ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในอ้อย

Efficacy of Plant Growth Promoting Bacteria as Antagonists to Root Rot Pathogen in Sugarcane

สุวรา วุฒิอำพล[1] ชลิดา เล็กสมบูรณ์[1*] และเรวัต เลิศฤทัยโยธิน[2]

Suwara Wutthiamphon[1] Chalida Leksomboon[1*] and Rewat Lersrutaiyotin[2]

Abstract: Fourteen plant growth promoting bacteria (PGPB), including 10 isolates of rhizospheric bacteria and 4 isolates of stalk endophytic bacteria were assessed for their ability to control root rot pathogen of sugarcane both *in vitro* and *in vivo*. These 14 PGPB were screened *in vitro* for their antifungal activity against *Pythium* sp. SD1/9-2, a causal agent of sugarcane root rot. Using dual culture technique, five PGPB isolates showed more than 25% inhibition of mycelial growth of *Pythium* sp. SD1/9-2. Based on results of *in vitro* screens, the five PGPB isolates, S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 and 100/3 were evaluated further for efficacy under greenhouse conditions. As an indicator for controlling the root rot diseases for sugarcane, root fresh and dry weight of plant were measured and compared with the control plants. The result revealed that the maximum increase in root fresh and dry weight was observed in the sugarcane applied with the isolate 3/4 compared to the control inoculated plant with significant difference. At 30 DAI, root dry weight in the isolate 3/4 treatment were 38.3% higher than the control inoculated plant. This study suggested that the PGPB isolate 3/4 may be a potential biocontrol agent for sugarcane root rot disease under field conditions.

Keywords: plant growth promoting bacteria, root rot disease, sugarcane

บทคัดย่อ: นำแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (แบคทีเรียพีจีพีบี) จำนวน 14 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินบริเวณรากอ้อย จำนวน 10 ไอโซเลต และจากภายในลำอ้อย จำนวน 4 ไอโซเลต ประเมินความสามารถในการควบคุมเชื้อโรครากเน่าอ้อยในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือน ทำการคัดเลือกแบคทีเรียพีจีพีบี 14 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp. ไอโซเลต SD1/9-2 ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของอ้อย โดยการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่า มีแบคทีเรียพีจีพีบี 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium* sp. ไอโซเลต SD1/9-2 ได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จากผลการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงนำแบคทีเรียพีจีพีบี 5 ไอโซเลต ได้แก่ S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 และ 100/3 มาประเมินประสิทธิภาพในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยการใช้ค่าน้ำหนักรากสดและแห้งของพืชเป็นตัวชี้วัดการควบคุมโรครากเน่าอ้อยและเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุม พบว่า ไอโซเลต 3/4 ทำให้ค่าน้ำหนักรากสดและแห้งเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหลังการปลูกเชื้อ 30 วัน ในกรรมวิธีที่ราดไอโซเลต 3/4 ทำให้น้ำหนักรากแห้งเพิ่มขึ้นมากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ 38.3 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียพีจีพีบี ไอโซเลต 3/4 มีศักยภาพที่อาจจะนำไปใช้ควบคุมโรครากเน่าของอ้อยแบบชีววิธีได้ในสภาพแปลง

คำสำคัญ: แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช, โรครากเน่า, อ้อย

---

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrchl@ku.ac.th

วิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ 2 (3) : 45-53 (2562)

คำนำ

โรครากเน่าของอ้อยที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. เป็นโรคที่มีความสำคัญในแหล่งปลูกอ้อยทั่วโลก เพราะมีผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตอ้อย พบโรคนี้ครั้งแรกในรัฐหลุยส์เซียน่า และฮาวาย อ้อยที่เป็นโรคมีอาการใบเหลืองแห้งจากปลายใบเข้ามาหาโคน และชะงักการเจริญเติบโต สำหรับประเทศไทยพบว่าโรครากเน่าเป็นปัญหาสำคัญในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย (ปัทมาและคณะ, 2558) เชื้อ *Pythium* sp. เป็นเชื้อที่อยู่ได้นานในดินและเศษซากพืช จึงยากในการกำจัด วิธีการที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคในกลุ่มนี้ได้แก่ การควบคุมโรคแบบชีววิธี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สิ่งมีชีวิตควบคุมสิ่งมีชีวิต ด้วยกลไกต่างๆ ตามที่ นิพนธ์ (2539) กล่าวไว้ ได้แก่ การแข่งขัน การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต และชักนำความต้านทานในพืช โดยสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้มากที่สุด ได้แก่ จุลินทรีย์ และในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียนับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและมีจำนวนมากในสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะในระบบการผลิตพืช ทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นศัตรูพืช แบคทีเรียพีจีพีบี (PGPB : plant growth promoting bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่บริเวณราก (rhizospheric bacteria) และแบคทีเรียที่อยู่ภายในต้นพืช (endophytic bacteria) แบคทีเรียพีจีพีบีหลายชนิดมีคุณสมบัติในการช่วยตรึงไนโตรเจน การย่อยสลายฟอสเฟต และสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือฮอร์โมนพืช (Nakade, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียพีจีพีบีที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชยังสามารถช่วยควบคุมโรคพืชได้ด้วย ซึ่งมีรายงานไว้ในพืชหลายๆ ชนิดที่เป็นโรคจากเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน (Bashan and Holguin, 1998; Compant *et al*., 2005; Beneduzi *et al*., 2012; Elazzazy *et al*., 2012; Nakade, 2013) ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้และมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในอ้อย จะเป็นทางเลือกให้เกษตรกรในพื้นที่ที่มีโรคระบาดใช้ในการจัดการโรคเพื่อลดความเสียหายและเป็นประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตได้ การทดลองนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียพีจีพีบีซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับห้องปฏิบัติการ ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในอ้อยทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในโรงเรือน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในระบบการผลิตอ้อยแบบยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อสาเหตุโรคและแบคทีเรียพีจีพีบีที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้ ใช้เชื้อสาเหตุโรครากเน่า คือ เชื้อ *Pythium* sp. ไอโซเลต SD1/9-2 (ปัทมาและคณะ, 2558) ส่วนแบคทีเรียพีจีพีบีที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากอ้อย และลำอ้อยที่ไม่แสดงอาการเป็นโรค จำนวน 14 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากดินบริเวณรอบรากอ้อย จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ 3/4, 30/1, 68/1, 72/3, 79/3, 81/6, 83/3, 97/5, 100/3 และ102/3 และที่แยกมาจากภายในลำอ้อย 4 ไอโซเลต ได้แก่ S1/1, S22/4, S65/4 และ S89/2 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียพีจีพีบีที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยการคัดเลือกมาจากการทดสอบบนอาหาร N-free malate medium ที่ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ชลิดา และคณะ, 2560)

การคัดเลือกแบคทีเรียพีจีพีบีที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียพีจีพีบี 14 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ Pythium sp. ไอโซเลต SD1/9-2 ด้วยวิธี dual culture technique โดยใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารทดสอบ เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 3 นำชิ้นวุ้นวางบนอาหาร PDA บริเวณด้านข้างห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำแบคทีเรียพีจีพีบีขีดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อสาเหตุโรค โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อสาเหตุโรค 5 เซนติเมตร บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน สำหรับชุดควบคุมทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ไม่ขีดแบคทีเรียพีจีพีบี

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผล โดยการวัดรัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนี้

$$\%\text{การยับยั้ง} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

R1 = รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม
R2 = รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียพีจีพีบีในการควบคุมโรครากเน่าของอ้อยในสภาพโรงเรือนทดลอง

ทำการทดสอบกับอ้อยพันธุ์ LK92-11 อายุ 21 วัน ในสภาพโรงเรือนทดลองที่ศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาลทราย ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นำแบคทีเรียพีจีพีบีที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของอ้อยที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการมาใช้ทดลอง จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 และ 100/3 ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรียพีจีพีบีบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับปริมาณเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ($O.D_{600}$ = 0.2) การเตรียมสปอร์เชื้อสาเหตุโรค ตามวิธีของปัทมาและคณะ (2558) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน จากนั้นใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำใบหญ้าแพรกที่ตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เตรียมสปอร์แขวนลอยโดยใช้ spatula เขี่ยเส้นใย และสปอร์บนหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าขาวบางสองชั้น นำสปอร์แขวนลอยปรับให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ haemacytometer นำสปอร์แขวนลอยที่ได้ราดลงดินบริเวณรากอ้อยที่อายุ 21 วัน ในปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว จากนั้นนำแบคทีเรียราดลงดิน ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง การราดแบคทีเรียลงดินทำภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง บันทึกผลค่าน้ำหนักสดและแห้งของราก เพื่อใช้เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรค และประเมินความรุนแรงของโรคจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักรากแห้งที่ลดลง โดยให้คะแนนระดับความรุนแรง 0-3 (0 = น้ำหนักรากแห้งลดลง 0%, 1 = น้ำหนักรากแห้งลดลงมากกว่า 0% และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 %, 2 = น้ำหนักรากแห้งลดลงมากกว่า 30% และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 % และ 3 = น้ำหนักแห้งรากลดลงมากกว่า 50%) และบันทึกผลการเจริญเติบโตของอ้อย หลังการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทำการทดลอง 16 ซ้ำ มี 12 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมปกติ (ชุดควบคุมที่ไม่ราดแบคทีเรียพีจีพีบีและเชื้อ *Pythium* sp.)
กรรมวิธีที่ 2 - กรรมวิธีที่ 6 ราดแบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 หรือ 100/3 อย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 7 ราดเชื้อ *Pythium* sp. อย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 8 - กรรมวิธีที่ 12 ราดเชื้อ *Pythium* sp. ก่อน 24 ชั่วโมง และราดแบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต S65/4, 3/4, 0/1, 68/1 หรือ 100/3

ผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียพีจีพีบีที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำแบคทีเรียพีจีพีบี 14 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากเน่า พบว่ามีแบคทีเรียพีจีพีบีจำนวน 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลต S65/4 มีค่าการยับยั้ง 30.87 เปอร์เซ็นต์ และรองลงไป ได้แก่ ไอโซเลต 68/1, 3/4, 100/3 และ 30/1 มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 30, 28.99, 27.54 และ 25.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไอโซเลต S65/4, 68/1, 3/4, 100/3, 30/1 และ S22/4 แสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1, Figure 1)

Table 1 *In vitro* growth inhibition of *Pythium* sp. isolate SD1/9-2 by plant growth promoting bacteria (PGPB) in dual culture assay on potato dextrose agar at 4 days

PGPB	% Inhibition
	SD1/9-2
S1/1	5.79ab
S22/4	22.17de
S65/4	30.87e
S89/2	7.25ab
3/4	28.99de
30/1	25.07de
68/1	30.00e
72/3	19.27cd
79/3	12.03bc
81/6	3.33ab
83/3	9.71abc
97/5	10.58bc
100/3	27.54de
102/3	3.33a
C.V. (%)	7.25

Mean percentage in each column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ according to the Least Significant Difference (LSD)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียพีจีพีบีในการควบคุมโรครากเน่าของอ้อยในสภาพโรงเรือนทดลอง

เมื่อนำแบคทีเรียพีจีพีบี 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 และ 100/3 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่ากับอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในสภาพโรงเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต 3/4 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรค โดยทำให้น้ำหนักรากสด และแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยมีค่าเท่ากับ 0.41 และ 0.14 กรัม ตามลำดับ ส่วนในกรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค มีค่าน้ำหนักรากสดและแห้ง เท่ากับ 0.23 และ 0.09 กรัม ตามลำดับ และพบว่าการใส่แบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต 3/4 อย่างเดียวโดยไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ทำให้น้ำหนักรากสด และแห้งของอ้อยมีค่ามากกว่ากรรมวิธีควบคุม ปกติที่ไม่ได้ปลูกเชื้อสาเหตุโรคและมีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการราดแบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลตอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2, Figure 2) เมื่อประเมินความรุนแรงโรคจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักรากแห้งที่ลดลง พบว่าแบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต 3/4 ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักรากแห้งที่ลดลงมีค่าน้อยที่สุด เมื่อจัดระดับความรุนแรงอยู่ในระดับ 1 ส่วนไอโซเลต S65/4, 30/1, 68/1 และ 100/3 มีค่าระดับความรุนแรงอยู่ในระดับ 2 และกรรมวิธีควบคุม

ปลูกเชื้อสาเหตุโรค มีค่าระดับความรุนแรงสูงสุดในระดับ 3 ซึ่งเป็นระดับที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักรากแห้งลดลงมากกว่า 50% (Table 3)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของอ้อยจากค่าน้ำหนักสด และแห้งของต้น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต 3/4 มีผลทำให้น้ำหนักสด และแห้งของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อมีค่ามากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 14.21 และ 3.61 กรัม และมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้มีการราดแบคทีเรีย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.78 และ 3.10 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคร่วมด้วย พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต 3/4 มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของต้นและค่าความสูงของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 มีค่ามากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค แต่ค่าน้ำหนักสดของต้น และเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นมีค่าเท่ากันกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามค่าที่ได้ในด้านน้ำหนักและความสูงของต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ (Table 2)

Table 2 Effect of plant growth promoting bacteria (isolates S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 and 100/3) on growth of sugarcane variety LK92-11 at 1 month after pathogen (PY) inoculation in greenhouse condition

Treatment	Root (g)		Stalk (g)		Plant Height	Stalk Diameter
	Fresh Weight	Dry Weight	Fresh Weight	Dry Weight	(cm)	(cm)
Control (Healthy)	0.47abc	0.20ab	11.78bc	3.10ab	17.96bcd	0.53bcd
S65/4	0.40cde	0.18bc	11.69bc	3.27ab	19.50ab	0.54abc
3/4	0.56a	0.23a	14.21a	3.61a	20.55a	0.59a
30/1	0.29fgh	0.13def	11.54bc	3.24ab	19.23ab	0.54abc
68/1	0.43bcd	0.14def	10.79c	3.00b	19.39ab	0.52b-e
100/3	0.52ab	0.16cd	12.82ab	3.39ab	20.04a	0.57ab
PY	0.23gh	0.09g	8.86d	1.98cd	16.56cde	0.47efg
PY+ S65/4	0.32efg	0.11efg	7.86def	1.77cd	16.34c-f	0.43g
PY+ 3/4	0.41cde	0.14c-f	8.81d	2.10c	16.62cde	0.47efg
PY+ 30/1	0.32efg	0.10fg	8.87d	1.84cd	14.77efg	0.46fg
PY+ 68/1	0.32efg	0.11efg	8.25de	1.93cd	16.25def	0.48d-g
PY+ 100/3	0.27fgh	0.12d-g	6.88ef	1.51d	14.58fg	0.45g
C.V. (%)	39.68	40.51	22.26	33.48	14.90	15.75

Mean percentage in each column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ according to the Least Significant Difference (LSD)

Table 3 Effect of plant growth promoting bacteria (isolates S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 and 100/3) on disease severity of *Pythium* sp. infection on sugarcane variety LK92-11 at 30 day after pathogen (PY) inoculation in greenhouse

Treatment	Disease severity	
	root dry weight loss (%)	Disease rating
PY	55	3
PY+ S65/4	45	2
PY+ 3/4	30	1
PY+ 30/1	50	2
PY+ 68/1	45	2
PY+ 100/3	40	2

Disease rating: 0 = root dry weight loss = 0%, 1 = root dry weight loss >0% and ≤30%, 2 = root dry weight loss >30% and ≤50%, 3 = root dry weight loss >50%

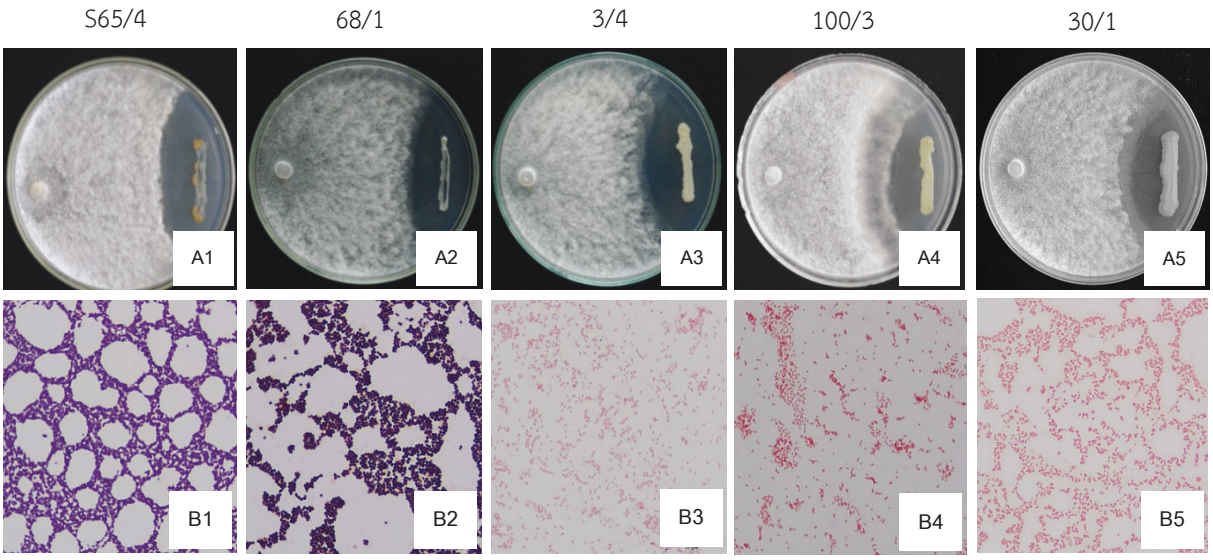

Figure 1 *In vitro* inhibition on potato dextrose agar of *Pythium* sp. by effective bacterial isolates S65/4, 68/1, 3/4, 100/3 and 30/1 (A1-A5) and cell morphology by Gram stain of the effective bacterial isolates (B1-B5).

Agricultural Science and Management J. 2 (3) : 45-53 (2019)

Figure 2 Root rot of sugarcane inoculated with *Pythium* isolate SD1/9-2 and plant growth promoting bacteria (PGPB) isolates S65/4, 68/1, 3/4, 100/3 and 30/1 compared with un-inoculate control

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *Pythium* sp. เป็นเชื้อสกุลสำคัญที่เข้าทำลายรากพืชหลากหลายชนิด ซึ่งเมื่อเข้าทำลายพืชผักในระยะกล้า จะทำให้พืชตายได้ ในการเข้าทำลายอ้อย พบว่า อ้อยจะมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเป็นผลจากระบบรากที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย โดยในสภาพแปลงของเกษตรกร พบเป็นปัญหากับอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในการศึกษาครั้งนี้ จึงนำพันธุ์ LK92-11 มาเป็นพันธุ์ทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรียพีจีพีบีที่คัดเลือกมาก่อนหน้านี้แล้ว มาทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ Pythium sp. ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียพีจีพีบีทั้ง 14 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้ทั้งหมด โดยมีค่าการยับยั้ง 3.33.- 30.87 เปอร์เซ็นต์ และมีแบคทีเรียพีจีพีบีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้จำนวน 5 ไอโซเลต คิดเป็น 35.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองของปัทมา และคณะ (2558) ที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากอ้อย พบว่า ได้ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้ คิดเป็น 27.7 เปอร์เซ็นต์ และคิดเป็น 4.6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทั้งเพื่อการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช จึงควรทำการคัดเลือกโดยใช้อาหารเฉพาะเพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการแทนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เมื่อนำแบคทีเรียพีจีพีบีที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ S65/4, 3/4, 30/1, 68/1 และ 100/3 มาศึกษาลักษณะสำคัญของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) พบว่า ไอโซเลต S65/4 และ 68/1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปทรงกลม

ส่วนไอโซเลต 3/4, 30/1 และ 100/3 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น (Figure 1) และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่ากับอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า แบคทีเรียพีจีพีบีไอโซเลต 3/4 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรค โดยทำให้น้ำหนักรากสด และแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค การนำแบคทีเรียพีจีพีบีทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าอ้อย ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่า ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Pythium* sp. แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแตกต่างกันไป โดยในการทดลองนี้ พบว่า ไอโซเลต S65/4 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด เท่ากับ 30.87 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการทดสอบกับอ้อยในสภาพโรงเรือนทดลอง (*in vivo*) พบว่าไอโซเลตที่ทำให้ค่าน้ำหนักรากของอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อมีค่าสูงสุด คือ ไอโซเลต 3/4 ซึ่งไม่ใช่ไอโซเลตที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคได้สูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของรากอ้อย และอาจเป็นผลจากการอยู่รอดของแบคทีเรียพีจีพีบี เพราะในการทดลองครั้งนี้ ทำการราดแบคทีเรียเพียงครั้งเดียว และราดหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค เพื่อให้คล้ายคลึงกับสภาพธรรมชาติที่จะมีเชื้อสาเหตุโรคปะปนอยู่ในดินอยู่ก่อนแล้ว ดังนั้น ในการนำไปใช้อาจจะต้องมีการศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียพีจีพีบีในดิน เพื่อการราดซ้ำในช่วงเวลาที่เหมาะสม และควรศึกษาในสภาพพื้นที่แปลงปลูกในแต่ละแหล่งที่มีชนิดของดินแตกต่างกันไปด้วย นอกจากการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแล้ว ในการทดลองนี้ ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียพีจีพีบีทั้ง 5 ไอโซเลต ต่อการเจริญของอ้อย ซึ่งผลการทดลอง ไม่พบความแตกต่างการเจริญเติบโตของอ้อยอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองนี้ทำในระยะกล้าและมีการราดแบคทีเรียเพียงครั้งเดียว

การประเมินการเกิดโรคพืชโดยทั่วไปทั้งด้านการเกิดโรค (disease incidence) และความรุนแรงของโรค (disease severity) จะต้องมีการกำหนดลักษณะอาการโรคเป็นระดับที่ชัดเจน แต่สำหรับการทดลองในครั้งนี้ เป็นการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียพีจีพีบีในการควบคุมโรครากเน่าของอ้อยในสภาพโรงเรือนทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการนำไปทดสอบต่อในสภาพแปลงปลูก การทดลองนี้ จึงได้ใช้ค่าน้ำหนักรากอ้อยแทนการประเมินอาการโรค ซึ่งการศึกษาอาการโรครากเน่าจากการเจริญเติบโตที่ลดลงในอ้อยจะพบความแตกต่างได้เมื่ออ้อยอายุมากกว่า 4 เดือน และไม่สามารถทำการประเมินจากสีของรากอ้อยที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากรากอ้อยปกติไม่ได้มีสีขาวทั้งหมด ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงทำการประเมินจากปริมาณรากโดยใช้ค่าน้ำหนักราก ซึ่งในการประเมินด้านปริมาณจะช่วยลดข้อผิดพลาดได้ดีกว่าการประเมินจากคุณลักษณะอื่นๆ เช่น การประเมินจากสีรากที่เปลี่ยนไป อย่างไรก็ตาม ถ้าจะทำการประเมินโรครากเน่าในอ้อยเพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรค อาจจะต้องทำการประเมินวิธีการที่ใช้ให้เหมาะสมกับการเกิดโรคและควรจะประเมินโรคในสภาพแปลงปลูก เพราะพืชจะแสดงอาการได้ชัดเจนเมื่อเข้าสู่ระยะย่างปล้อง

สรุป

การนำแบคทีเรียพีจีพีบี 14 ไอโซเลต ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของอ้อย พบว่า แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของอ้อย ได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ S65/4, 68/1, 3/4, 100/3 และ 30/1 โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 30.87, 30, 28.99, 27.54, 25.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าในอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในระยะกล้าโดยการทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า ในกรรมวิธีที่ราดแบคทีเรียไอโซเลต 3/4 ทำให้อ้อยที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคมีค่าน้ำหนักรากสูงสุด ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าอ้อยได้ดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัย การตรวจสอบโรครากเน่าของอ้อยในเขตภาคกลางของประเทศไทยและวิธีการทดสอบความต้านทานของอ้อยต่อโรครากเน่า จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายเขต 1 สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์ท่อนพันธุ์อ้อยในการทดลอง โรงงานน้ำตาลมิตรผล อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างโรครากเน่าอ้อย และศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา เล็กสมบูรณ์ สุภาพร กลิ่นคง และเรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2560. รายงานโครงการวิจัย การคัดเลือกแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากและภายในอ้อยเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย. เครือข่ายองค์กรบริหารงานวิจัยแห่งชาติ. 30 หน้า

นิพนธ์ ทวีชัย. 2539. งานวิจัยด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพในปัจจุบัน. แก่นเกษตร 24(2): 53-62

ปัทมา เหรียญจื้อ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และเรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2558. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของอ้อย. น.31-36. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bashan, Y. and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PBPB. Soil Biol. Biochem. 30: 1225-1228.

Beneduzi, A., A. Ambrosini and L.M.P. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35(4): 1044-1051.

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4951-4959.

Elazzazy, A.M., O. A. Almaghrabi, T.A.A. Moussa and T.S. Abdelmoneim. 2012. Evaluation of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to control Pythium aphanidermatum in cucumber plants. Life Sci. J. 9(4): 3147-3153.

Nakade, D.B. 2013. Bacterial diversity in sugarcane (Saccharum officinarum) rhizosphere of saline soil. Int. Res. J. of Bio. Sci. 2: 60-64.