนเรียงสลับกันเป็นวง ผิวด้านล่างเป็นสีส้มแดงหรือสีน้ำตาล ขอบดอกเห็ดเป็นสีขาว (สมควร, 2542) เมื่อดอกเห็ดแก่จะมีลักษณะแข็งกระด้างสีน้ำตาลเหลืองหรือสีน้ำตาลแดงสลับกัน และขนาดไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความชื้นและสภาพแวดล้อมอื่นๆ (เอกชัย, 2547) ถ้าหากเชื้อราเจริญลุกลามในต้นยางเล็กจะทำให้ใบเหี่ยวเฉา ขอบใบม้วนงอลง และร่วงลงมาก่อนที่จะยืนต้นตายภายใน 6 สัปดาห์ และยังส่งผลทำให้เปลือกบริเวณโคนลำต้นยางมีลักษณะแห้งและแตกออกมาด้วย เชื้อราดังกล่าวมิได้เกาะกินและทำลายเฉพาะต้นยางเท่านั้น แต่ยังสามารถทำลายต้นชา กาแฟ โกโก้ มะพร้าว ปาล์ม มันสำปะหลัง ยาสูบ สับปะรด และต้นไม้อื่นบางชนิดอีกด้วย (สุขุม และคณะ, 2550)

2.2.4 กลไกการเข้าทำลาย

Nicole และ Benhamou (1991) รายงานว่า ต้นยางพาราที่มีอายุน้อยสามารถเกิดการติดเชื้อสาเหตุโรคได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก ซึ่งกลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microporus* สามารถสรุปได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ไรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่บนผิวรากภายนอก (ectotrophic growth habit)

2. เชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชเมื่อไม่มีอาหารจากภายนอก โดยไรโซมอฟเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อที่จะเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (infectious hyphae) และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อปลดปล่อย extracellular enzymes เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ เส้นใยของเชื้อราชนิดนี้เข้าสู่รากพืชทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่น เลนติเซล (lenticel) ทาง

บาดแผล หรือโดยการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยเซลล์ผิวรากของพืช ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนที่เกิดขึ้นในสภาพที่ดินขาดออกซิเจน (Nandris *et al*., 1987)

3. เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืช มีการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อน้ำ ท่ออาหาร และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่างและท่อต่าง ๆ ของเซลล์ สามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งในเซลล์ ระหว่างเซลล์ และผนังเซลล์ และพบว่าการที่เชื้อเจริญอยู่ภายในท่ออาหาร ทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลงด้วย

นอกจากนี้จากการตรวจสอบเนื้อไม้ที่เป็นโรค พบว่า โครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย ในส่วนของ middle lamella และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย ซึ่งเกิดจากการที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้ สามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เนื้อเยื่อของพืชที่เป็นโรค และพบการทำงานของเอนไซม์แลคเคส (laccase) ในปริมาณมากเป็นเอนไซม์หลัก ในขณะที่เชื้อราทำลายเนื้อไม้ชนิดอื่น เช่น *Phellinus noxius* จะสร้าง glycosidase และ polysaccharidases เป็นหลัก (Geiger *et al*., 1986)

2.2.5 สภาพแวดล้อมและการแพร่ระบาด

เชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระดับ pH 6-7 แต่ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส และระดับ pH 3 เชื้อรารากขาวไม่สามารถเจริญได้ (อารมณ์, 2541) เชื้อราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่มีความชื้นสูง สามารถแพร่กระจายได้ 2 ทาง คือโดยการสัมผัสกันระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากจากต้นปกติ ทำให้เชื้อเจริญลุกลามต่อไป และโดยสปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลม ติดไปกับขาแมลง หรือลอยไปตามน้ำ แล้วไปตกบนบาดแผลของตอยางใหม่ เมื่อมีความชื้นเพียงพอจะเจริญลุกลามไปยังระบบราก กลายเป็นแหล่งเชื้อโรคแหล่งใหม่ต่อไป (สุขุม และคณะ, 2550)

2.2.6 สมบัติทางเคมีของดินต่อการเจริญของเชื้อ *R. microporus*

R. microporus เป็นเชื้อราสาเหตุของโรครากขาว ที่สร้างความเสียหายให้กับต้นยางและพืชปลูกอีกหลายชนิด ต้นที่แสดงอาการที่ราก ใบ และกิ่ง ไม่สามารถทำการรักษาได้ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542) การปรับปรุงดินทางเคมี สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ชนิดนี้ได้ ซึ่ง pH ของดิน เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช และเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรารากขาว โดยในดินที่มีสภาพเป็นด่าง เชื้อราสามารถเจริญได้ดี ส่วนในสภาพดินที่เป็นกรดจะส่งผลทำให้การเจริญของเชื้อราลดน้อยลง การใส่ปุ๋ยลงไปในดิน เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง เนื่องจากปุ๋ยบางชนิดเมื่อใส่ลงไปจะปรับสภาพทำให้ดินเป็นกรด ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากทำให้ดินเป็นกรดแล้วยังช่วยเพิ่มธาตุอาหาร

ให้แก่พืช ทำให้พืชแข็งแรง ต้านทานต่อโรคได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ทำให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้การเจริญของเชื้อรากขาวลดน้อยลง Rodesuchit และคณะ (2012) รายงานว่า ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย และผงกำมะถัน (80%) สามารถยับยั้งการเกิดโรครากขาวได้ 88-100 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นการใส่ปุ๋ยกำมะถันที่ระดับความเข้มข้น 200 กรัมต่อหลุมปลูก สอดคล้องกับงานทดลองของ อารมณ์ และสมคิด (2559) ได้ศึกษาประสิทธิภาพและวิธีการใช้แม่ปุ๋ยไนโตรเจนบางชนิดและกำมะถันต่อการป้องกันการติดเชื้อราโรครากขาวของยางพาราในแปลงปลูกใหม่ มี 8 กรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ 1-7 เตรียมแปลงปลูกโดยตัดโค่นต้นยางและปล่อยตอไว้ในแปลงยาง ส่วนกรรมวิธีที่ 8 เตรียมแปลงปลูกโดยตัดโค่นต้นยาง ขุดตอเดิมออก ไถพลิกหน้าดิน และเก็บเศษรากยางออกจากแปลง จากการทดลองพบว่า กรรมวิธีในชุดควบคุม 2 (ผสมหินฟอสเฟต และปุ๋ยตามอัตราคำแนะนำ) มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยกว่ากรรมวิธีในชุดควบคุม 1 (ผสมหินฟอสเฟต และปุ๋ยตามอัตราคำแนะนำ) และเมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีที่ไม่ขุดตอออก (กรรมวิธีที่ 1-7) พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยในช่วง 1-2 ปีแรก ต้นยางมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไม่แตกต่างกัน เมื่อเวลาผ่านไป 3 ปี กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยยูเรียในอัตรา 100 กรัมต่อต้น และกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยกำมะถันทั้ง 2 อัตรา มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 1 ส่วนกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 2 อัตรา และการใส่ปุ๋ยยูเรีย 200 กรัมต่อต้น พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากการใส่ปุ๋ยที่สามารถลดการเจริญของเชื้อราชนิดนี้แล้ว Prasetyo และคณะ (2009) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดโรครากขาวและลักษณะของดิน โดยการเก็บดินในพื้นที่ที่เป็นโรคมา 7 จุด จากประเทศอินโดนีเซีย แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณการแลกเปลี่ยนแคตไอออน ปริมาณของแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ สารสกัดดินอิ่มตัว และ pH ของดิน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อปริมาณแคตไอออนทั้งหมด และปริมาณของแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินที่สูงขึ้น โอกาสที่จะเกิดโรครากขาวก็จะสูงขึ้นด้วย เช่นเดียวกับค่าสารสกัดดินอิ่มตัว พบว่า จะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเกิดโรครากขาว คือ เมื่อสารสกัดดินอิ่มตัวสูงขึ้น การเกิดโรคก็จะสูงขึ้นด้วย เนื่องจากทำให้ดินมีสภาพเป็นกลาง ซึ่งเหมาะต่อการทำกิจกรรมของเชื้อ *R. microporus* ในส่วนของค่าความเป็น pH ของดิน พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการเกิดโรครากขาว คือ ในดินที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0-4.03 เปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคมีค่าเท่ากับ 12-14 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเกิดโรคลดลง

2.2.7 การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี

การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีเป็นวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุม ซึ่งมีมากมายหลายชนิดโดย Jayasuriya และ Thennakoon (2007) รายงานว่า ได้ศึกษาประสิทธิภาพ

ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการผลิตสปอร์และควบคุมการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศศรีลังกา ซึ่งจากการทดลองพบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากขาวได้ โดยเชื้อ *T. harzianum* ในแต่ละพื้นที่แต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานทดลองของ นพวรรณ และนริสา (2558) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยเก็บตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. SK31 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 92.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Trichoderma* spp. TR7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 92.59 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Prasetyo และ Nur Aeny (2013) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสวนยางขนาดเล็ก โดยใช้สารสกัดจากพืช สารชีวภาพและสารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้ 3.3 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดจากต้นมันสาคู การใช้กำมะถัน สารสกัดจากข่า สารสกัดจากต้นลิ้นมังกร และอินทรียวัตถุ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 1, 2.7, 4.7, 8.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ปวีณา และคณะ (2555) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยวิธี soil dilution plate และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* จากเชื้อ actinomycete จำนวน 258 ไอโซเลท พบว่า เชื้อ *S. griseus* subsp. formicus strain: NBRC 14886 สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุดโดยวิธี dual culture assay

2.3 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

2.3.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติไม่ก่ออันตรายต่อคน สัตว์ และพืช (Boer and Diderichsen, 1991) เป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ Bacillaceae รูปร่างเซลล์เป็นแบบแท่งตรง (rod shaped) มีขนาด 0.3-2.2 x 1.2-7.0 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก (gram - prositive) มีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ จำนวน 1 อันต่อ 1 เซลล์ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลาแบบรอบตัว (ดวงพร, 2537) สามารถพบได้โดยทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ และส่วนต่างๆ ของพืช ใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 24-48 ชั่วโมง เจริญได้ดีในอุณหภูมิปกติ ค่าความเป็นกรดด่าง เป็นกลาง ดำรงชีวิตแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง โคโลนีของเชื้อมีลักษณะรูปร่างกลม ผิวด้านหน้าทึบแสง มีสีครีมถึงสีน้ำตาล เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้น มีการสร้างเอนโดสปอร์เมื่อมีอายุมากขึ้น ซึ่งมีรูปร่างที่

แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เอนโดสปอร์มีประโยชน์ คือ ส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานในหลายสภาวะ (Blakeman and Fokkeman, 1982) เช่น ทนต่อความแห้งแล้ง ความร้อน รังสียูวี และตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น (Obagwu and Korsten, 2003)

2.3.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้เนื่องจากสามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ทำให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นาน มีการผลิตเอนไซม์หลายชนิด จากงานทดลองของ Manjula และคณะ (2004) รายงานว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* AF1 สามารถสร้างสาร chitinases ในการควบคุมเชื้อรา *Puccinia arachidis* สาเหตุของโรคราสนิมของถั่วลิสงได้ ส่วน Change และคณะ (2003) รายงานว่า แบคทีเรีย *B.cereus* สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส (chitinases) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และ *Pythium ultimum* ได้ นอกจากนี้ Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ β-1,3- glucanase ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 พบว่า เอนไซม์ β-1,3- glucanase ดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วง pH 6.5-9.5 อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solania* และ *Pyricularia grisea* ได้ดี นอกจากการผลิตเอนไซม์แล้ว เชื้อแบคทีเรียยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน จากงานทดลองของ Shoda (2000) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin ขึ้นอยู่กับอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ FR-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin A ที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในแตงกวา โรคใบไหม้ และโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ (Pusey, 1989) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียยังสามารถผลิตสารระเหยออกมาได้อีกด้วย จากงานทดลองของสุชล (2539) ได้ศึกษาผลของสารระเหยที่สร้างจากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเชื้อรา *Py. Grisea*, *Rhynchosporium oryzae* และ *R. solani* พบว่า สารระเหยที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการขัดขวางขั้นตอนบางอย่างของกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อ *B. subtilis* เป็นที่ยอมรับและได้รับความสนใจในการนำมาใช้เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ ในพืชได้

2.4 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

2.4.1 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

1. การแข่งขัน (competition) โดยเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านต่างๆ ได้ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. cereus* UW85 มีความสามารถในการดึงเอาธาตุแคลเซียมจากดินมาใช้ในการสร้างสปอร์ของเซลล์ได้ อีกทั้งยังสามารถปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาทำให้ดินมีสภาพเป็นด่าง ส่งผลทำให้เชื้อ *Phytophthora* spp. ไม่สามารถสร้าง zoospore ได้ (Gilbert *et al*., 1990)

2. การทำลายชีวิต (Antibiosis) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีคุณสมบัติในการทำลายชีวิตเชื้อโดยสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งจากการรายงานของ Eldoksch และคณะ (2001) พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมในข้าวสาลีได้ถึง 57.14 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น subtilin, bacillin, bacillomycin, subtenolin, mycosubtilin, toximycin, bacitracin, xanthobacidin, iturin, subtilosin และ subsporin complex ออกมาทำให้สามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมได้ นอกจากนี้ Sariah (1994) ได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotricum capsici* และ *Colletotricum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ อีกทั้งยังทำให้เส้นใยมีรูปร่างที่ผิดปกติไปคือ เส้นใยหนาขึ้นและมีช่องว่างเกิดขึ้นซึ่งเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียผลิตสารปฏิชีวนะออกมา

3. กลไกในการเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อแบคทีเรียจะมีคุณสมบัติในการเป็นปรสิตโดยเชื้อจะเข้าไปเจริญอาศัยโดยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น Aktuganov และคณะ (2007) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 739 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีไคตินผสมอยู่สามารถผลิตเอนไซม์ β-1,3- glucanase และเอนไซม์ protease ได้ โดยเอนไซม์จะมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* เป็นต้น

4. กลไกในการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา หรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไปแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ (จิระเดช, 2546)

2.4.2 การควบคุมโรคพืชโดยวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์

วิธีการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชมีอยู่หลายวิธีคือ การคลุกเมล็ด ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียได้มีโอกาสอยู่ใกล้ หรือสัมผัสกับส่วนของพืชที่จะถูกเข้าทำลายโดยเชื้อโรคมากที่สุด นับว่าเป็นผลดีต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคในระยะที่เมล็ดพืชเริ่มงอก หรือเจริญเป็นต้นกล้า อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ซึ่งจากงานทดลองของจิระและคณะ (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งโดยเปรียบเทียบ 3 วิธี คือ 1. ปลูกถั่วหรั่งโดยคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อนปลูกครั้งเดียว 2. คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อนปลูกร่วมกับฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อเริ่มมีอาการของโรค และ 3. การปลูกถั่วหรั่งตามปกติซึ่งไม่ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า การคลุกเมล็ดและฉีดพ่นซ้ำด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นวิธีการที่ช่วยให้ผลผลิตของถั่วหรั่งในแปลงปลูกที่อำเภอสุไหงปาดี จังหวัดนราธิวาส ซึ่งเกิดโรคใบไหม้ระดับรุนแรงยังคงอยู่ในระดับปกติได้ แต่ในกรณีที่จังหวัดปัตตานีซึ่งมีการเกิดโรคใบไหม้เพียงเล็กน้อย พบว่า ผลผลิตของแต่ละวิธีการไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจน ส่วนที่จังหวัดพัทลุงและสงขลาที่พบว่า วิธีการปลูกตามปกติกลับให้ผลผลิตได้สูงกว่านั้น เป็นผลมาจากความผิดพลาดในการจัดการวัชพืช ส่วนวิธีการใส่เชื้อลงสู่ดิน เป็นวิธีการที่ช่วยให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ได้มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคในดินได้อย่างทั่วถึงเช่นเดียวกัน ทำให้ปริมาณเชื้อโรคในดินลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชปลูก ซึ่งการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในดินสามารถทำได้โดยการราดเชื้อลงในดิน จากงานทดลองของนันทรัตน์ (2546) ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการครอบครองรากข้าวโพดฝักอ่อนโดยใช้แบคทีเรีย 18 ไอโซเลทที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (A1 , A2 , A3 , A6 , A7 , A8 , A9 , A12, B1, B2-1 , B2-2, B4, B7-1 , B7-2, B8 , B9 , B10 และ B11) โดยใช้แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกมาราดที่โคนต้น พบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการครอบครองรากได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท A7 มีประสิทธิภาพในการครอบครองรากมากที่สุด ส่วนวิธีการฉีดพ่นใบพืช เป็นวิธีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนใบพืช เพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับใบ เช่น ใบจุด ใบไหม้ และราสนิม เป็นต้น ซึ่งกุศลและพิศาล (2556) รายงานว่า เมื่อนำผงแห้งของแบคทีเรีย *B. subtilis* B076 มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรน้ำ 3 สูตร คือสูตรผสมน้ำ ผสมในอาหาร nutrient broth (NB) และผสมสารจับใบ เพื่อทดสอบการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 บนใบแตงแคนตาลูป พบว่า กรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์ก่อนพ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีที่พ่นเชื้อสาเหตุโรคก่อน โดยชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Aac KK9 ได้ดีใกล้เคียงกัน ในขณะที่กฤติเดชและดุสิต (2559) รายงานว่า การพ่นใบด้วยสูตรผงหรือสูตรน้ำของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 6 ครั้ง ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร พร้อมทั้งใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ด 15 กิโลกรัม สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ได้ ตลอดจนลดความเสียหายจากด้วงหมัดกระโดดและหนอนใยผักได้ ทำให้ผักกาด

ฮ่องเต้มีผลผลิตสูงทัดเทียมกับกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร นอกจากนี้การใส่ลงบนส่วนขยายพันธุ์และกล้าพืช ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียได้สัมผัสกับส่วนของพืชที่จะใช้ขยายพันธุ์ รวมทั้งกล้าพืชก่อนที่เชื้อโรคจะมีโอกาสเข้าทำลายพืช นับเป็นวิธีการป้องกันโรคที่ได้ผลดี (จิระเดช, 2546)

2.4.3 การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการลดปริมาณของเชื้อโรคหรือความสามารถที่ทำให้การเกิดโรคลดลง ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ถือได้ว่าเป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการลดปริมาณของเชื้อโรค และควบคุมการเกิดโรคของพืชได้ จากการรายงานของ ศิริรัตน์ (2554) ได้ประเมินประสิทธิผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ BCB3-19 ในการควบคุมโรคเน่าราสีเทาของมะเขือเทศระหว่างเก็บรักษาภายใต้สภาพเลียนแบบการเก็บรักษามะเขือเทศในระดับการค้า ผลการศึกษาพบว่า การแช่ผลมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ BCB3-19 สามารถลดอัตราการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคราสีเทาของมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยวได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งภายใต้สภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส ส่วน Berger และคณะ (1996) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* สามารถใช้ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. สาเหตุของโรคเน่าคอดินของพืชสกุล *Photinia* และ *Brassica* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่บุษราคัม และคณะ (2554) ได้ทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่แยกได้จากดินปลูก วัสดุปลูก ปุ๋ยคอก และเศษซากพืช จำนวน 85 ไอโซเลท ในการควบคุมเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำของหน้าวัว โดยวิธี dual plate technique บนอาหาร PDA พบว่า มี *Bacillus* 15 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* ได้ โดยพบว่า 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ GM011, 17G5, 20W14 19W13, 22W11 และ 17G15 ตามลำดับ จักรพงษ์ และคณะ (2554) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในผักสลัดโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเจริญที่บิดเบี้ยวผิดรูปไปจากเดิม ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการแตกแขนงอย่างผิดปกติ รวมทั้งพบการเคลื่อนที่ของ cytoplasm ที่ผิดปกติไปจากเดิมส่งผลให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก ส่วน Bertagnolli และคณะ (1996) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* B153-2-2 สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular, endophoteinase และ phospholipase ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรครากเน่าในถั่วเหลือง

นอกจากเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถควบคุมโรคเน่าได้แล้ว ยังสามารถควบคุมโรคชนิดอื่นๆได้อีกด้วย จากการศึกษาของ Pengnoo และคณะ (2000) พบว่า แบคทีเรีย *B. megaterium* No. 3, 7 และ 16 และ *B. pumilus* No 36a และ 36b สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ทนความร้อน และยับยั้งเชื้อ *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Pengnoo และคณะ (2006) พบว่า *B. firmus* TRV 9-5-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ 97.4 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดถั่วหรั่ง ส่วนศุภลักษณ์ และคณะ (2551) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 503 ไอโซเลท นำมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B. megaterium* HT-NK-460 และ *B. brevis* TZ-CP-342 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ได้สูงถึง 97.22-100% Intanoo และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาโดยการคัดแยกแบคทีเรียจากผิวใบของคะน้า จากการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ไอโซเลท คือ *B. cereus* และ *B. megaterium* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าได้ โดยเกิดบริเวณยับยั้งบนอาหาร PDA และทำให้การเจริญของเส้นใยผิดปกติไป Cho และคณะ (2003) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากฟางข้าว พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 สามารถผลิตสารทางชีวภาพที่ยับยั้งโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Gloeosporium gloeosporioides* และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 ไปทำการแยกบริสุทธิ์พบว่า สารที่ให้ผลการยับยั้งคือ สารปฏิชีวนะ iturin A2 จินตนา และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการควบคุมเชื้อ *Pyricularia grisea* ของโรคไหม้ในข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ มีวิธีการควบคุมสองกลุ่ม คือ การควบคุมทางเคมี ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมและข่า สารเคมีป้องกันเชื้อราโรคพืช cabendazim และการควบคุมทางชีวภาพ ได้แก่ เชื้อ *B. subtilis* และ *Trichoderma* spp. เปรียบเทียบการควบคุมเชื้อราระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มทดลองด้วย poison food technique method ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 30± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน บันทึกบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเส้นใยเชื้อรา *Pyricularia grisea* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสิ่งทดลอง โดยเชื้อ *B. subtilis* สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีที่สุด และไม่พบความแตกต่างระหว่างการใช้ cabendazim และเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว ส่วนปัทมวรรณ และพิศาล (2556) ได้ทำการศึกษาใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่า แบคทีเรีย *B. licheniformis* ไอโซเลต BFP011 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีที่สุด และจากการศึกษาของปฏิมาพร และคณะ (2551) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์

SBK5.7 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPT41.1.3 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดยวิธี standard blotter plate พบว่า การแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว ส่วน ปวีณา (2554) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma virens* และแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าพันธุ์พื้นเมือง พบว่า เชื้อรา *T. virens* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ได้ร้อยละ 86.03 และ 94.18 ตามลำดับ และแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญได้ร้อยละ 91.55 และ 85.76 ตามลำดับ

นอกจากนี้ก็ได้มีการนำเอาเชื้อ *Bacillus* spp. มาใช้ในการควบคุมโรคในผลไม้ด้วย โดย Okigbo และ Osuine (2003) ได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินที่อยู่บริเวณใต้ต้นมะม่วงด้วยวิธี soil dilution spread plate เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis mangiferae*, *Botryodiplodia theobromae* และ *Macrophoma mangiferae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดในมะม่วง ทำการทดสอบบนอาหารแข็ง (PDA) แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งจากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* NCIB 3610 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 57, 61 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Thonglem และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาโดยการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ ของต้นส้มที่สมบูรณ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* สาเหตุโรคราเขียวของส้ม ทดสอบการยับยั้งโดยวิธี spot test technique และทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราด้วยวิธี dise diffusion method จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* W1L1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้ง 21 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 97.6 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อลดการใช้สารเคมี เนื่องจากสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่ออันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนทดลอง

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราแทนการใช้สารเคมี

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1.วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 วัสดุ อุปกรณ์ทางการเกษตร

1) ช้อนปลูก
2) จอบ
3) ตะแกรงร่อนดิน
4) ถุงเพาะ
5) ถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1) potato dextrose agar (PDA)
2) potato dextrose broth (PDB)

1.3 สารเคมี

1) สารเคมีไดฟีโนโคนาโซล + โพรพิโคนาโซล (difenoconazole + propiconazole)
2) ปุ๋ยสูตร 20-8-20
3) กรดซัลฟิวริก (sulphuric acid: 98% w/w H_2SO_4)
4) กรดเพอร์คลอริก (perchloric acid: 70% w/w $HClO_4$)
5) กรดไนทริก (nitric acid: 65% w/w HNO_3)
6) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloriv acid: HCl)
7) กรดบอริก (boric acid: H_3BO_3)
8) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid: $C_6H_8O_6$)
9) น้ำยาสกัดเบรย์ทู (Bray ll reagent: 0.10 M HCl + 0.03 M NH_4F)
10) โพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dicromate: $K_2Cr_2O_7$)
11) เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต (ferrous ammonium sulfate hexahydrate: Fe $(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$)

12) อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)
13) สารผสมเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture)
14) เฟอโรอินอินดิเคเตอร์ (ferroin indicator)
15) แอมโมเนียมอะซีเทต (ammonium acetate: NH_4OAc)
16) แอมโมเนียมเมทาวาเนเดต (ammonium metavanadate: NH_4VO_3)
17) โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride: KCL)
18) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH)
19) กลูโคส (glucose: $C_6\ H_{12}\ O_6$)

1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1) ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow cabinet)
2) ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
3) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
4) ตู้อบตัวอย่างพืช (hot air oven)
5) ตู้นึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
6) เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture)
7) เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 g และ 0.0001 g
8) ไมโครเวฟ (microwave)
9) ไมโครปิเปต (micropipette) ปริมาตรต่าง ๆ
10) ตะเกียงแอลกอฮอล์
11) เตาย่อยตัวอย่าง (didestion block)
12) เครื่องเขย่า (shaker)
13) เครื่องกลั่นไนโตรเจน (nitrogen distillation apparatus)
14) เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
15) เครื่องบดตัวอย่างพืช (grinder)
16) เครื่องวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (visible spectrophotometer)
17) กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (compound microscope)
18) เครื่องอะตอมมิกแอบซอบชันสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer)
19) เครื่องอิเล็กทริคอลคอนดักทิวิทีมิเตอร์ (electrical conductivity meter)
20) เตาให้ความร้อน (hot plate)

21) หลอดย่อยตัวอย่างขนาด 100 มิลลิลิตร (Kjeldahl tube)
22) ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (erlenmeyer flask)
23) บิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร (burette)
24) ดีสเพนเซอร์ขนาด 5 มิลลิลิตร (dispenser)
25) กระบอกตวง (measuring cylinder)
26) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
27) ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (duran)
28) หลอดทดลอง (test tube)
29) จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
30) บีกเกอร์ (beaker)
31) ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
32) เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
33) cork borer

2. วิธีการทดลอง

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus*

นำแบคทีเรียซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ จำนวน 44 ไอโซเลท ทดสอบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate (Skidmore and Dickinson, 1976) บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยนำเชื้อรา *R. microporus* (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยผลของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา) เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* วางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ในแนวตรงข้ามกันขีดเชื้อแบคทีเรียยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ามา 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตรเช่นเดียวกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งถือเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate อีกครั้ง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ

12 วัน พร้อมทั้งนำเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งของเชื้อรา *R. microporus* (Morton and Stroube, 1995) จากสูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = ((R1-R2)/R1)*100

R1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม

R2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเส้นใยเชื้อราชุดทดสอบ

2.2 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธีการวิเคราะห์ 16S rDNA

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.1 ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส โดยตรวจวิเคราะห์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene (primer 27F, 1525R) ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งสาย forward และ reverse วิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate และวิธี agar well diffusion

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.1 เลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ปริมาณ 2 loop ใส่ในอาหารเหลวที่บรรจุอาหารปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นแยกสารปฏิปักษ์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกสารปฏิปักษ์โดยกรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วแบ่งสารปฏิปักษ์เป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่ 2 ไม่นึ่ง จากนั้นนำเซลล์และสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียแต่ละส่วนทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตเซลล์ หรือสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรีย 0.3 มิลลิลิตรใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมกับเทอาหาร PDA ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* (เตรียมดังข้อ 2.1) วางกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ สำหรับชุดควบคุมวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* ไว้กึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 7 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion เตรียมอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหาร PDA จำนวน 4 จุด โดยเจาะให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ามา 2 เซนติเมตร ทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิเปตเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ใส่หลุมที่เจาะไว้ หลุมละ 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นเจาะชิ้นอาหารที่มีเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนชุดควบคุมดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 4 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.4 ทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

ทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี paired petridish technique (Gagne *et al*., 1991) เตรียมอาหาร PDA เพื่อใช้ในการทดสอบ จากนั้นปิเปตเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรีย ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร PDA แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ส่วนจานอาหาร PDA อีกฝั่งเจาะชิ้นอาหารที่มีเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นประกบกับจานอาหารทั้งสองฝั่งเข้าด้วยกัน โดยให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *R. microporus* อยู่ด้านบน แล้วพันประกบคู่จานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแต่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 4 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.5 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืช

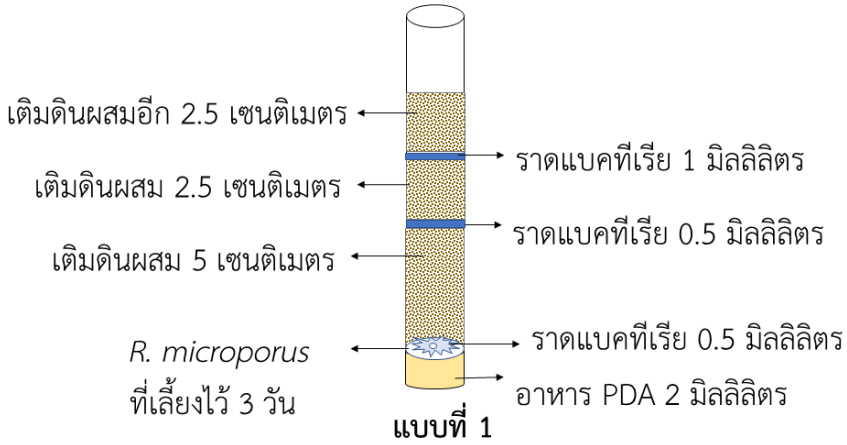
นำเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียในข้อ 2.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืช โดยนำท่อนยางขนาดความยาว 7 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเตรียมอาหาร PDA ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร

แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. microporus* วางในหลอดอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไม้ยางพาราที่นึ่งฆ่าเชื้อแช่ในส่วนของเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาที แล้วบรรจุใส่หลอดทดลองที่มีเชื้อรา *R. microporus* เจริญเต็มหน้าอาหาร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มแช่ท่อนยางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกผลโดยวัดความสูงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในการปกคลุมชิ้นไม้ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.6 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่มีการราดแบคทีเรียตามลำดับชั้น 3 รูปแบบในดินผสม

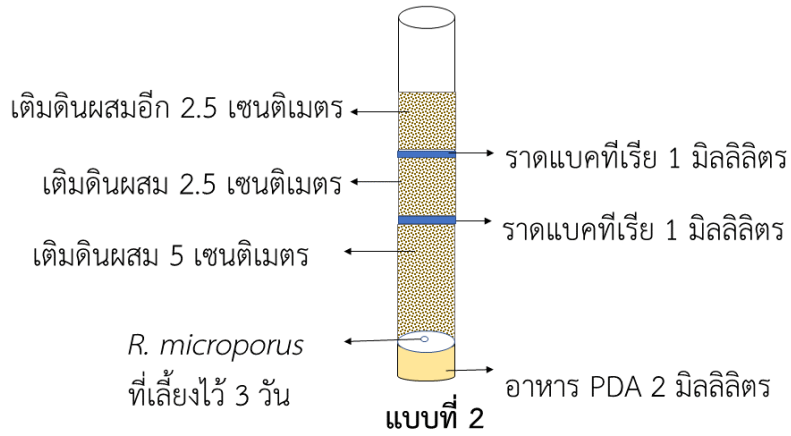
นำเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียในข้อ 2.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสมที่มีการราดแบคทีเรีย 3 รูปแบบ โดยเตรียมอาหาร PDA ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. microporus* วางในหลอดอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำดินผสมขี้เลื่อยและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อัตรา 9 : 1 : 3 ผสมให้เข้ากัน เพื่อบรรจุใส่หลอดทดลอง หลอดละ 20 กรัม โดยขั้นตอนการราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบ มีดังนี้

แบบที่ 1 ราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียใส่ในหลอดทดลองที่มีเชื้อรา *R. microporus* เจริญอยู่หน้าอาหาร PDA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมดินผสมลงไป 5 เซนติเมตร จากนั้นราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมดินผสมอีก 2.5 เซนติเมตร พร้อมกับราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งอีก 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมดินที่เหลืออีก 2.5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 13 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดความสูงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 1

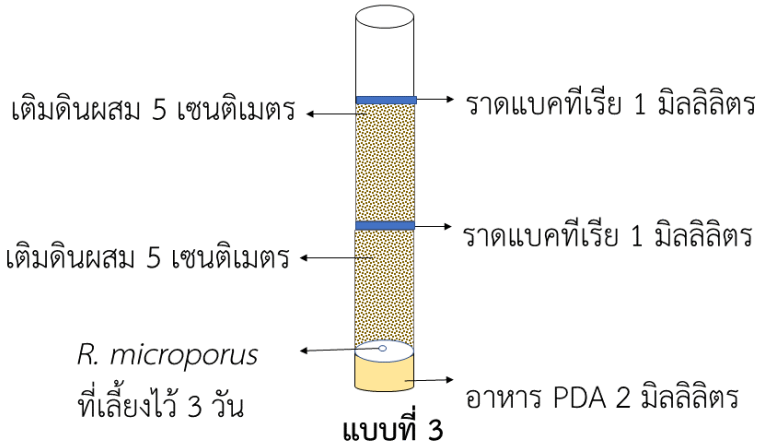
แบบที่ 2 เติมดินใส่หลอดทดลองที่มีเชื้อรา *R. microporus* เจริญอยู่หน้าอาหาร PDA 5 เซนติเมตร ราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมดินผสมอีก 2.5 เซนติเมตร พร้อมกับราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งอีก 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมดินที่เหลืออีก 2.5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดความสูงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 2

แบบที่ 3 เติมดินใส่หลอดทดลองที่มีเชื้อรา *R. microporus* เจริญอยู่หน้าอาหาร PDA 5 เซนติเมตร ราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมดินผสมอีก 5 เซนติเมตร พร้อมกับราดเซลล์หรือสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งอีก 1 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุด

ควบคุมที่ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดความสูงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 3

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* จำนวน 2 ไอโซเลท สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวในสภาพโรงเรือนทดลอง

2.7 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพโรงเรือนทดลอง

การเตรียมดิน

นำดินร่อนผ่านตะแกรงที่มีช่องขนาด 2 เซนติเมตร เตรียมไว้สำหรับปลูกยางพารา พร้อมทั้งเก็บดินเพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติบางประการของดินก่อนปลูก

การเตรียมต้นยางพารา

นำเมล็ดยางพาราเพาะในถุงเพาะชำ จนกระทั่งต้นยางอายุครบ 3 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ซึ่งเป็นปุ๋ยที่สถาบันวิจัยยางแนะนำสำหรับยางพาราก่อนเปิดกรีด อัตรา 130 กรัม/ต้น/ปี (นุชนารถ, 2554) เมื่อต้นยางพาราอายุครบ 1 ปี จึงคัดเลือกต้นยางที่มีลักษณะสมบูรณ์ขนาดความสม่ำเสมอ มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลทในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา

การเตรียมเชื้อรา *R. microporus*

นำเมล็ดข้าวฟ่างล้างให้สะอาดแล้วนำไปต้มให้เมล็ดพอแตกผสมกับขี้เลื่อยที่นึ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 9 : 1 แล้วบรรจุใส่ขวด ขวดละ 150 กรัม ปิดฝาจุกแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเชื้อรา *R. microporus* มาเลี้ยงโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* วางในขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลทเลี้ยงในอาหาร PDA โดยปิเปตเซลล์ของแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วล้างเซลล์ของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งจะได้เป็น cell suspension

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาว

ขุดดินรอบบริเวณโคนต้นยางพาราลึกประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นปลูกเชื้อรา *R. microporus* โดยโรยเชื้อรารอบบริเวณโคนต้นยาง ต้นละ 150 กรัม พร้อมกลบดินเพื่อให้เส้นใยเจริญเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำ cell suspension ของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลท หรือสารเคมีไดฟีโนโคนาโซล + โพรพิโคนาโซล (ผสมสารเคมี 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) ราดลงดินในอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อถุง และทำการราดแบคทีเรียหรือสารเคมีอีกครั้งที่เวลา 4 เดือน ดูแลกำจัดวัชพืชและให้น้ำ 3 วันครั้ง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่เทราดด้วยน้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 5 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่เชื้อรา *R. microporus* + เทราดด้วย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1
กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อรา *R. microporus* + เทราดด้วย *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2
กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อรา *R. microporus* + เทราดด้วยสารเคมี
กรรมวิธีที่ 4 ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อรา *R. microporus*)

บันทึกการเจริญเติบโตของยางพาราโดยวัดความสูงของต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง และเก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีหลังสิ้นสุดการทดลอง พร้อมทั้งประเมินความรุนแรงในการเกิดโรครากขาว โดยให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนเหนือดินของยางพารา ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Wattanasilakorn และคณะ, 2012)

ระดับ 0 = 0 เปอร์เซ็นต์ ต้นสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเกิดโรค
ระดับ 1 = 1-25 เปอร์เซ็นต์ ใบมีสีเขียว ขอบใบเริ่มมีสีเหลือง
ระดับ 2 = 26-50 เปอร์เซ็นต์ ใบเริ่มมีสีจาง ขนาดใบเล็กลง ขอบใบไหม้
ระดับ 3 = 51-75 เปอร์เซ็นต์ ใบมีสีเหลือง ขนาดใบเล็กลง ขอบใบไหม้
ระดับ 4 = 75-100 เปอร์เซ็นต์ ใบมีสีเหลือง ทิ้งใบ ปลายใบไหม้

ประเมินความรุนแรงในการเกิดโรครากขาว โดยให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนราก ของยางพารา ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Wattanasilakorn และคณะ, 2012)

ระดับ 0 = 0 เปอร์เซ็นต์ ระบบรากสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเกิดโรค

ระดับ 1 = 1-25 เปอร์เซ็นต์ ปลายรากฝอยและรากแก้วเริ่มมีสีน้ำตาล

ระดับ 2 = 26-50 เปอร์เซ็นต์ รากฝอยเป็นสีน้ำตาล รากแก้วเป็นสีน้ำตาลเข้ม ประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ของความยาวรากทั้งหมด

ระดับ 3 = 51-75 เปอร์เซ็นต์ รากฝอยเปื่อยยุ่ยและขาด รากแก้วเป็นสีน้ำตาลเข้ม ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 4 = 75-100 เปอร์เซ็นต์ รากฝอยถูกทำลายเกือบหมด รากแก้วเป็นสีน้ำตาลเข้มทั้งหมด ผิวรากเปื่อยยุ่ย เมื่อบีบรากจะนิ่มผิวและเนื้อรากหลุดออกมา

หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการประเมินมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรคโดยใช้สูตร ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Wattanasilakorn และคณะ, 2012)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้น x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right) \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right) \times 100$$

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดินก่อนและหลังปลูก และธาตุอาหารในพืช

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดิน

นำดินก่อนและหลังปลูกจากข้อ 2.7 มาผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงช่องเปิดขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปฏิกิริยาดิน (pH), ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (organic matter), ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N), ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K) ด้วยวิธีการดังนี้

1. ปฏิกิริยาดิน (pH) ใช้ดิน : น้ำ อัตราส่วน 1 : 5 เขย่าประมาณ 1 นาที ทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดด้วย pH meter

2. อินทรียวัตถุ (organic matter) โดยวิธี Walkley and Black ด้วยการ oxidized คาร์บอนอินทรีย์ด้วยโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) แล้ววิเคราะห์ไดโครเมตไอออนที่เหลือจากการ oxidized ด้วยการไทเทรตกับการละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) หลังจากนั้นคำนวณคาร์บอนอินทรีย์ไปเป็นอินทรียวัตถุ โดยอาศัยหลักการว่า อินทรียวัตถุมีอินทรีย์คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 58 เปอร์เซ็นต์

3. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (total N) โดยวิธี Kjeldahl ชั่งดิน 1.00 กรัม เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารเร่งปฏิกิริยาที่มีทองแดง โพแทสเซียมซัลเฟต และซีลีเนียม นำไปย่อย จากนั้นเติมด่างและกลั่นหาแอมโมเนียม โดยมีสารละลายกรดบอริกเป็นตัวจับแก๊สแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไอออน แล้วไทเทรตหาแอมโมเนียมที่ถูกจับในกรดบอริกด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

4. ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) โดยวิธีเบรย์ทู (Bray II method) ชั่งดิน 1.0 กรัม เติมน้ำยาสกัดเบรย์ทู (0.1 M HCl+0.03 M NH_4F) 10 มิลลิลิตร เขย่า กรอง และทำให้เกิดสีโดยวิธีโมลิบดินัมบลู แล้ววัดฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร

5. โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K) ชั่งดินใส่ในหลอดเหวี่ยงพลาสติก เติมแอมโมเนียมอะซิเทต (1 M NH_4OAc pH 7) เขย่า 30 นาที กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 5 แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของโพแทสเซียม ด้วยวิธี atomic absorption spectrophotometry

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพารา

ทำความสะอาดใบยางพารา จากนั้นนำตัวอย่างใบอบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างแห้ง นำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช แล้วนำไปผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh จากนั้นเก็บตัวอย่างใบที่ได้ไว้ในถุงกระดาษ และนำไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารหลัก โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ไนโตรเจน วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl โดยชั่งตัวอย่างพืช 0.10 กรัม แล้วเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 3 มิลลิลิตรและสารเร่งปฏิกิริยา ย่อยตัวอย่างจนใส จากนั้นเติมด่างลงไป และนำไปกลั่นหาแอมโมเนียมโดยมีสารละลายกรดบอริกเป็นตัวจับแก๊สแอมโมเนียม แล้วไทเทรตหาแอมโมเนียมในกรดบอริกด้วยสารละลายกรดที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

2. ฟอสฟอรัส ทำการย่อยสลายด้วยกรดผสมไนทริกและเพอร์คลอริค (HNO_3-$HClO_4$; 3:1) จนตัวอย่างพืชใส แล้วทำให้เกิดสีด้วยวิธีเยลโลโมลิบโดวาเนโดฟอสฟอริกแอซิด (yellow molybdovanadophosphoric acid method) โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของโมลิบเดตและวาเนเดต ในสภาพที่เป็นกรดทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer (Barton, 1948)

3. โพแทสเซียม ทำการย่อยสลายด้วยกรดผสมไนทริกและเพอร์คลอริค (HNO_3-$HClO_4$; 3:1) จนตัวอย่างพืชใส จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการย่อยมาปรับปริมาตรหรือเจือจางให้เหมาะสม แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 3

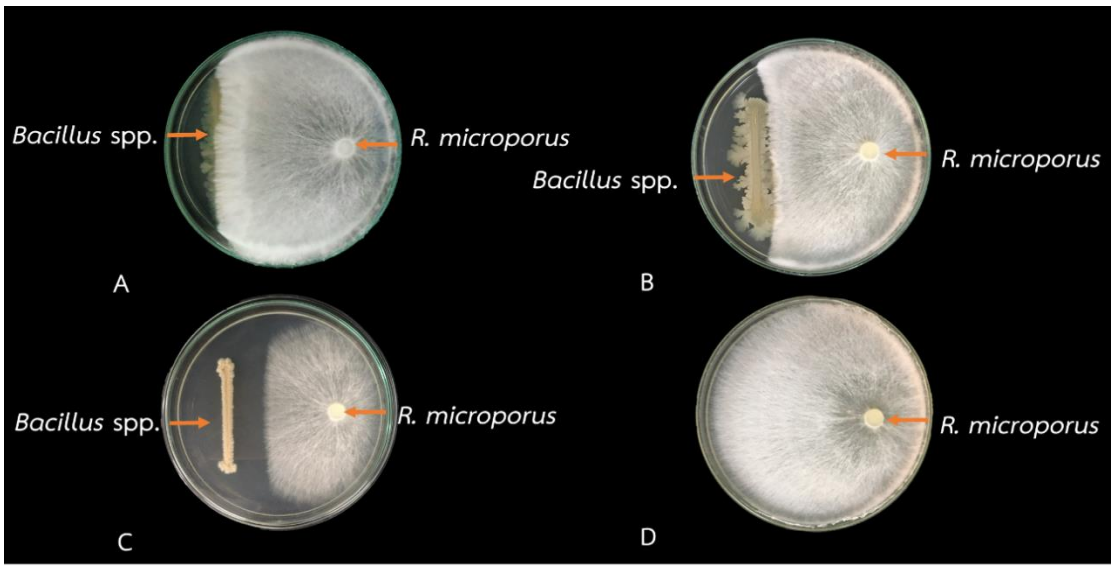
ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus*

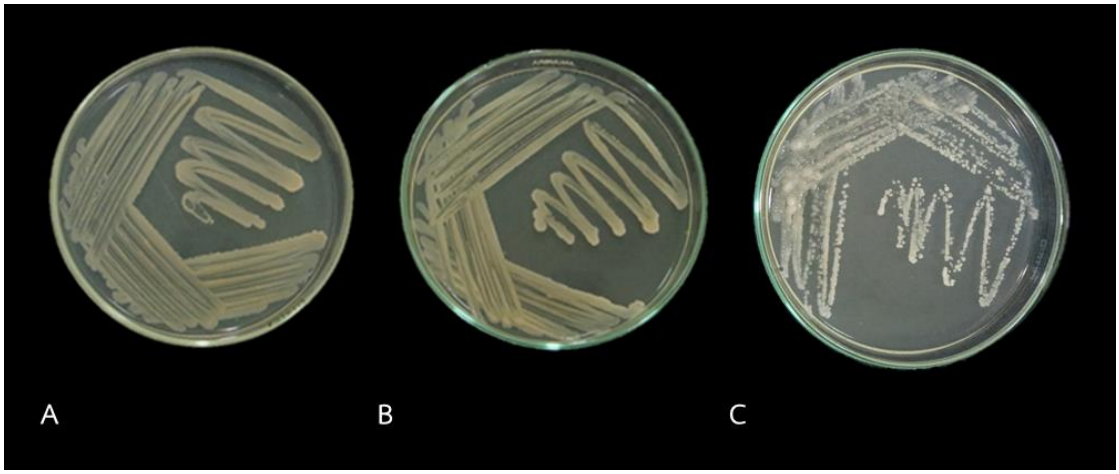
จากการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลท มีแบคทีเรีย 41 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้มากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) โดยทำให้เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรียได้ (ภาพที่ 4 C) ในขณะที่การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่ 0-25 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยเชื้อรามีการเจริญข้ามผ่านแบคทีเรีย เส้นใยมีลักษณะหนา (ภาพที่ 4 A) ส่วนการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่ 26-50 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่นเมื่อเจริญเข้าใกล้แบคทีเรีย และไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรียได้ (ภาพที่ 4 B) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) ใช้ในงานทดลองขั้นถัดไป โดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 มีลักษณะโคโลนีที่คล้ายกัน คือ โคโลนีเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ขีดเชื้อ มีสีขุ่นไม่ขึ้นเงา ขอบเกลี้ยงไม่มีรอยเว้า ลักษณะผิวหน้าของโคโลนีเรียบเป็นแผ่นบาง (ภาพที่ 5 A และ B) ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7-2 โคโลนีเจริญอย่างกระจัดกระจายตามแนวที่ขีดเชื้อ สีขุ่นทึบ รูปร่างกลมและนูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าของโคโลนีเรียบมันวาว และมีความหนืด (ภาพที่ 5 C)

ตารางที่ 1 ศักยภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

Inhibition (%)	Number of isolates	Antagonist bacterial isolate (isolate)				
0-25	21	LPDD10-1	LPDD9-13	LPDD9-12	LPDD9-6	BS171
		RN1-5	RN5-6	RN5-7	NMD3-2	NMD4-3
		NMD6-1	NMD6-3	NMD6-5	NMD9-2	NMD9-3
		NHE10-1	PLMD1-2	PBDE2-1	PBDD3-4	PBDC2-2
		LPDD3-3				
26-50	20	ROS2	LAR3	RN 1-3	LPDD9-9	LPDD9-17
		LPDD10-3	RN 1-2	PBDE2-7	RN 5-4	NMD5-1
		NDD2-2	PLMD4-2	PLMD4-3	PBDD3-3	NSR.89-24
		LAR2	PLDD5-1	LAR1	LPDD10-4	TRF
51-75	3	SM1	PT7	LPDD3-2		



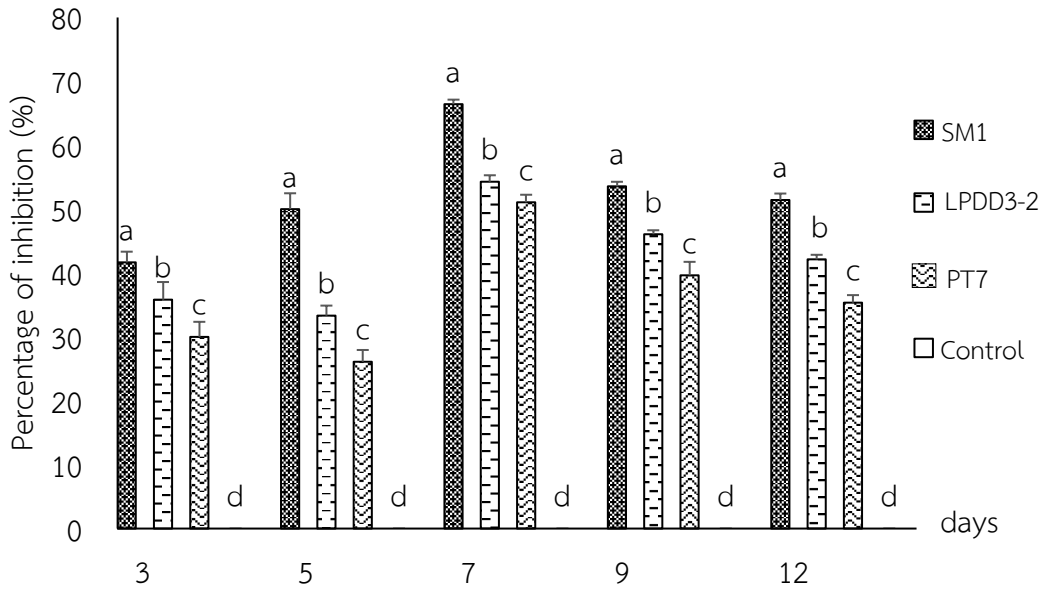
ภาพที่ 4 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่แบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อราได้ (A) 0-25 เปอร์เซ็นต์, (B) 26-50 เปอร์เซ็นต์, (C) 51-75 เปอร์เซ็นต์ และ (D) ชุดควบคุม ที่เวลา 7 วัน



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ไอโซเลท SM1, (B) LPDD3-2 และ (C) PT7 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA

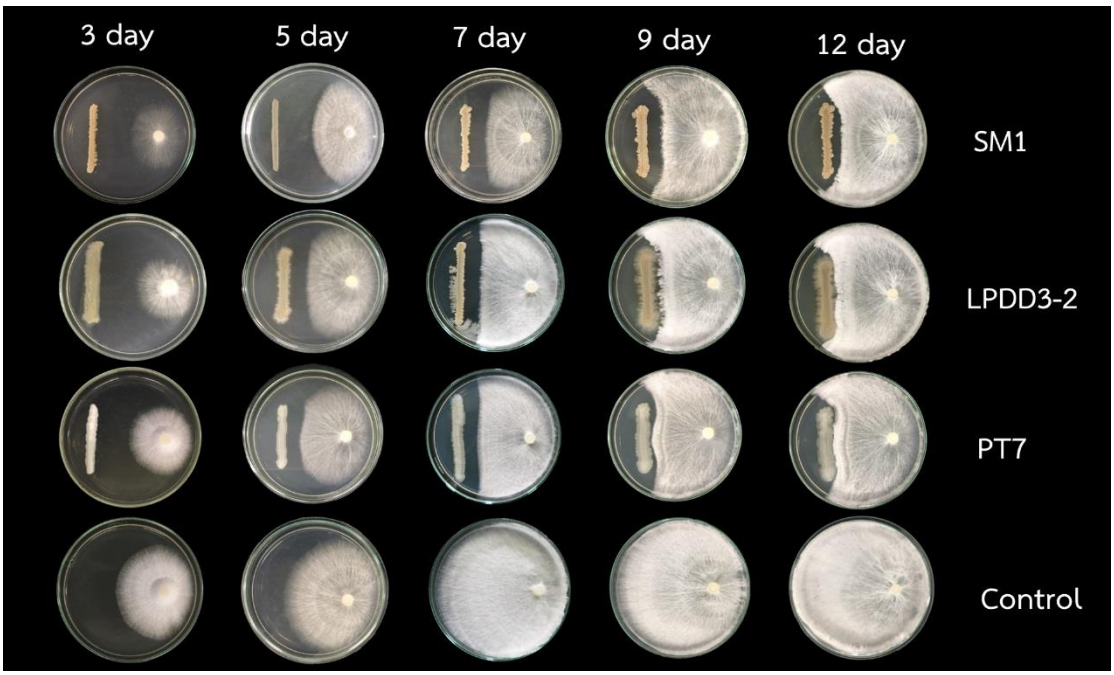
เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate อีกครั้ง พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีตลอดช่วงเวลาที่ทดสอบ โดยเฉพาะที่เวลา 7 วัน สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 66.43 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท LPDD3-2 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 54.29 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท

PT7 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ต่ำกว่า 51.07 เปอร์เซ็นต์ทุกช่วงเวลาที่ทดสอบ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 6) โดยเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 ปลายเส้นใยอัดตัวกันแน่น เส้นใยมีลักษณะบางเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ และไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ ส่วนเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท LPDD3-2 และ PT7 เส้นใยมีลักษณะหนา ปลายเส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น และไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 7) เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลงอย่างชัดเจน ส่วนเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7 มีลักษณะผิดปกติเช่นเดียวกัน แต่เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวน้อยกว่า ในขณะที่ชุดควบคุมปลายเส้นใยงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 8)

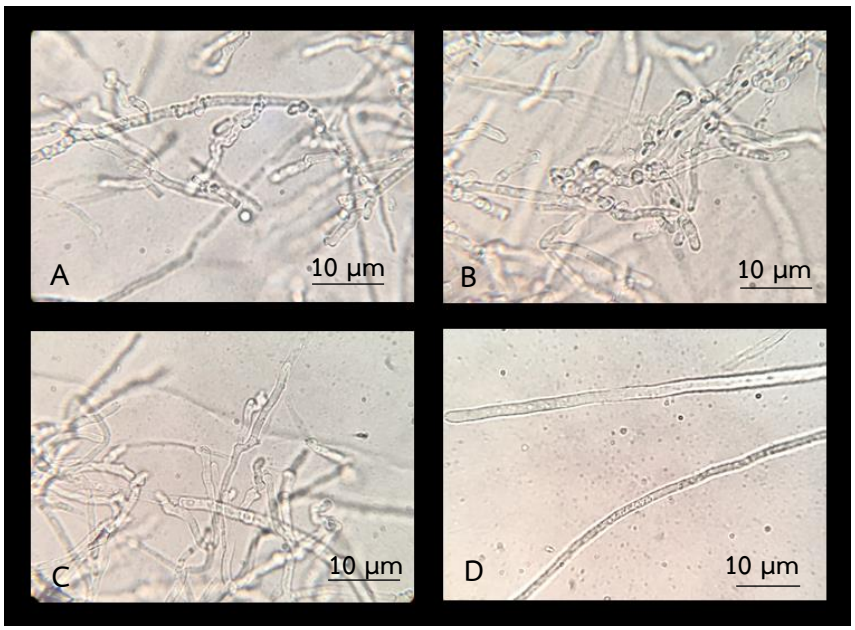


ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน ด้วยวิธี dual culture plate

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



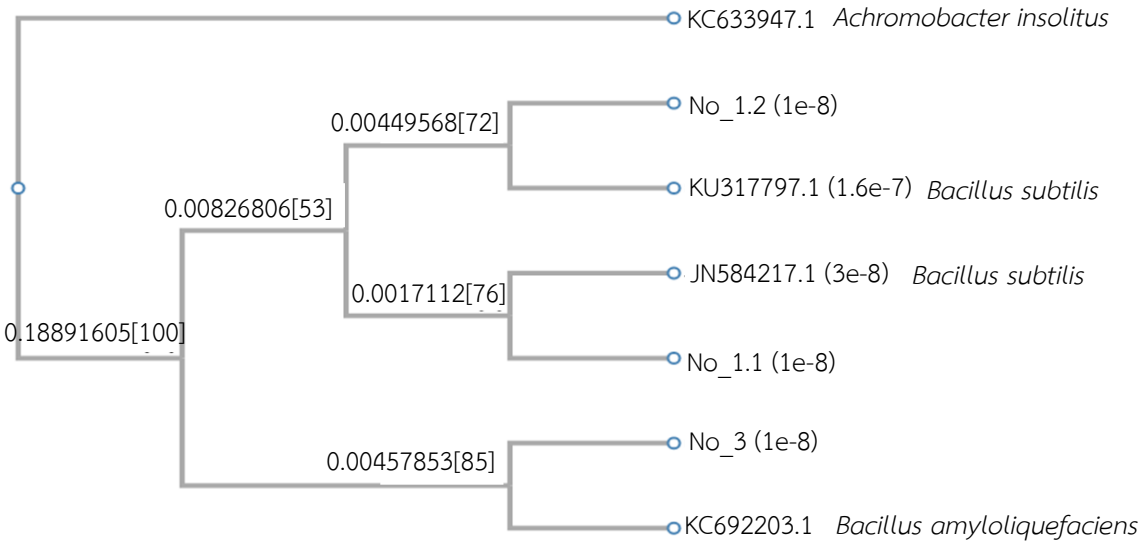
ภาพที่ 7 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน ด้วยวิธี dual culture plate



ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ไอโซเลท SM1, (B) ไอโซเลท LPDD3-2, (C) ไอโซเลท PT7 และ (D) ชุดควบคุม ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี dual culture plate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

3.2 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธีการวิเคราะห์ 16S rDNA

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส โดยตรวจวิเคราะห์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene (primer 27F, 1525R) พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับ *B. subtilis* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (KU317797.1 และ JN584217.1 ตามลำดับ) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 9) ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับ *B. amyloliquefaciens* มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (KC692203.1) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Basillus* spp.

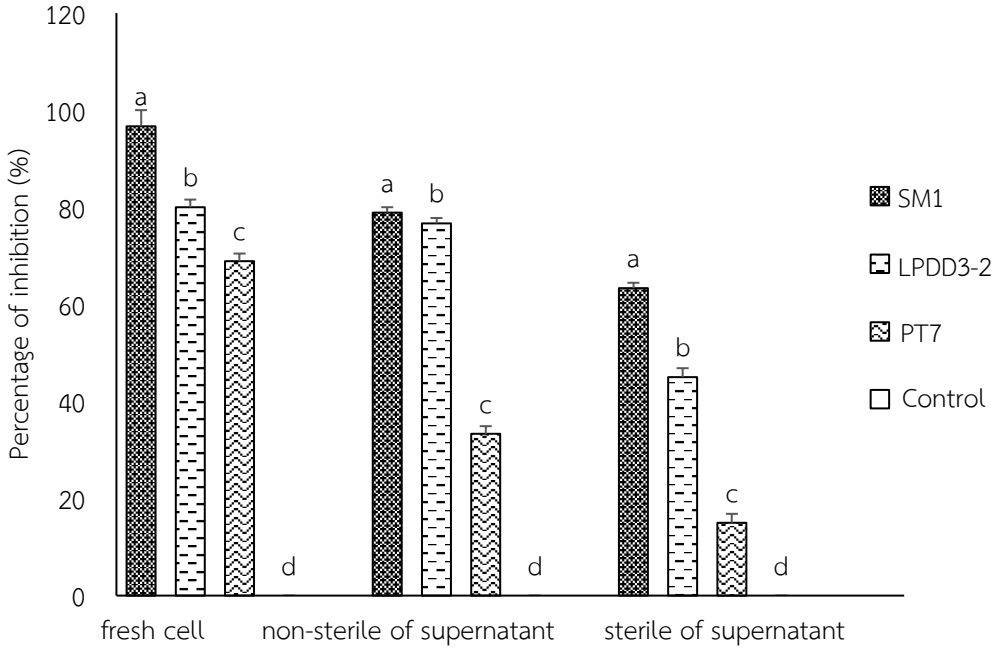
ตารางที่ 2 ชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่วิเคราะห์โดยวิธี 16S rDNA

Code	primer	Source	Identity (%)	Accession no.
SM1	27F+1525R	*Bacillus subtilis*	99	KU317797.1
LPDD3-2	27F+1525R	*Bacillus subtilis*	99	JN584217.1
PT7	27F+1525R	*Bacillus amyloliquefaciens*	100	KC692203.1

3.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate และวิธี agar well diffusion

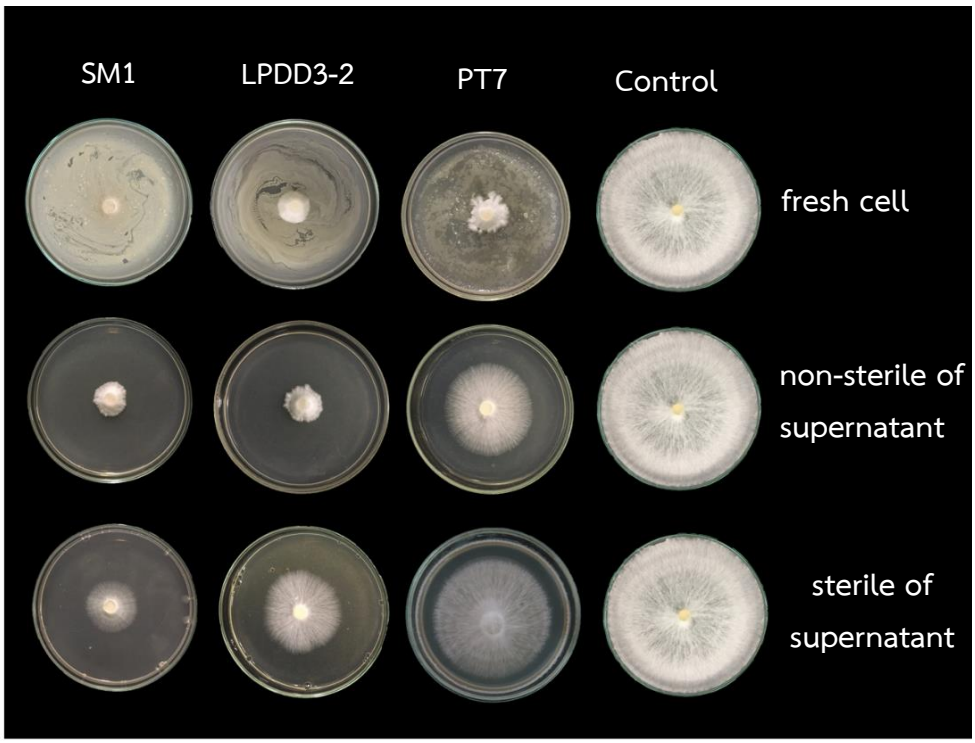
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์และสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี pour plate พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทสามารถผลิตสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด (96.67, 78.89 และ 63.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ภาพที่ 10) ในขณะที่เซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้น้อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 68.89, 33.33 และ 15.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10) สำหรับลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะบางลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยที่เส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีลักษณะบางและเจริญได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 พบว่า มีการเจริญน้อยและอัดตัวกันแน่นเช่นเดียวกัน ในขณะที่เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 พบว่า มีการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่ลักษณะของเส้นใยบางกว่า สำหรับเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ที่นึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 พบว่า เส้นใยมีลักษณะบางและเจริญน้อยเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ขณะที่เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ที่นึ่งของ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เส้นใยเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ภาพที่ 11) และจากการนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะผิดปกติ บิดเบี้ยว และกุดตัวลง (ภาพที่ 12 A) ส่วนเส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรีย พบว่า เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะผิดปกติเช่นเดียวกัน โดยปลายเส้นใยมีลักษณะโป่งพอง และบิดเบี้ยว (ภาพที่ 12 B และ C) ในขณะที่ชุดควบคุมปลายเส้นใยงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 12 D) และผลการตรวจเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่เวลา 7 วัน พบว่า เส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ถูกทำลายโดยแบคทีเรียปลดปล่อยสารปฏิปักษ์ออกมาย่อยจนมองไม่เห็นเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (ภาพที่ 13 A) ในขณะที่เซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 มีการเกาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* ทำให้เส้นใยฝ่อ เกิดรอยย่นบนพื้นผิว เป็นรู และมีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน (ภาพที่ 13 B) ส่วนเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 มี

เซลล์ของแบคทีเรียเกาะและเจาะบริเวณผิวเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เกิดรอยย่นบนพื้นผิวเส้นใยฝ่อลงเช่นเดียวกัน แต่มีเซลล์ของแบคทีเรียน้อยกว่ากรรมวิธีอื่นๆ (ภาพที่ 13 C)

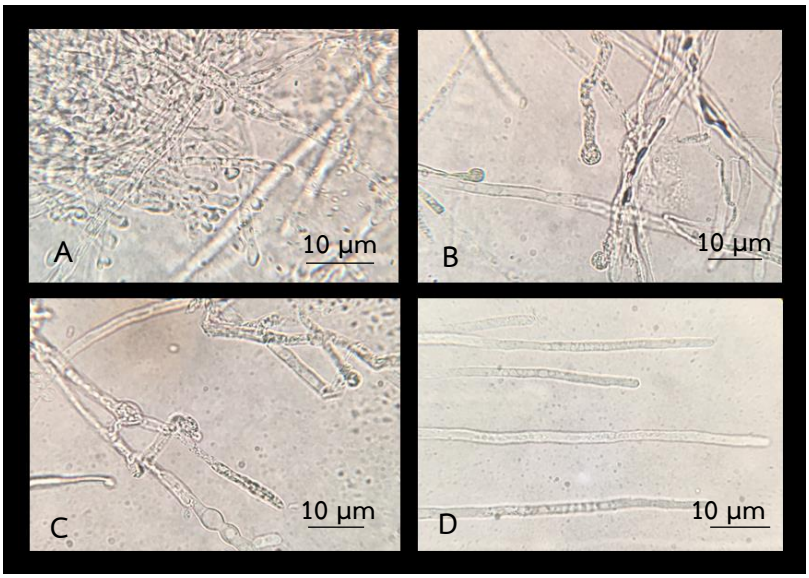


ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate

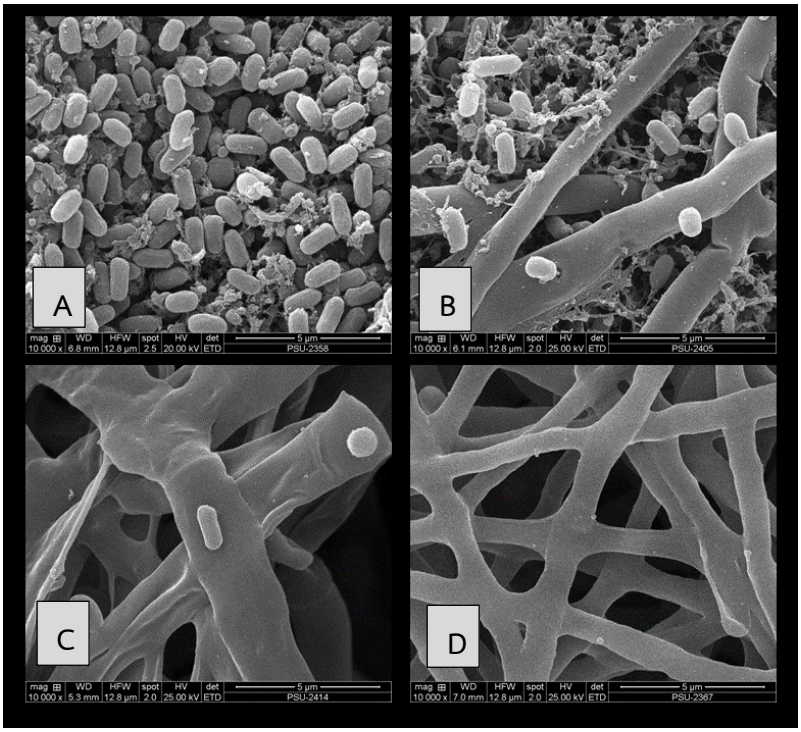
หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 11 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate

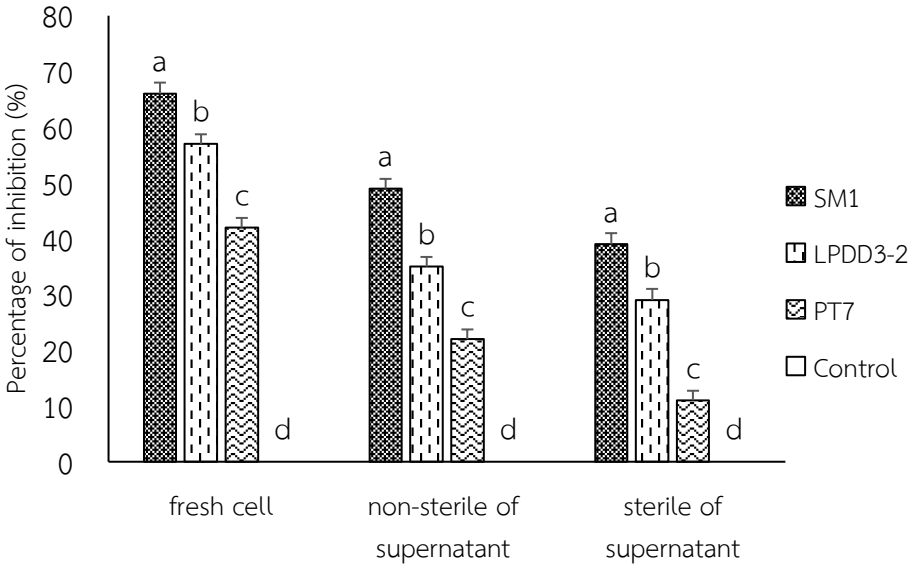


ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า



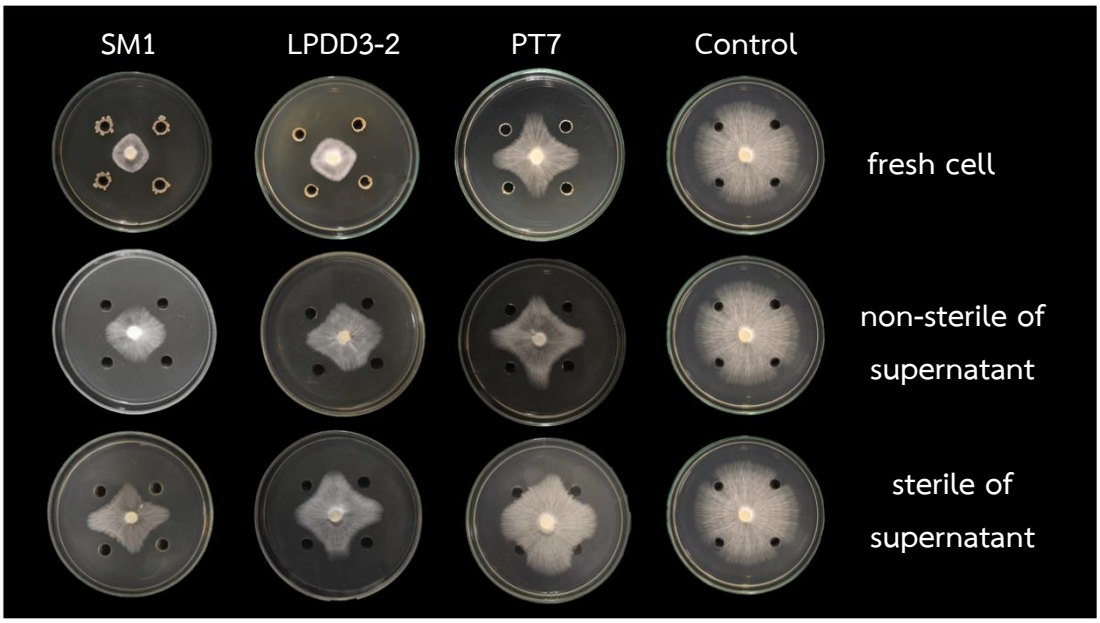
ภาพที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ (A) เซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000 เท่า

สำหรับผลการทดสอบเซลล์และสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion เซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 66.00, 49.00 และ 39.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้น้อย (42.00, 22.00 และ 11.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ภาพที่ 14) โดยกรรมวิธีที่ทดสอบกับเซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และมีลักษณะบางลง ในขณะที่เส้นใยเชื้อราที่ทดสอบกับ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เส้นใยมีการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ภาพที่ 15) เมื่อนำเส้นใยเชื้อราตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว ปลายเส้นใยโป่งพอง และกุดตัวลง ในขณะที่เส้นใยของชุดควบคุมปลายเส้นใยงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 16)

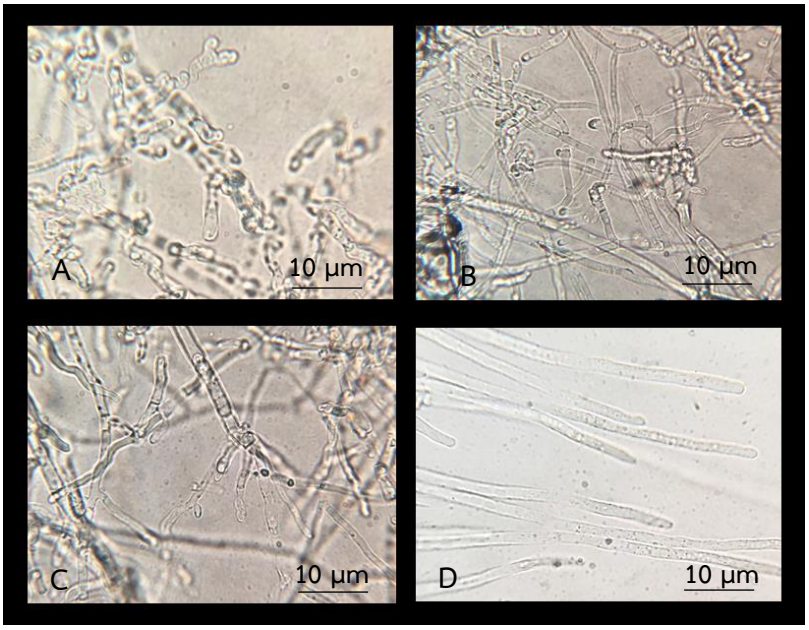


ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



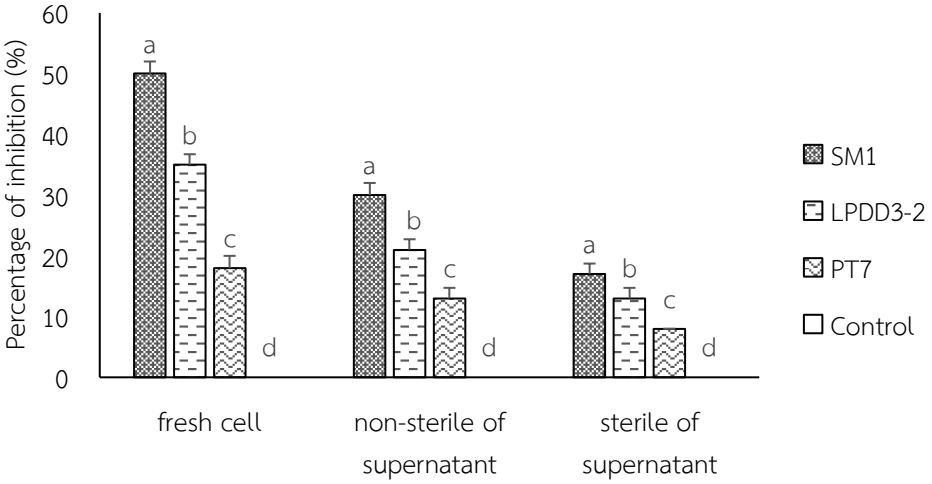
ภาพที่ 15 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ด้วยวิธี agar well diffusion



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่งและ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

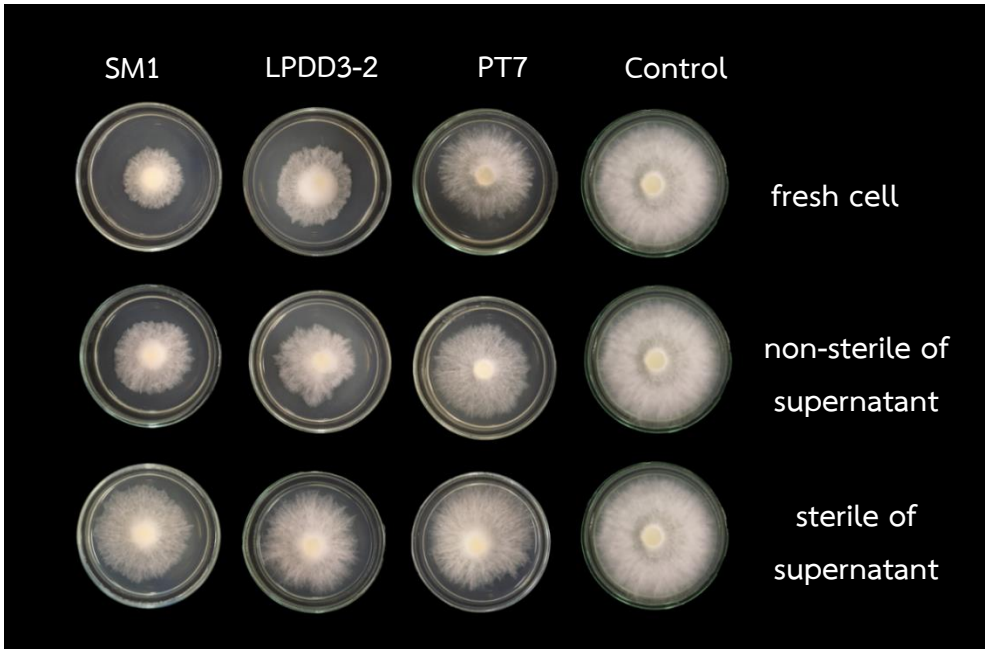
3.4 ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท สารระเหยจากเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีแต่น้อยกว่าวิธี pour plate โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 50.00, 30.00 และ 17.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 17) มีผลทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบางปลายเส้นใยอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 18) ในขณะที่สารระเหยจากเซลล์และสารปฏิปักษ์ของ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อย โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ทดสอบโดยสารปฏิปักษ์ที่นึ่งสามารถยับยั้งได้เพียง 8.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17) ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีการเจริญใกล้เคียงชุดควบคุม (ภาพที่ 18) เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่า เส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะบิดเบี้ยว และกุดตัวลง ในขณะที่เส้นใยที่เลี้ยงร่วมกับสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปลายเส้นใยมีลักษณะโป่งพอง และกุดตัวลงเล็กน้อย (ภาพที่ 19)

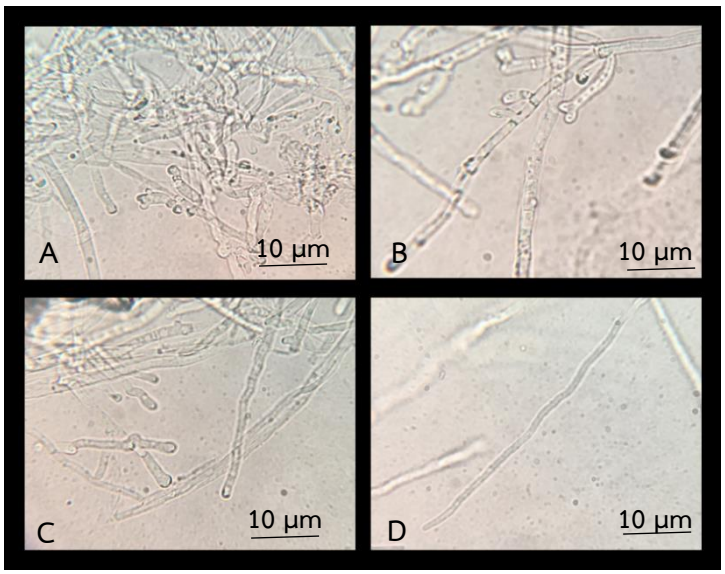


ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารระเหยจากเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



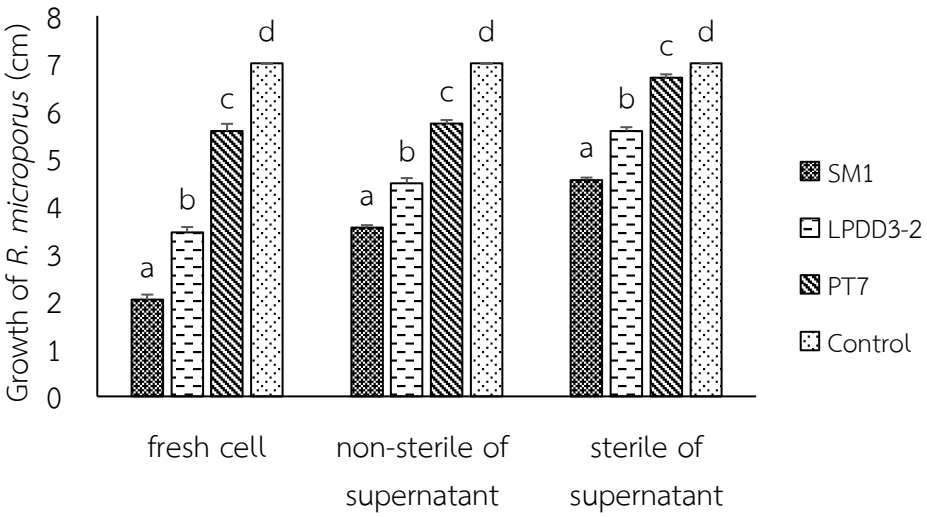
ภาพที่ 18 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับสารระเหยจากเซลล์สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7



ภาพที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

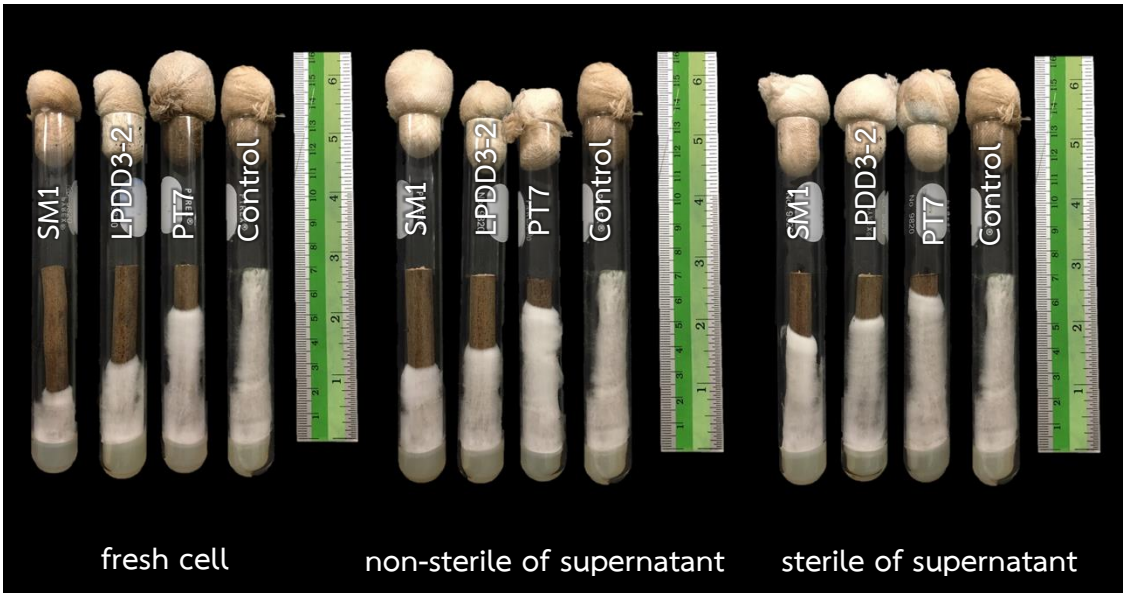
3.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์และสารปฏิปักษ์ทั้งที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืช พบว่า ท่อนยางที่แช่ในเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีแม้ทดสอบบนชิ้นส่วนพืช โดยเชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้เพียง 2.03, 3.55 และ 4.55 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ในขณะที่ท่อนยางที่แช่ในเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยเฉพาะท่อนยางที่แช่ในสารปฏิปักษ์ที่นึ่งเชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้ 6.70 เซนติเมตร แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเชื้อราเจริญเต็มท่อนยาง 7 เซนติเมตร (ภาพที่ 20) โดยทุกกรรมวิธีมีผลทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะอัดตัวกันแน่น และไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 21) อีกทั้งยังทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ทั้งที่ไม่นึ่งและนึ่งของแบคทีเรียมีลักษณะผิดปกติ คือ ทำให้เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว ปลายเส้นใยมีลักษณะเล็กลง เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (ภาพที่ 22)

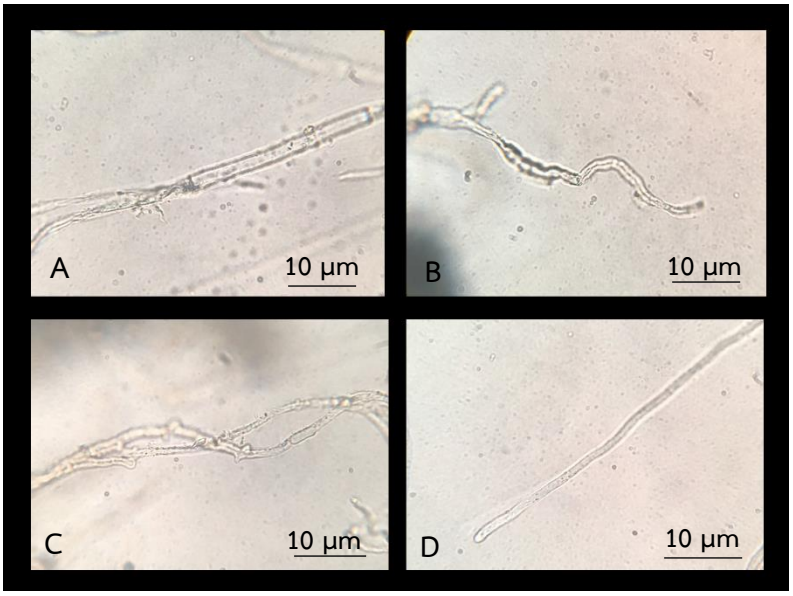


ภาพที่ 20 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่ทดสอบบนชิ้นส่วนพืช

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



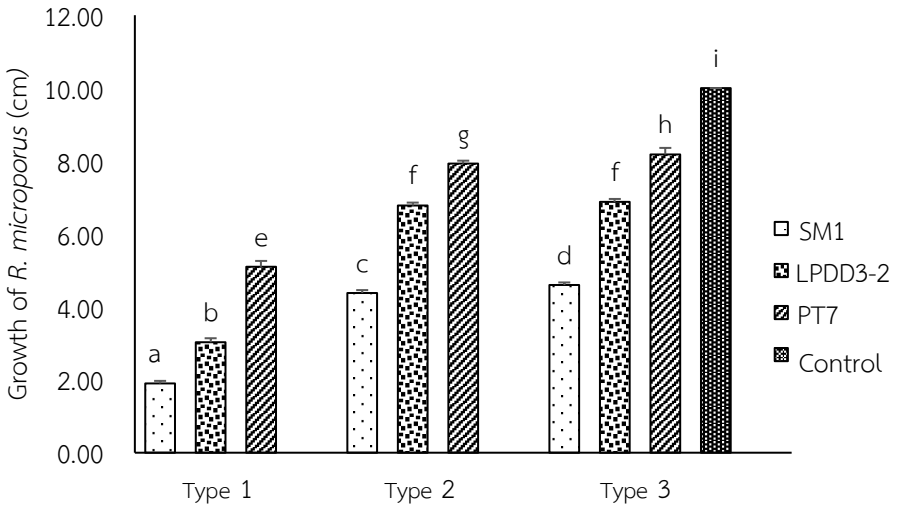
ภาพที่ 21 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* PT7 บนชิ้นส่วนพืช



ภาพที่ 22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (A) เซลล์ (B) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่ง (C) สารปฏิปักษ์ที่นึ่ง และ (D) ชุดควบคุม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

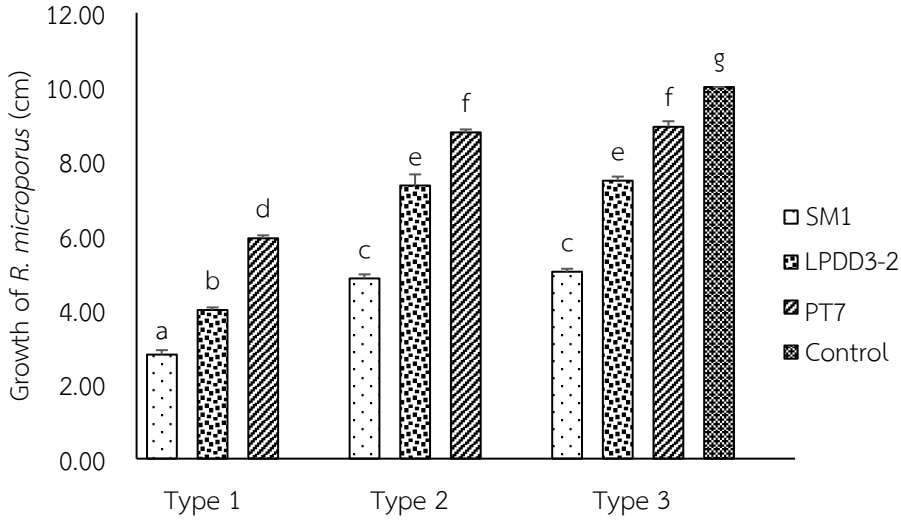
3.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่มีการราดแบคทีเรียตามลำดับชั้น 3 รูปแบบในดินผสม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งที่มีการราดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามลำดับชั้น 3 รูปแบบในดินผสมนั้น การราดเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 แบบที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด เชื้อราสามารถเจริญได้เพียง 1.90, 2.80 และ 4.35 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 23-25) โดยทำให้เส้นใยอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 26) รองลงมาคือ การราดเซลล์ สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งแบบที่ 1 ของ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 ที่เชื้อราสามารถเจริญได้ 3.03, 4.00 และ 5.48 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การราดด้วย *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ตามลำดับชั้นทั้ง 3 รูปแบบในดินผสมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่นๆ (ภาพที่ 23-25) ซึ่งจากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้น้อย จึงได้คัดเลือก *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ ไอโซเลท LPDD3-2 ไปใช้ทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง



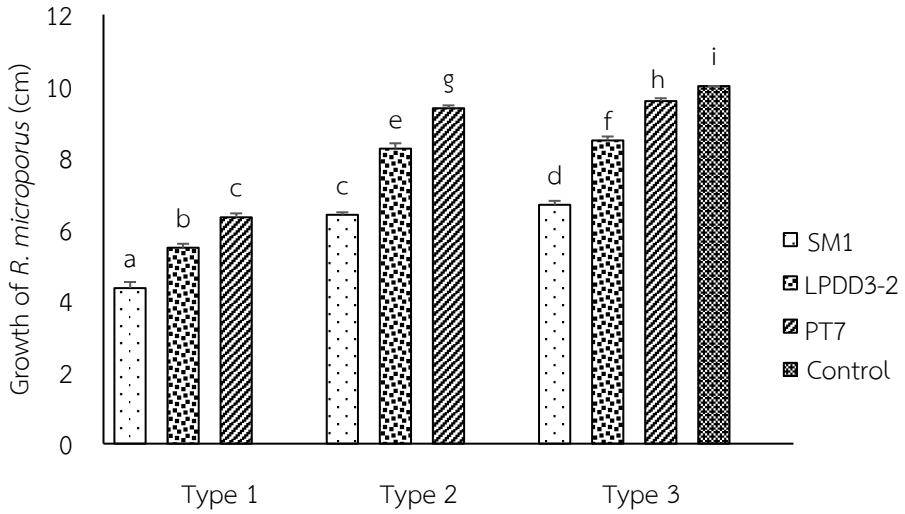
ภาพที่ 23 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับเซลล์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



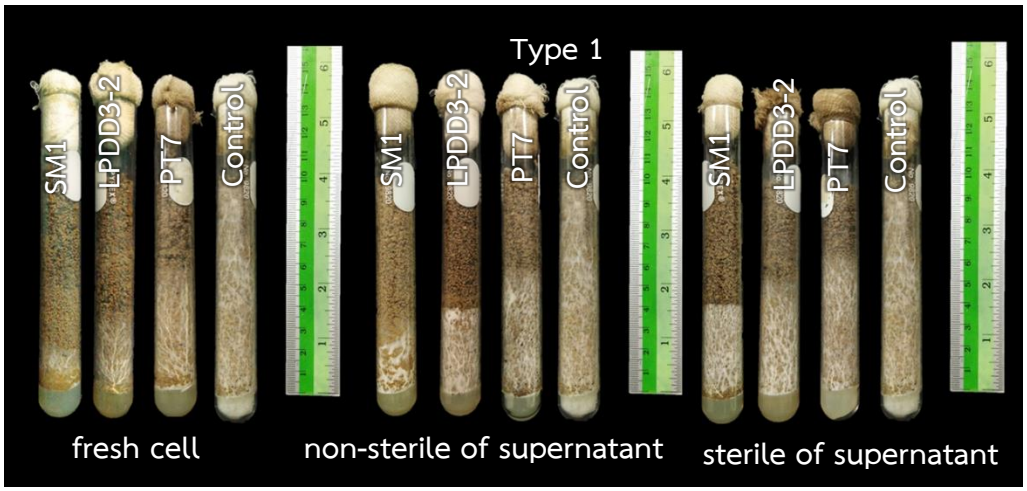
ภาพที่ 24 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับสารปฏิปักษ์ที่ไม่นิ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ

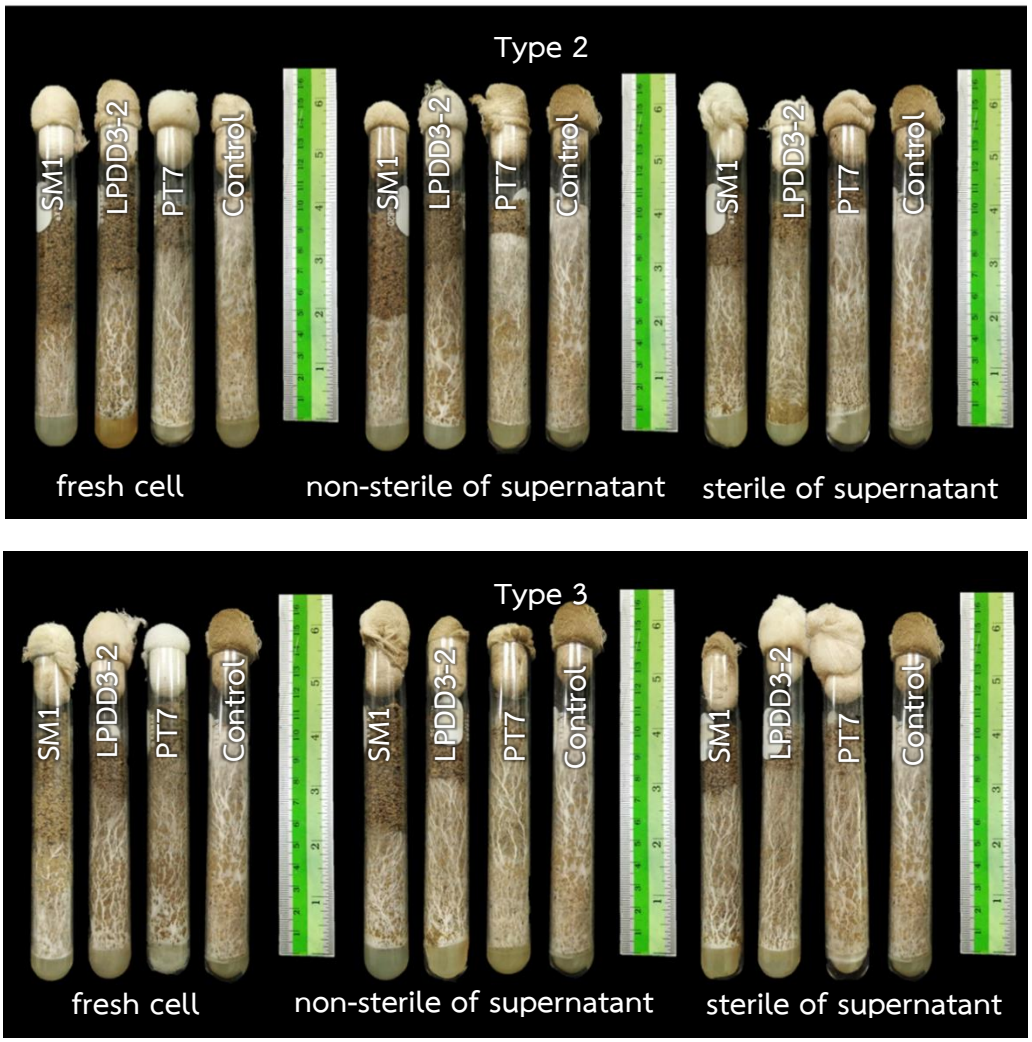
หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 25 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับสารปฏิปักษ์ที่นึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการราด 3 รูปแบบ

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; อักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์





ภาพที่ 26 การเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบกับเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมแบบต่างๆ

3.7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพโรงเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพโรงเรือนทดลอง กรรมวิธีที่ทดสอบโดย *B. subtilis* ทั้ง 2 ไอโซเลท (SM1 และ LPDD3-2) สามารถลดการเกิดโรครากขาวทั้งในส่วนเหนือดินและส่วนรากได้ไม่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีแนวโน้มในการลดการเกิดโรครากขาวได้สูงทั้งในส่วนเหนือดินและส่วนรากเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ โดยสามารถลดการเกิดโรครากขาวในส่วนเหนือ

ดินและส่วนรากได้ 72.22 และ 65.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) อีกทั้งยังทำให้การเจริญเติบโตของต้นยางพาราทางด้านความสูง (163. 53 เซนติเมตร) เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (13.28 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากและส่วนเหนือดินมีแนวโน้มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 5) โดยลักษณะใบส่วนใหญ่ยังคงเขียวอยู่ ใบล่างมีสีจางลง ใบเหลืองเล็กน้อย (ภาพที่ 27) ส่วนบริเวณรากมีเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เจริญได้เพียงเล็กน้อย รากส่วนใหญ่ยังคงปกติ รากฝอยถูกทำลายบางส่วน (ภาพที่ 28 และ 29 A) ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว ต้นยางสามารถเจริญเติบโตได้น้อย มีความสูงและเส้นรอบวงผ่าศูนย์กลางลำต้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (137.50 เซนติเมตร และ 10.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ) (ตารางที่ 4) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากและส่วนเหนือดินให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นน้ำหนักสดของรากที่ให้ผลไม่แตกต่างกัน (69.87 กรัม) (ตารางที่ 5) อีกทั้งกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว มีผลทำให้ต้นยางพาราแสดงอาการเกิดโรค โดยใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและขอบใบไหม้ (ภาพที่ 27) บริเวณรากถูกทำลายจนมีสีดำและฝ่อ และมีเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เกาะทั่วบริเวณราก (ภาพที่ 28 และ 29 D) เมื่อนำรากตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว มีลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เข้าไปเจริญอยู่ภายในเซลล์ของราก ในขณะที่กรรมวิธีที่ทดสอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีส่วนที่เคลื่อนไหวอยู่ภายในเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* จึงสันนิษฐานว่าเป็นเซลล์ของแบคทีเรียเคลื่อนไหวอยู่ภายในและบริเวณรอบๆเส้นใยเชื้อราทำให้เชื้อรา *R. microporus* เจริญอยู่ภายในเซลล์รากเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 30)

ตารางที่ 3 ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus*

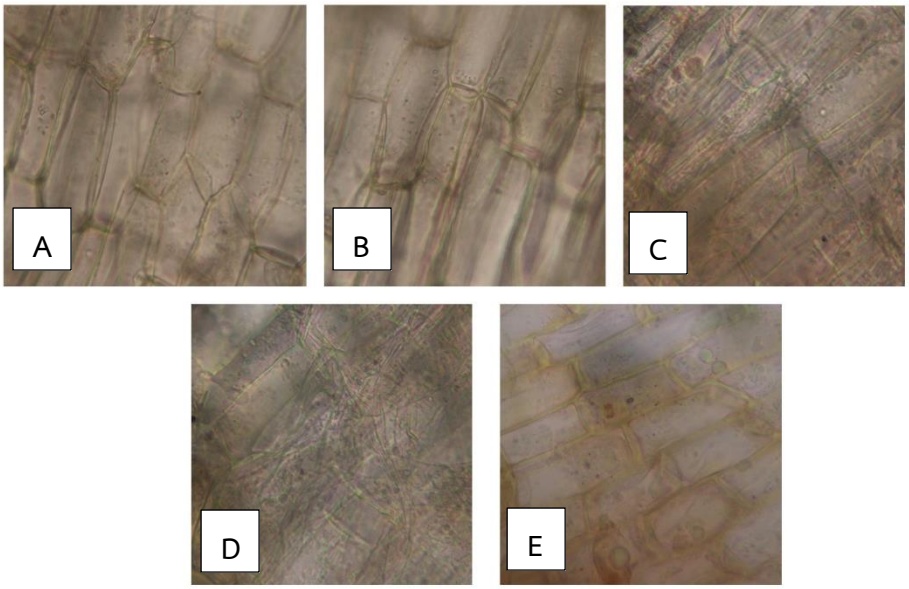
Treatment	Disease incidence (%)		Disease reduction (%)	
	aerial stem	root	aerial stem	root
R. microporus + *B. subtilis* isolate SM1	27.78 ± 6.42 c	34.78 ± 6.15 c	72.22 ± 6.92 a	65.22 ± 6.15 a
R. microporus + *B. subtilis* isolate LPDD3-2	30.56 ± 9.21 bc	41.30 ± 3.77 bc	69.44 ± 9.21 a	58.70 ± 3.77 ab
R. microporus + chemical	44.44 ± 7.86 b	47.83 ± 4.35 b	55.56 ± 7.86 b	52.17 ± 4.35 b
R. microporus	77.78 ± 7.86 a	93.78 ± 6.15 a	22.22 ± 7.86 c	6.52 ± 3.77 c
Control	-	-	-	-
F-test	*	*	*	*
C.V. (%)	19.78	9.80	16.27	11.66

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 27 ลักษณะต้นยางที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม

ภาพที่ 28 ลักษณะของรากที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม

ภาพที่ 29 ลักษณะรากของยางพาราที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) ชุดควบคุม



ภาพที่ 30 ลักษณะเซลล์รากของยางพาราที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* (A) ไอโซเลท SM1 (B) ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับสารเคมี (D) ใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว และ (E) เซลล์รากยางปกติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า

ตารางที่ 4 ความสูงของต้นยางพาราและเส้นรอบวงลำต้นหลังสิ้นสุดการทดลอง

Treatment	Heights (cm)	Diameters (mm)
R. microporus + *B. subtilis* SM1	163.53 ± 14.16 a	13.28 ± 0.42 a
R. microporus + *B. subtilis* LPDD3-2	156.50 ± 2.50 a	12.88 ± 0.14 a
R. microporus + chemical	152.98 ± 6.10 a	12.03 ± 0.35 b
R. microporus	137.50 ± 9.01 b	10.26 ± 0.69 c
Control	161.63 ± 1.08 a	13.04 ± 0.37 a
F-test	*	*
C.V. (%)	6.04	4.39

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง

Treatment	Fresh and dry weights (g)			Dry weights (g)		
	root	stem	leaf	root	stem	leaf
R. microporus + *B. subtilis* SM1	99.05 ± 10.19 a	73.26 ± 2.89 a	45.80 ± 9.93 a	49.04 ± 3.44 a	16.01 ± 0.26 a	27.02 ± 3.07 a
R. microporus + *B. subtilis* LPDD3-2	88.63 ± 22.94 ab	70.98 ± 4.25 a	40.08 ± 11.97 ab	43.01 ± 10.20 ab	15.16 ± 0.66 ab	24.03 ± 4.84 ab
R. microporus + chemical	81.00 ± 2.13 ab	65.31 ± 9.46 ab	34.01 ± 3.38 ab	40.17 ± 8.68 ab	14.10 ± 0.77 b	22.12 ± 4.05 ab
R. microporus	69.87 ± 16.12 b	59.91 ± 5.88 b	25.99 ± 2.87 b	32.72 ± 8.05 b	12.89 ± 0.78 c	17.85 ± 1.88 b
Control	98.11 ± 17.79 ab	71.93 ± 2.58 a	44.48 ± 12.43 a	48.89 ± 9.36 a	15.22 ± 0.52 ab	26.75 ± 7.38 a
F-test	*	*	*	*	*	*
C.V. (%)	9.88	9.43	27.66	5.33	4.95	22.71

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดินก่อนและหลังปลูก และความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพารา

จากการวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินก่อนปลูกมีค่าพีเอชอยู่ในระดับปานกลาง (5.35) ปริมาณอินทรียวัตถุ 5.20 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.29 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เท่ากับ 9.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เท่ากับ 0.03 เซนติโมลต่อกิโลกรัม ซึ่งธาตุอาหารส่วนใหญ่อยู่ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับระดับของธาตุอาหารที่เหมาะสมในดินปลูกยางพารา (นุชนารถ, 2554) (ตารางที่ 6) เมื่อสิ้นสุดการทดลองทุกกรรมวิธีที่ทดสอบมีแนวโน้มทำให้ค่าพีเอช ปริมาณอินทรียวัตถุ และปริมาณธาตุอาหารเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับดินก่อนปลูก โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ที่ปริมาณอินทรียวัตถุและปริมาณธาตุอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.59 ปริมาณอินทรียวัตถุเท่ากับ 9.01 กรัมต่อกิโลกรัม ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เท่ากับ 0.41 กรัมต่อกิโลกรัม 16.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.18 เซนติโมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ทดสอบโดยใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว ปริมาณธาตุอาหารมีแนวโน้มน้อยลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่ปริมาณอินทรียวัตถุที่มีแนวโน้มสูงกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 สมบัติบางประการของดินก่อนการทดลอง

Parameter	Analytical value	Optimum lavel (นุชนารถ, 2554)	Interpretation
pH (1 : 5)	5.35	4.5-5.5	moderate
organic matter (g kg^{-1})	5.20	10-25	low
Total N (g kg^{-1})	0.29	1.1-2.5	low
Avai. P (mg kg^{-1})	9.61	11-30	low
Exch. K ($cmol_c$ kg^{-1})	0.03	0.10-0.15	low

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุอาหารในดินที่ปลูกยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง

Treatment	pH (1:5)	Organic matter (g kg^{-1})	Total N (g kg^{-1})	Avai. P (mg kg^{-1})	Exch. K ($cmol_c$ kg^{-1})
R. microporus + *B. subtilis* SM1	5.59 ± 0.08 a	9.01 ± 0.90 a	0.41 ± 0.03 a	16.45 ± 2.48 a	0.18 ± 0.02
R. microporus + *B. subtilis* LPDD3-2	5.48 ± 0.08 ab	8.71 ± 0.87 ab	0.39 ± 0.01 a	15.34 ± 1.79 ab	0.18 ± 0.01
R. microporus + chemical	5.53 ± 0.05 ab	8.11 ± 0.81 ab	0.40 ± 0.05 a	15.38 ± 2.58 ab	0.19 ± 0.01
R. microporus	5.39 ± 0.08 b	6.61 ± 0.66 bc	0.30 ± 0.05 b	11.53 ± 0.91 b	0.17 ± 0.02
Control	5.53 ± 0.08 ab	5.84 ± 0.58 b	0.40 ± 0.02 a	13.78 ± 3.57 ab	0.18 ± 0.02
F-test	*	*	*	*	NS
C.V. (%)	1.52	18.50	11.83	19.37	0.00

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ และ NS= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ส่วนความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง พบว่า กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง (35.36 กรัมต่อกิโลกรัม) และความเข้มข้นของฟอสฟอรัสมีแนวโน้มสูงด้วยเช่นกัน (1.85 กรัมต่อกิโลกรัม) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และชุดควบคุม ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 30.18 และ 30.80 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และความเข้มข้นของธาตุฟอสฟอรัสเท่ากับ 1.75 และ 1.77 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของโพแทสเซียม กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีแนวโน้มทำให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมสูงสุด (10.46 กรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพาราหลังสิ้นสุดการทดลอง

Treatment	N	P	K
		($g\ kg^{-1}$)	
R. microporus + *B. subtilis* SM1	30.18 ± 1.37 ab	1.75 ± 0.04 a	10.46 ± 1.94 a
R. microporus + *B. subtilis* LPDD3-2	35.36 ± 6.51 a	1.85 ± 0.08 a	8.14 ± 1.08 ab
R. microporus + chemical	28.05 ± 3.66 b	1.56 ± 0.04 b	8.49 ± 0.90 ab
R. microporus	27.77 ± 2.30 b	1.74 ± 0.09 a	7.98 ± 0.33 b
Control	30.80 ± 0.48 ab	1.77 ± 0.08 a	8.98 ± 1.49 ab
F-test	*	*	*
C.V. (%)	14.03	4.82	16.66

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus*

แบคทีเรียที่คัดเลือกจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดินทั้ง 44 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินทั้งหมด บางไอโซเลทมาจากพื้นที่เดียวกัน และบางไอโซเลทมาจากคนละพื้นที่กัน ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทแม้มาจากพื้นที่เดียวกัน แต่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่แตกต่างกัน เช่นแบคทีเรียที่ได้จากดินในจังหวัดลำพูนที่บางไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท LPDD10-1, LPDD9-13, LPDD9-12, LPDD9-6 และ LPDD3-3) โดยเส้นใยเชื้อรามีการเจริญผ่านแนวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ บางไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อราได้ตั้งแต่ 26-50 เปอร์เซ็นต์ (ไอโซเลท LPDD9-9, LPDD9-17, LPDD10-3, LPDD10-4) (ตารางที่ 1) ทำให้เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่นเมื่อเจริญเข้าใกล้แบคทีเรียปฏิปักษ์ และบางไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ตั้งแต่ 51 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (ไอโซเลท LPDD3-2) โดยทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญผ่านแนวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ (ภาพที่ 4) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าในสภาพพื้นที่เดียวกัน มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีคุณลักษณะที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ประกอบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 (ได้จากดินในพื้นที่ปลูกพืชสวนครัวในจังหวัดสงขลา) LPDD3-2 (ได้จากดินในพื้นที่ปลูกพืชทั่วไปในจังหวัดลำพูน) และ PT7 (ได้จากดินในพื้นที่ปลูกยางพาราในจังหวัดพัทลุง) โดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 มีลักษณะโคโลนีคล้ายกันเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ขีดเชื้อ สีขุ่นไม่ขึ้นเงา ขอบเกลี้ยงไม่มีรอยเว้า ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นแผ่นบาง ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7 โคโลนีเจริญกระจัดกระจายตามแนวที่ขีดเชื้อ สีขุ่นทึบ รูปร่างกลมและนูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีเรียบมันวาว และมีความหนืด (ภาพที่ 5)

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 ทดสอบด้วยวิธี dual culture plate ซ้ำอีกครั้งที่เวลา 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีทุกช่วงเวลาที่ทดสอบ โดยเฉพาะที่เวลา 7 วัน สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 66.43 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6) โดยแบคทีเรียมีการแข่งขัน (competition) และครอบครองพื้นที่ได้ดี ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งระหว่างเชื้อรากับแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งการเกิดบริเวณยับยั้งอาจเนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์มีการปลดปล่อยสารบางอย่างที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปใน

อาหารได้ ซึ่งสารที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ปล่อยออกมามีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา (สุชล, 2539) ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตหรืออาศัยบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ได้ โดยสังเกตได้จากการมีบริเวณยับยั้งที่กว้าง (ภาพที่ 7) อีกทั้งยังมีผลทำให้เส้นใยเชื้อราที่เจริญร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์มีลักษณะบิดเบี้ยวและกุดลง เมื่อตรวจลักษณะโครงสร้างภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (ภาพที่ 8)

2. การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธีการวิเคราะห์ 16S rDNA

จากการระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสนั้น แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท (SM1, LPDD3-2 และ PT7) เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 เป็นแบคทีเรีย *B. subtilis* ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7 เป็นแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (ภาพที่ 9 และตารางที่ 2) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและมีทั่วไปในดิน (Madika *et al*., 2017) มีการสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อความเครียดที่มาจากปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางชีวภาพได้ ทำให้อาศัยอยู่ได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งได้มีรายงานการนำแบคทีเรีย *B. subtilis* และแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* มาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด โดยแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea, Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบไหม้และกาบใบแห้งของข้าวได้ (Leelasuphakul *et al*., 2006; Ku Asmah and Sapak, 2020) ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของแตงกวา และโรคเหี่ยวของแตงกวา แตงโม และแตงไทย (Al-Tuwaigri, 2008; Cao *et al.,* 2011) เชื้อรา *Penicillium digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าของผลส้ม (Leelasuphakul *et al*., 2008) และเชื้อรา *Helminthosporium* spp., *Alternaria* spp. เชื้อสาเหตุโรคของมะเขือเทศ (Matar *et al*., 2009) ส่วนแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา (Xu *et al*., 2014) ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum lagenarium* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของแตงโม (Kim and Chung, 2004) นอกจากแบคทีเรีย *B. subtilis* และแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* แล้วยังมี *Bacillus* spp. ชนิดอื่นที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อีกหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย *B. pumilus* W1L1 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* (Thonglem *et al.,* 2007) แบคทีเรีย *B. siamensis* S3 และ *B. tequilensis* S5 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis versicolor* ได้ (Ali *et al*., 2020)

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate และวิธี agar well diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี pour plate เป็นวิธีที่แบคทีเรียมีการปลดปล่อยสารปฏิปักษ์ออกมาสัมผัสกับเชื้อราโดยตรง ในขณะที่การยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion เป็นวิธีที่เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแก่งแย่งพื้นที่ในการเจริญ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การทดสอบด้วยวิธี pour plate ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าวิธี agar well diffusion โดยที่แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีทั้ง 2 วิธีที่ทดสอบสามารถสร้างสารปฏิปักษ์ออกมายับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ถึง 96.67 เปอร์เซ็นต์ (วิธี pour plate) (ภาพที่ 10) และ 66.00 เปอร์เซ็นต์ (วิธี agar well diffusion) (ภาพที่ 14) ในขณะที่สารปฏิปักษ์ของ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อย เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเชื้อใช้เวลานาน เชื้อเจริญเติบโตช้า โคโลนีมีลักษณะหนืด เป็นเมือก การกรองแยกเซลล์ใช้เวลานาน ทำให้ได้ปริมาณเชื้อน้อย และมีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย ซึ่งบ่งบอกได้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่คนละชนิดมีความสามารถยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างกัน นอกจากนี้สารปฏิปักษ์ที่ทนความร้อนของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี แม้ผ่านความร้อนที่สูงถึง 121 องศาเซลเซียส บ่งบอกได้ว่าแม้ในสภาวะที่อุณหภูมิในธรรมชาติสูงขึ้น *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ก็ยังสามารถอาศัยหรือเจริญอยู่ได้ ซึ่งเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรครากขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสอดคล้องกับสารปฏิปักษ์ที่ไม่ทนและทนความร้อนของ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-1 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดได้ (Rotniam *et al.*, 2008) และสารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium*, *B. pumilus* และ *B. firmus* ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว (Pengnoo *et al.*, 2000) และโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Chumthong *et al.*, 2008; Pengnoo *et al.*, 2006)

ซึ่งการสร้างสารปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีผลทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบางและอัดตัวกันแน่น ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 11) เป็นสิ่งที่แสดงได้ว่า *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถทำลายเชื้อรา *R. microporus* ได้อย่างแท้จริง เมื่อเทียบกับการแก่งแย่งพื้นที่ในการเจริญระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา (ภาพที่ 15) เมื่อตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียตรวจลักษณะโครงสร้างภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีเซลล์ของแบคทีเรียเกาะติดบริเวณผิวของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ทำให้เกิดรอยย่นบนพื้นผิว และเป็นรู เนื่องจากแบคทีเรียอาจปลดปล่อยสารออกมาที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. microporus* ได้ ทำให้เส้นใยฝ่อและมีลักษณะผิดรูปอย่างชัดเจน (ภาพที่ 13) ซึ่งลักษณะดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับลักษณะเส้นใยที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา

ที่ทำให้เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยว ผิดรูป และกุดตัวลง (ภาพที่ 12) เช่นเดียวกับ *B. subtilis* ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Alternaria alternata, Macrophomina sp., Sclerotium rolfesii*, และ *F. oxysporum* เกิดอาการบวม เยื่อหุ้มเซลล์แตก เส้นใยเล็กลงและบิดเบี้ยว (Ashwini and Srividya, 2014; Abdelmoteleb *et al*., 2017; Khan *et al*., 2018) และ *B. amyloliquefaciens* ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โค้งงอ เยื่อหุ้มเซลล์แตก (Rahman *et al*., 2016) และเส้นใยของ *Magnaporthe oryzae* มีการหดตัว บิดเบี้ยวบางส่วน พื้นผิวเส้นใยหยาบ กลวง และมีรอยย่น (Sha *et al*., 2020) สำหรับสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตออกมาเป็นสารที่มีส่วนประกอบเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น สารปฏิชีวนะที่สามารถย่อยแป้งได้ อาจเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม **α**-amylasebacilysocin (Chumthong, 2009) bacillomycin D, bacillomycin, fengycin, iturin, surfactin (Cho *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2016; Zalila-Kolsi *et al.*, 2016) gramicidin, tyrocidine, bacitracin, subtilin, mycobacillin, bacilysin (Mannanov and Sattarova, 2001) iturin A, tasA, mersacidin (Chen *et al.*, 2016; Zho *et al.*, 2020) macrolactin, bacillaene (chen, *et al.*, 2018) และ bacilysocin (Tamehiro *et al.*, 2002)

4. ประสิทธิภาพของสารระเหยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

กลไกในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* นอกจากการทำลายโดยการปลดปล่อยสารปฏิปักษ์ออกมาสัมผัสกับเชื้อราโดยตรงและการแก่งแย่งพื้นที่ในการเจริญแล้ว การสร้างสารระเหย (volatile substances) ของแบคทีเรียยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยสารระเหยที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตและปลดปล่อยออกมาประกอบด้วย hydrocarbons, ketones, alcohols, aldehydes, ester, acids, aromatics, สารประกอบที่มี sulfur and nitrogen เป็นหลัก (Kai, 2020) 2-tridecanone, pyrazine (2, 5-dimethyl), benzothiazole, phenol (4-chloro-3-methyl) (Gao *et al.*, 2017) dimethylsulfoxide, 1-butanol, and 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) (Lim *et al.*, 2017) โดยที่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถปลดปล่อยสารระเหยออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ (50 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 17) ทำให้เส้นใยมีลักษณะบาง สามารถเจริญได้น้อย (ภาพที่ 18) อีกทั้งทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะบิดเบี้ยว โป่งพองบริเวณปลายเส้นใย และกุดตัวลงเช่นกัน เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (ภาพที่ 19) แสดงว่าในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากขาวของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ไม่ได้มีเพียงแค่การเจาะทำลายเส้นใย แต่การปลดปล่อยสารระเหยของแบคทีเรียยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี โดยสารระเหยที่แบคทีเรียปลดปล่อยออกมาสามารถแพร่กระจายได้ในระยะไกล ทำให้เชื้อรา *R. microporus* ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ในบริเวณที่มีสารระเหย และถึงแม้เส้นใยอาจ

สามารถเจริญไปได้ แต่เส้นใยของเชื้อราหรือส่วนขยายพันธุ์อาจผิดปกติ ซึ่งเป็นข้อดีในการนำแบคทีเรียไปใช้ควบคุมโรคโดยที่แบคทีเรียไม่จำเป็นต้องสัมผัสกับเชื้อราโดยตรงก็สามารถสร้างสารระเหยแพร่กระจายไปในดิน ทำให้ส่งเสริมการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับสารระเหยจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *S. sclerotiorum* ทำให้เกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและลดการผลิต sclerotoid ของเชื้อรา (Liu *et al*., 2008) สารระเหยของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Monilinia Fracticola* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ได้ดี (Ramyabharathi and Thiruvengadam, 2014; Gao *et al*., 2017) และสารระเหยของ *B. amyloliquefaciens* ที่ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* (Yuan *et al*., 2012; Wu *et al*., 2019)

5. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืช และในดินผสม

เชื้อรา *R. microporus* เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน เข้าทำลายต้นยางบริเวณรากและลำต้นโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส ย่อยสลายเนื้อไม้ (Nandris *et al*., 1987) จึงได้จำลองสภาพแวดล้อมให้มีสภาพใกล้เคียงกับธรรมชาติ โดยทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* บนชิ้นส่วนพืชและในดินผสม โดยที่เชื้อรา *R. microporus* ใช้เวลา 9 วัน ในการเจริญเต็มท่อนยาง (100 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เวลา 9 วัน การใช้ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ทำให้เชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้เพียง 28.57-64.30 เปอร์เซ็นต์ของท่อนยาง ซึ่งการที่เชื้อราสามารถเจริญขึ้นไปได้นั้นเนื่องจากเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีการเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารก่อนแล้วจึงนำมาทดสอบ ประกอบกับเชื้อราสาเหตุโรคมีอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ทำให้สามารถเจริญขึ้นไปได้บนท่อนยาง แต่เมื่อเชื้อรา *R. microporus* มีการสัมผัสกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ทำให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น (ภาพที่ 21) อีกทั้งยังส่งผลทำให้เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยวเมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (ภาพที่ 22) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี pour plate ที่เชื้อรา *R. microporus* มีการสัมผัสกับแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้วทำให้เส้นใยเป็นรู เกิดรอยย่นบนพื้นผิว (ภาพที่ 13) ทำให้เส้นใยไม่สามารถเจริญต่อไปได้และมีลักษณะผิดปกติ นอกจาก *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี เมื่อทดสอบโดยวิธีจุ่มไม้ยางพารา เช่น แบคทีเรียไอโซเลท BT3, F5/1, SB8, SB9 (Noran *et al*., 2015) และจุลินทรีย์ *Pseudomonas umsongensis* (Maiden *et al*., 2017)

สำหรับในสภาวะที่เป็นดินผสมเชื้อรา *R. microporus* ใช้เวลา 13 วัน ในการเจริญเต็มความสูงของดิน (100 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เวลา 13 วัน การราด *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 แบบที่

1 ทำให้เชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญได้เพียง 19-43.50 เปอร์เซ็นต์ของความสูงดินผสม ซึ่งการราดแบคทีเรียในแบบที่ 1 เป็นวิธีที่มีการราดแบคทีเรียสัมผัสกับบริเวณที่เส้นใยเชื้อราเจริญอยู่หน้าอาหาร PDA โดยตรง ทำให้สามารถควบคุมการเจริญเชื้อรา *R. microporus* ได้ ซึ่งการที่เชื้อราสามารถเจริญขึ้นไปได้นั้นเนื่องจากเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีการเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารก่อนแล้วจึงนำมาทดสอบ ประกอบกับเชื้อราสาเหตุโรคมีอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ทำให้สามารถเจริญขึ้นไปได้เช่นเดียวกับการทดสอบบนท่อนยาง แต่เมื่อมีการราดแบคทีเรียซ้ำอีกครั้งนั้นทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 26) ซึ่งจากการทดสอบทั้ง 2 วิธีแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีแม้ทดสอบบนชิ้นส่วนพืชและในดินผสม ซึ่งเป็นข้อดีในการนำไปใช้ประโยชน์ คือ ถึงแม้ในดินสวนยางพาราของเกษตรกรมีเชื้อรารากขาวเข้าทำลายหรือเจริญอยู่ก่อนแล้ว *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ก็ยังสามารถเข้าไปเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราได้ และควรมีการราดแบคทีเรียซ้ำเพื่อให้การควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ของแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

6. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพโรงเรือนทดลอง

ในพื้นที่ปลูกยางพาราโดยส่วนใหญ่มักประสบกับปัญหาการเข้าระบาดของโรครากขาวที่เกิดจากเชื้อรา *R. microporus* โดยเชื้อระบาดและแพร่กระจายไปหลายพื้นที่หลายจังหวัด โดยการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microporus* จะส่งผลทำให้ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขอบใบไหม้ บริเวณรากถูกทำลาย สำหรับต้นยางที่นำมาใช้ทดสอบเป็นต้นยางที่มาจากการเพาะเมล็ด เนื่องจากในการทดลองเป็นการทดสอบระบบรากของยางพารา ดังนั้นวิธีการเพาะเมล็ดจึงทำให้ได้ต้นยางที่มีระบบรากสมบูรณ์สม่ำเสมอกัน ซึ่งต่างจากต้นยางที่มาจากการติดตาที่ระบบรากอาจจะไม่สม่ำเสมอกัน สำหรับดินที่นำมาใช้ทดสอบเมื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีก่อนการทดลองนั้น ดินมีธาตุอาหารที่ไม่เพียงพอต่อการปลูกยางพารา จึงมีการใส่ปุ๋ยสูตร 20-8-20 อัตรา 130 กรัมต่อต้น จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้ได้ต้นกล้ายางพาราที่มีคุณภาพดี และไม่แสดงอาการขาดธาตุอาหารให้ปรากฏ ซึ่งปุ๋ยสูตรนี้เป็นสูตรที่สถาบันวิจัยยางแนะนำสำหรับยางพาราก่อนเปิดกรีด (นุชนารถ, 2554) และเกษตรกรโดยส่วนใหญ่มีการใส่ปุ๋ย 2 ครั้งต่อปี สำหรับต้นยางที่คัดเลือกมาทดสอบเป็นต้นยางที่สมบูรณ์มีขนาดสม่ำเสมออายุ 1 ปี มีระบบรากที่สมบูรณ์ และไม่แสดงอาการขาดธาตุ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* มี 2 ไอโซเลท คือ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ ไอโซเลท LPDD3-2 ซึ่งมีคุณสมบัติเจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงได้ง่าย และเจริญได้ดีในอาหาร PDB ซึ่งเป็นข้อดีในแง่ของการนำมาใช้ควบคุมเชื้อรากขาว ในการทดสอบได้มีการใส่เชื้อรา *R. microporus* ลงไปก่อน เพื่อให้เชื้อรา *R. microporus* เข้าไปเจริญอยู่ภายในราก ครอบครองพื้นที่บริเวณราก และเข้าทำลายต้นยางพารา

แล้วจึงราดแบคทีเรียหรือสารเคมีลงไป ซึ่งการใส่เชื้อรา *R. microporus* ลงไปในดินก่อนการทดลองเปรียบเสมือนปัญหาในปัจจุบันที่เชื้อรารากขาวมีการปนเปื้อนอยู่ในดิน ทำให้การแพร่ระบาดของโรคกระจายไปยังพื้นที่ต่างๆได้ง่าย ในการสังเกตอาการการเกิดโรค โดยส่วนใหญ่จะสังเกตจากส่วนเหนือดิน โดยสังเกตจากลักษณะใบและอาการที่น้ำยางไม่ออก ซึ่งลักษณะอาการเช่นนี้โดยส่วนใหญ่จะเข้าสู่ระยะที่ไม่สามารถควบคุมเชื้อรารากขาวได้ สำหรับเกณฑ์ประเมินการเกิดโรคโดยส่วนใหญ่ให้เกณฑ์ประเมินการเกิดโรคแค่ในส่วนเหนือดิน ซึ่งกว่าที่ส่วนเหนือดินจะแสดงอาการเกิดโรค บริเวณรากอาจถูกทำลายหมดแล้ว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ตั้งเกณฑ์ประเมินการเกิดโรคที่รากขึ้นมา ซึ่งจากการประเมินการเกิดโรคก็ทำให้เห็นความแตกต่างคือ อาการที่เกิดขึ้นในส่วนเหนือดินกับส่วนรากไม่ได้สัมพันธ์กัน

โดยการใส่เชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว มีผลทำให้ต้นยางแสดงอาการเกิดโรคที่ใบล่าง ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขอบใบไหม้ (ภาพที่ 27 D) ในขณะที่บริเวณรากถูกทำลายจนทำให้รากมีสีดำ ฝ่อ เปื่อยยุ่ย และมีเส้นใยเชื้อราเกาะบริเวณราก (ภาพที่ 28 และ 29 D) รากถูกทำลายโดยเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เข้าไปเจริญอยู่ภายในราก (ภาพที่ 30 D) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายรากโดยไรโซมอฟเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (infectious hyphae) เมื่อเส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืช ก็จะมีการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อน้ำท่ออาหาร ส่งผลให้การดูดใช้ธาตุอาหารของพืชลดลง (Nicole and Benhamou, 1991) ซึ่งลักษณะดังกล่าวบ่งบอกได้ว่าแม้ส่วนเหนือดินยังแสดงอาการเกิดโรคไม่มาก แต่บริเวณรากถูกทำลายอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นการยากในการควบคุมเพื่อให้ต้นยางกลับมาสมบูรณ์ดังเดิม ดังนั้นในการป้องกันและควบคุมโรครากขาว ควรมีการป้องกันและฟื้นฟูระบบรากไปพร้อมกัน ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรครากขาวได้ โดยจุลินทรีย์ที่ดีจะต้องมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค และส่งเสริมการเจริญของรากได้ด้วย

อย่างไรก็ตาม *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุมและส่งเสริมการเจริญของรากได้ โดยที่การราด *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microporus* ภายในรากและบริเวณรากของยางพาราได้เป็นอย่างดี ทำให้รากส่วนใหญ่ยังคงปกติ ปริมาณรากเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 28 และ 29 A) ภายในรากมีลักษณะของเซลล์แบคทีเรียเจริญอยู่ภายในราก ทำให้เชื้อราสามารถเจริญภายในรากเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 30 A) แสดงว่า *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังสามารถเข้าไปเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราได้ โดยการสร้างสารปฏิปักษ์และสารระเหยที่ทนและไม่ทนความร้อน ครอบครองพื้นที่ได้ดี นอกจากนี้ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 อาจสามารถสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญ หรือสารกระตุ้นการเจริญเติบโต indole acetic acid (IAA) ของยางพาราออกมาได้ ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มออกซินที่มีบทบาทในการยืดยาวของราก (San-Francisco *et al.*, 2005) สามารถส่งเสริมให้รากของยางพารามีการขยายได้มากขึ้น

สอดคล้องกับแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *P. fluorescens* ที่สามารถผลิตสาร IAA ทำให้ความยาวราก ความยาวยอด และน้ำหนักแห้งบนเมล็ดพันธุ์หอมหัวใหญ่เพิ่มขึ้น (Reetha *et al.*, 2014) นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ต้นยางมีกลไกในการป้องกันตัวด้วยประกอบกับ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรารากขาวได้ ทำให้การเข้าทำลายของโรคเป็นไปได้ยากขึ้น ส่งผลทำให้ต้นยางเจริญเติบโตดี ส่วนเหนือดินยังคงปกติ ใบส่วนใหญ่มีสีเขียว มีเฉพาะใบล่างที่เหลืองเล็กน้อย (ภาพที่ 27 A)

เมื่อวิเคราะห์ดินหลังสิ้นสุดการทดลองนั้น ทุกกรรมวิธีมีค่าพีเอช ปริมาณอินทรียวัตถุ และปริมาณธาตุอาหารเพิ่มขึ้นจากดินก่อนทดลอง โดยที่การราด *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ค่าพีเอช ปริมาณอินทรียวัตถุ และปริมาณธาตุอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แต่จะเห็นได้ว่าในชุดควบคุมมีปริมาณอินทรียวัตถุน้อยกว่ากรรมวิธีอื่นๆ (ตารางที่ 7) เนื่องจากกรรมวิธีอื่นๆมีการใส่หัวเชื้อรากขาวที่ทำจากข้าวฟ่างลงไป จึงทำให้มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ข้าวฟ่างลงไป นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *R. microporus* หรือ *B. subtilis* มีการย่อยวัสดุอินทรีย์ที่มีอยู่ในดินทำให้กรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อรา *R. microporus* หรือ *B. subtilis* มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงกว่าชุดควบคุม แต่ไม่ได้มีผลกระทบต่อปริมาณธาตุอาหารและการเจริญเติบโตของยางพารา สำหรับความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบนั้น จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของธาตุฟอสฟอรัสอยู่ระดับที่ต่ำ อาจเนื่องจากฟอสฟอรัสถูกตรึงเอาไว้โดยแมงกานีส เหล็ก และอะลูมินัม ทำให้ยางพาราดูดใช้ได้น้อย แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าในกรรมวิธีที่ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบมีอยู่สูง ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหลืออยู่ในดินก็มีอยู่สูง ในขณะที่ในกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เหลืออยู่ในดินมีอยู่มาก แต่ยางพาราสามารถดูดใช้น้อย ส่วนในกรรมวิธีชุดควบคุมมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เหลืออยู่ในดินอยู่น้อย แต่ยางพาราสามารถดูดใช้ได้มาก (ตารางที่ 7 และ 8) แสดงว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ออกมาได้ ทำให้เพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน เมื่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินมากขึ้น ยางพาราก็สามารถดูดใช้ฟอสฟอรัสได้มากขึ้นได้เช่นเดียวกัน โดยมีรายงานการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในรูปต่างๆ ได้ เช่น *Burkholderia* sp., *Acidocella* sp., *Acidiphilium* sp. และ *Ustilago* sp. ที่สามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมฟอสเฟตได้ (Pengnoo *et al.,* 2007) ในขณะที่ *Ustilago* sp. สามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของไฟเทต (Pengnoo *et al.,* 2005) ส่วน *Bacillus* spp. ไอโซเลท 141F1 สามารถละลายอะลูมินัมฟอสเฟต เหล็กฟอสเฟต และไฟเทตได้ 5.30, 4.57 และ 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ขนบพร และอัจฉรา, 2558)

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนทดลอง สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในเบื้องต้นได้ 3 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, LPDD3-2 และ PT7 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 เป็น *B. subtilis* ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PT7 เป็น *B. amyloliquefaciens*

2. *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี โดยการสร้างสารปฏิปักษ์และสารระเหยที่ทนและไม่ทนความร้อนออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีทั้งบนอาหาร PDA บนชิ้นส่วนพืช และในดินผสม โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ถึง 96.67 เปอร์เซ็นต์ ในวิธี pour plate ทำให้เส้นใยมีลักษณะบิดเบี้ยวและกุดตัวลง อีกทั้งมีผลทำให้เส้นใยฝ่อและเกิดรอยย่นบนพื้นผิว

3. การใช้ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้ดีกว่าการใช้สารเคมี ช่วยส่งเสริมการเจริญของยางพาราทำให้ปริมาณรากเพิ่มขึ้น อีกทั้งทำให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบสูง ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหลืออยู่ในดินสูง และทำให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมสูงด้วยเช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

B. subtilis ไอโซเลท SM1 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือนทดลอง จึงควรมีการศึกษาพัฒนาต่อเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา สะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น และลดการใช้สารเคมี นอกจากนี้ควรศึกษาต่อในเรื่องของความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการละลายฟอสฟอสฟอรัสในรูปต่างๆ และการจัดการธาตุอาหารร่วมกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา

เอกสารอ้างอิง

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินุวัฒน์. 2559. ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* สูตรผงและสูตรน้ำในการผลิตผักกาดฮ่องเต้. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 641-660.

กุศล ถมมา และพิศาล ศิริธร. 2556. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B076 เพื่อการเคลือบเมล็ดและพ่นทางใบ เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. วารสารแก่นเกษตร 41: 339-345.

ขนบพร พงศ์พรหม และอัจฉรา เพ็งหนู. 2558. ผลของ *Bacillus* spp. ต่อการเจริญของไรโซเบียมและการละลายฟอสเฟต. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 32: 10-20.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542. พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ, ถนิมนันต์ เจนอักษร และพรหมมาศ คูหากาญจน์. 2554. การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 16: 22-31.

จินตนา ต๊ะย่วน, เกียรติศักดิ์ ราชัยสวรรค์ และสุขุมาภรณ์ ศรีเผด็จ. 2559. การควบคุมเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคใบไหม้ข้าว. วารสารแก่นเกษตร 44: 972-976.

จิระ สุวรรณประเสริฐ, อัจฉรา เพ็งหนู, สะฝีหย๊ะ ราชนุ, เพื่อม วุ้นซิ้ว, พธู จันทร์ชุม, จิตต์ เหมพนม, สุวณีย์ ธัมมิกะกุล และฉันทนา คงนคร. 2553. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง. การประชุมสัมมนาวิชาการ ระบบเกษตรแห่งชาติครั้งที่ 6 ระบบเกษตรเพื่อความสมดุลของชีวิตและสิ่งแวดล้อม 2553. หน้า 216-223.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นพวรรณ นิลสุวรรณ และนริสา จันทร์เรือง. 2558. การคัดเลือกและผลิตผงเชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. วารสารยางพารา 36: 20-25.

นันทรัตน์ รองสวัสดิ์. 2546. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดฝักอ่อน (*Zea mays* L.). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1-50.

นุชนารถ กังพิศดาร. 2554. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยยางพารา. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์, สุรีย์พร บัวอาจ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2554. การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ปฏิมาพร ปลอดภัย, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันณ์ เพชรรัตน์. 2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 39: 185-188.

ปวีณา อุตะมะติง. 2554. ประสิทธิภาพการใช้เชื้อรา *Trichoderma virens* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้า. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

ปวีณา สังข์แก้ว, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันณ์ เพชรรัตน์. 2555. การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *Formicus* เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43: 21-24.

ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ และพิศาล ศิริธร. 2556. ผลของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* BFP011 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วารสารแก่นเกษตร 41: 327-332.

ภัทรา กิณเรศ. 2551. การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมยางบราซิล. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตร.

ภูวดล วิริยะพันธ์. 2549. การปลูกยางพารา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : เกษตรสยามบุ๊คส์.

รัตน์ เพชรจันทร. 2553. ยางพารา. เอกสารนิเทศการศึกษา ฉบับที่ 264 ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2554. การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BCB3-19 เพื่อควบคุมโรคผลเน่าจากราสีเทาของมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 42: 97-100.

ศุภลักษณ์ มณีแสง, เสมอใจ ชื่นจิตต์, วสันณ์ เพชรรัตน์ และ วิจิตรา ลีละศุภกุล. 2551. การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวโดยชีววิธี. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 39: 189-192.

สมควร ดีรัศมี. 2542. การทำสวนยางพารา. นนทบุรี : บริษัท เอิร์นเอ็ดดูเคชั่น จำกัด.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2563 และแนวโน้ม ปี 2564. กรุงเทพฯ : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

สุขุม วงษ์เอก, นุชนารถ กังพิศดาร, พลชิต บัวแก้ว, สุภาพร บัวแก้ว, นุชนาฏ ณ ระนอง, ไพรัตน์ ทรงพานิช, ประพาส ร่มเย็น, ชุมสินธุ์ ทองมิตร, จันทวรรณ คงเจริญ, เสียงชัย เปรมกระสิน และจุมพฏ สุขเกื้อ. 2550. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2550. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.

สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. 2541. โรครากขาว (*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช วิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร, สายใจ สุชาติกูล, วสันณ์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2552. ลักษณะทางสรีรวิทยาและแนวทางควบคุมเชื้อราโรครากขาวยางพารา. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร และสมคิด ดำน้อย. 2559. ประสิทธิภาพและวิธีการใช้แม่ปุ๋ยไนโตรเจนบางชนิดและกำมะถันต่อการป้องกันการติดเชื้อราโรครากขาวของยางพาราในแปลงปลูกใหม่. วารสารยางพารา 37: 14-35.

อุไร จันทรประทิน. 2548. โรคแมลงศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2547. คู่มือยางพารา. กรุงเทพฯ : เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง.

Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T. and González-Mendoza, D. 2017. Antifungical activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. Mycobiology 45: 385–391.

Aktuganov, G., Galimzyanova, N., Melent'ev, A. and Kuz'mina, L. 2007. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls. Microbiology 76: 413-420.

Al-Tuwaigri, M.M.Y. 2008. Biological control of *Fusarium* root-rot of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by rhizospheric isolate of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride*. The Egyptian Society of Experimental Biology 4: 79-86.

Ali, A.M., Ren, H., Ahmed, T., Luo, J., An, Q., Qi, X. and Li, B. 2020. Antifungal effects of rhizospheric *Bacillus* species against bayberry twig blight pathogen *Pestalotiopsis versicolor*. Agronomy 10: doi:10.3390/agronomy10111811.

Ashwini, N. and Srividya, S. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. Biotechnology 4: 127-136.

Barton, C.J. 1948. Photometric analysis of phosphaterock. Analytical Chemistry 20: 63-70.

Berger, F., Li, H., White, D., Frazer, R. and Lieifert, C. 1996. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* cot1 in High-humidity fogging glasshouses. Phytopathology 86: 428-433.

Bertagnolli, B.L., Dal Soglio, F.K. and Sinchair, J.B. 1996. Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. Physiological and Molecular Plant Pathology 48: 145-160.

Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20: 167-190.

Boer, A.S. and Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Applied Microbiology and Biotechnology 36: 1-4.

Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B. and Shen, Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. Biology and Fertility of Soils 47: 495-506.

Chang, W. T., Chen, C. S. and Wang, S. L. 2003. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. Current Microbiology 47: 102-108.

Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y. and Wang, Q. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. Postharvest Biology and Technology 115: 113-121.

Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y. and Long, C.A. 2018. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold. Phytopathology 11: 1253-1262.

Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. 2003. Detection and characterizationof the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters 223: 47-51.

Chumthong A., Kanjanamaneesathian M., Pengnoo A. and Wiwattanapatapee R. 2008. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath blight: Formulation, bacterial viability and efficacy testing. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 2499-2507.

Chumthong, A. 2009. Development of *Bacillus megaterium* Formulations for Suppression of Rice Sheath Blight and Study of Mechanisms of Biocontrol. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Eldoksch, H.A., Atteia, M. F., and Abdel–Moity, S.M.H. 2001. Management of brown leaf rust, *Puccinia recondite* of wheat using natural products and biocontrol agents. Pakistan Journal of Biological Sciences 4: 550-553.

Gagne, S., Le Quere, D., Aliphat, S., Lemay, R. and Fournier, N. 1991. Inhibition of plant pathogenic fungi by volatile compounds produced by some PGPR strains. Canadian Journal of Plant Pathology 13: 277-280.

Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J. and Zhang, Y. 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. Biological Control 105: 27-39.

Geiger, J.P., Rio, B., Nicole, M., and Nandris, D. 1986. Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. European Journal of Forest Pathology 16: 147-159.

Gilbert, G.S., Handelsman, J., and Parke, J.L. 1990. Role of ammonia and calcium in lysis of Zoo-spores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85. Experimental Mycology 14: 1-8.

Hood, A.I. 2006. The mycology of the basidiomycetes. Proceeding of Heart Rot and Root Rot in Tropical Acacia Plantation, Yogykarta, Indonisia. 7-9 February 2006, pp. 34-59.

Intanoo, W., Chamswarng, C. and Sutthisa, W. 2002. Biological control of Chinese kale leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* with antagonistic microorganisms. Proceeding of 40th Kasetsart University Annual Conference, 4-7 February 2002. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Jayasuriya, K.E. and Thennakoon, B.I. 2007. Biolgical control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. Journal of Biological Sciences 36: 9-16.

Kaewchai, S., Lin, F.C., Wang, H.K. and Soytong, K. 2010. Characterization of *Rigidoporus microporus* isolated from rubber trees based on morphology and ITS sequencing. Journal of Agricultural Technology 6: 289-298.

Kai, M. 2020. Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. Frontiers in Microbiology 11: 559.

Kanjanamaneesathian, K., Kusonwiriyawong, C., Pengnoo, A. and Nilratana, L. 1998. Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulation for effective application. Australasian Plant Pathology 27: 198-206.

Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D. and Hirsch, A.M. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. Frontiers in Microbiology 9: 1-12.

Kim, P.I. and Chung, K.C. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Letters 234: 177-183.

Ku Asmah, K.S. and Sapak, Z. 2020. Potential of *Bacillus subtilis* for controlling bacterial leaf blight pathogen in rice. Food Research 4: 124-130.

Leelasuphakul, W., Sivanunsaku, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of beta-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme and Microbial Technology 38: 990-997.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. and Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 48: 113-121.

Lim, S.M., Yoon, M.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H. and Kim, J.C. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. The Plant Pathology Journal 33: 488-498.

Liu, W.W., Mu, W., Zhu, B.Y., Du, Y.C., and Liu, F. 2008. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agricultural Sciences in China 7: 1104-1114.

Madika, A., Ameh, J.B. and Machido, D.A. 2017. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* from soil for amylase production. Universal Journal of Microbiology Research 2: 82-86.

Maiden, N.A., Noran, A.S., Fauzi, M.A.F.A. and Atan, S. 2017. Screening and characterisation of chitinolytic microorganisms with potential to control white root disease of *Hevea brasiliensis*. Journal of Rubber Research 20: 182-202.

Manjula, K., Kishore, G. K., and Podile, A.R. 2004. Whole cell of *Bacillus subtilis* AF1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. Canadian Journal of Microbiology 50: 737-744.

Mannanov, R.N. and Sattarova, R.K. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. Chemistry of Natural Compounds 37: 117-123.

Matar, S.M., El-Kazzaz, S.A., Wagih, E.E., El-Diwany, A.I., Moustafa, H.E., Abo-Zaid, G.A., Abd-Elsalam H.E. and Hafez, E.E. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi, i. Biotechnology 8: 53-61.

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathol 45: 417-420.

Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2012. Biological control of oyster mushroom green mold disease by antagonistic *Bacillus* species. Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens", Graz, Austria, 7-10 June 2010, pp. 289-293.

Nandris, D., Nicole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root rot diseases of rubber trees. Plant Disease 71: 298-306.

Nicole, M.R. and Benhamou, N. 1991. Cytochemical aspects of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. Phytopathology 81: 1412-1420.

Noran, A.S., Maiden, N.A., and Fauzi, M.A.F.A. 2015. Rhizospheric microorganisms from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Rigidoporus microporus*. Journal of Agriculture, Forestry and Plantation 1.

Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biology and Technology 28: 187-194.

Okigbo, R.N. and Osuine, M.I. 2003. Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica* L.) in Southeasterm Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis*. Plant Protection Science 39: 70-77.

Pengnoo, A., Kusonwiriyawong, C., Niltatana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trails of the bacterial antagonists in pellet formulations to supprees sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Biological Control Journal 45: 245-256.

Pengnoo, A. 2005. Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Tropical Acidic and Low Phosphorus Soil. Ph.D Thesis, Hokkaido University. Japan.

Pengnoo, A., Wiwattanapatapee, R., Chumthong A. and Kanjanamaneesathian, M. 2006. Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf bilght disease of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) . World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 9-14.

Pengnoo, A., Hashidoko, Y., Onthong, J., Gimsanguan, S., Sae-ong, M., Shinano, T., Watanabe, T., Osaki, M. 2007. Screening of phosphate-solubilizing microorganisms in rhizosphere and rhizoplant of adverse soil-adapting plants in Southern Thailand. Tropics 16: 1-7.

Prasetyo, J., Nur Aeny, T. and Suharjo, R. 2009. The corelations between white rot (*Rigidoporus lignosus* L.) incidence and soil characters of rubber ecosytem in Penumangan Baru, Lampung. Journal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika 2: 149-157.

Prasetyo, J. and Nur Aeny, T. 2013. The preventive control of white root rot disease in small holder rubber plant ation using botanical, biolgical and chemical agents. Journal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika 1: 69-74.

Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pesticide Science 27: 133-140.

Rahman, M.M.E., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Dey, T.K., Nonaka, M. and Harada, N. 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. Australasian Plant Pathology 45: 103-117.

Ramyabharathi S.A. and Thiruvengadam, R. 2014. Mode of action of *bacillus subtilis* EPCO16 against tomato *fusarium* wilt. Biochemical and Cellular Archives 14: 47-50.

Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P. and Ravi Mycin, T. 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: 568-574.

Rotniam, W., Tanmala, W., Deesang, B., Wonglieng, P., Kanjanamaneesathian, M. and Pengnoo, A. 2008. Effect of antagonistic bacteria, *Bacillus* spp. on *Alternaria* spp. a causal agent of lecttuce (*Lactuca sativa* L.) leaf spot in hydroponic system. Journal of Plant Disease 23: 31-40.

Rodesuchit, A., Suchatgul, S., klaewklong, B. and Damnoi, S. 2012. Efficacy of fertilizers to control white root disease of rubber caused by *Rigidoporus microporus* at the early planting stages. Rubber Thai Journal 1: 62-72.

San Francisco, S., Houdusse, F., Zamarreno, A.M., Garnico, M., Casanova, E. and Garcia-Mina, J.M. 2005. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. Scientia Horticulturae 106: 38-52.

Sariah, M. 1994. Potential of *Bacillus* spp. as biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. Malaysian Applied Biology Journal 23: 53-60.

Sha, Y., Zeng, Q. and Sui, S. 2020. Screening and application of *Bacillus* strains isolated from nonrhizospheric rice soil for the biocontrol of rice blast. The Plant Pathology Journal 36: 231-243.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. Journal Bioscience and Bioengineering 89: 515-521.

Skidmore, A.M. and Dickinson, C.H. 1976. Colony interaction and interference between *Septoria nodorum* and phylloplane *fungi*. Transactions of the British Mycological Society 66: 57-64.

Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K. 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 315-320.

Thonglem, K., Plikomal, A. and Pathom-aree. W. 2007. Growth inhibition of *Penicillium digitatum* by antagonistic microorganisms isolate from various parts of orange tree. Maejo International Journal of Science and Technology 1: 208-215.

Torres, M.J., Pérez Brandan, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M.C. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. Microbiological Research 182: 31-39.

Wattanasilakorn, S., Sdoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchit, S. 2012. Screening of rubber (*Hevea brasilieansis* Muell. Arg.) rootstocks for the while root disease resistance. Journal of Agricultural Technology 8: 2385-2395.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A and Kanjanamaneesathian, M. 2013. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium* – alginate microcapsules for control of rice sheath blight. World Journal Microbiology and Biotechnology 29: 1487-1497.

Wu, Y., Zhou, J., Li, C. and Ma, Y. 2019. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. MicrobiologyOpen 8: 813.

Xu, Z., Zhang, R., Wang, D., Qiu, M., Feng, H., Zhang, N. and Shen, Q. 2014. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. Applied and Environmental Microbiology 80: 2941-2950.

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. and Huang, Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Applied and Environmental Microbiology 78: 5942-5944.

Zalila-Kolsi, I., Mahmoud, A.B., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S. and Jamoussi, K. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). Microbiological Research 192: 148-158.

Zho, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., Li, Z., Cheng, Y., Chen, J., Guo, L., Sun, X., Yan, Z., Li, J. and Zeng, L. 2020. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. Journal of Plant Pathology 102: 433-441.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

2. **Potato dextrose broth (PDB)**

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ PT7 ด้วยวิธี dual culture plate ที่เวลาต่างๆ

Antagonist bacterial (isolate)	Percentage of *R. microporus* (%)				
	3 days	5 days	7 days	9 days	12 days
SM1	41.67 ± 1.67 a	50.00 ± 2.48 a	66.43 ± 0.17 a	53.57 ± 0.71 a	51.43 ± 1.01 a
LPDD3-2	35.83 ± 2.76 b	33.33 ± 1.57 b	54.29 ± 1.01 b	46.07 ± 0.62 b	42.14 ± 0.71 b
PT7	30.00 ± 2.36 c	26.11 ± 1.84 c	51.07 ± 1.18 c	39.64 ± 2.11 c	35.36 ± 1.18 c
Control	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d
F-test	*	*	*	*	*
C.V. (%)	8.53	7.32	2.30	3.84	3.06

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* โดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่เวลา 7 วัน ด้วยวิธี pour plate

Antagonist bacterial (isolate)	Percentage of *R. microporus* (%)		
	fresh cell	non-sterile of supernatant	sterile of supernatant
SM1	96.67 ± 3.33 a	78.89 ± 1.11 a	63.33 ± 1.11 a
LPDD3-2	80.00 ± 1.57 b	76.67 ± 1.11 b	45.00 ± 1.84 b
PT7	68.89 ± 1.57 c	33.33 ± 1.57 c	15.00 ± 1.84 c
Control	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	3.77	2.72	5.31

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี agar well diffusion

Antagonist bacterial (isolate)	Percentage of *R. microporus* (%)		
	fresh cell	non-sterile of supernatant	sterile of supernatant
SM1	66.00 ± 2.00 a	49.00 ± 1.73 a	39.00 ± 1.73 a
LPDD3-2	57.00 ± 1.73 b	35.00 ± 1.73 b	29.00 ± 1.73 b
PT7	42.00 ± 2.00 c	22.00 ± 2.00 c	11.00 ± 1.73 c
Control	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	4.64	6.89	8.77

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพของสารระเหยจากเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

Antagonist bacterial (isolate)	Percentage of *R. microporus* (%)		
	fresh cell	non-sterile of supernatant	sterile of supernatant
SM1	50.00 ± 2.00 a	30.00 ± 2.00 a	17.00 ± 1.73 a
LPDD3-2	35.00 ± 1.73 b	21.00 ± 1.73 b	13.00 ± 1.73 b
PT7	18.00 ± 2.00 c	13.00 ± 1.73 c	8.00 ± 0.00 c
Control	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	7.44	11.41	14.89

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 บนชิ้นส่วนพืช

Antagonist bacterial (isolate)	Growth of *R. microporus* (cm)		
	fresh cell	non-sterile of supernatant	sterile of supernatant
SM1	2.03 ± 0.11 a	3.55 ± 0.05 a	4.55 ± 0.05 a
LPDD3-2	3.45 ± 0.11 b	4.48 ± 0.11 b	5.58 ± 0.08 b
PT7	5.58 ± 0.15 c	5.73 ± 0.08 c	6.70 ± 0.07 c
Control	7.00 ± 0.00 d	7.00 ± 0.00 d	7.00 ± 0.00 d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	2.71	1.61	1.19

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวกที่ 6 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ทดสอบโดยเซลล์และสารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งและนึ่งของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ในดินผสมที่มีการใส่เชื้อ 3 รูปแบบ

Antagonist bacterial (isolate)	Growth of *R. microporus* (cm)		
	fresh cell	non-sterile of supernatant	sterile of supernatant
Type 1			
SM1	1.90 ± 0.07 a	2.80 ± 0.12 a	4.35 ± 0.17 a
LPDD3-2	3.03 ± 0.11b	4.00 ± 0.07 b	5.48 ± 0.11 b
PT7	5.10 ± 0.16 e	5.93 ± 0.08 d	6.33 ± 0.11 c
Type 2			
SM1	4.38 ± 0.08 c	4.85 ± 0.11 c	6.40 ± 0.07 c
LPDD3-2	6.78 ± 0.08 f	7.35 ± 0.30 e	8.25 ± 0.15 e
PT7	7.93 ± 0.08 g	8.78 ± 0.08 f	9.38 ± 0.08 g
Type 3			
SM1	4.60 ± 0.07 d	5.03 ± 0.08 c	6.68 ± 0.11 d
LPDD3-2	6.88 ± 0.08 f	7.48 ± 0.11 e	8.48 ± 0.11 f
PT7	8.18 ± 0.18 h	8.93 ± 0.15 f	9.58 ± 0.08 h
Control	10.00 ± 0.00 i	10.00 ± 0.00 g	10.00 ± 0.00 i
F-test	*	*	*
C.V. (%)	2.01	2.33	1.64

หมายเหตุ: แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 4 ซ้ำ; ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศุภรัตน์ สังข์ทอง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5910620012

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา	2558

ทุนการศึกษา

1. ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

2. ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ ผลของการจัดการดินและแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรครากขาวของยางพารา

3. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

ศุภรัตน์ สังข์ทอง, อัจฉรา เพ็งหนู และภวิกา บุณยพิพัฒน์. 2564. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อราในดิน *Rigidoporus microporus* ภายใต้สภาพควบคุม. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 8. (กำลังจัดพิมพ์)