

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียม และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ

Screening of high potential antagonistic bacteria for control sclerotium wilt disease and enhancement growth of tomato plant

นันทภัก เกตุสงฆ์¹ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล^{1*}

Nanthaphak Ketsuwong¹ and Petcharat Thummabenjapone^{1*}

บทคัดย่อ: บทคัดย่อ: การทดสอบในครั้งนี้เพื่อคัดเลือเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียม (Sclerotium wilt disease) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในระยะ 1 เดือนหลังย้ายปลูก โดยเก็บเก็บรวบรวมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมจากตัวอย่างพืชเป็นโรค และจากตัวอย่างดินในแปลงปลูกมะเขือเทศ พริก เมล่อน แตงโม ถั่วเขียว ถั่วพุ่ม ถั่วแระ และดาวเรือง ให้ได้รวม 20 ไอโซเลต พบว่ามีลักษณะการเจริญของเส้นใยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA (Diffo®) ได้หลายลักษณะ คัดเลือกตัวแทนของเชื้อรา *S. rolfsii* 5 ไอโซเลต จากมะเขือเทศ (Sc-TOKKU01), เมล่อน (Sc-MeKKU01), ถั่วแระ (Sc-JaKKU01, Sc-JaKKU01) และถั่วพุ่ม (Sc-LeKKU01) มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus* spp. (*Bacillus subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-B.K., *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-029., *Bacillus*-032 และ *Bacillus*-033) และ *Serratia marcescens* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้อย่างชัดเจนในทุกไอโซเลตที่ทดสอบด้วยกรรมวิธี Dual culture bioassay โดย *B. subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-B.K., *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-B.MS4 และ *Bacillus*-B.032 และเชื้อ *Bacillus*-033 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* ที่ระดับ 45-67.95% รองลงมาคือ *Bacillus*-029 ที่ยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ทุกไอโซเลตได้ 3030.772-55.64% ส่วนเชื้อ *Streptomyces*-PR87 และ *S. marcescens* ยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ 3 ใน 5 ไอโซเลตของเชื้อ *S. rolfsii* ที่ทดสอบ เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ตรงบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความผิดปกติลักษณะต่างๆ และลดความมีชีวิตของเมดสเคลอโรเตียม ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการประเมินการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมในโรงเรือนปลูกพืชทดลองพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-NTS3 และ *Bacillus*-B.K. ลดการเกิดโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมของมะเขือเทศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังช่วยลดการเกิดโรคใบจุดแบคทีเรียจากเชื้อ *Xanthomonas* spp. ที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย เชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีการสร้าง 3-indole-acetic acid (IAA) ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และปลดปล่อยออกมามากกว่า 5.65-13.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศต่อไป

คำสำคัญ: การควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control), โรคมะเขือเทศ (Tomato disease), แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria)

Received August 21, 2018

Accepted April 2, 2019

¹ สาขาโรคพืชวิทยา สาขาวิชากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Plant Pathology Division, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, KhonKaen, Thailand., 40002

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th

ABSTRACT: Total 20 isolates of *Sclerotium rolfsii* were isolated from infected plants or cultivated soil of tomato, pepper, melon, watermelon, cowpea, sunflower, Jerusalem artichoke and marigold. They showed variation on mycelium and sclerotium characteristics after cultured on PDA medium (Diffo®). Five isolates of *S. rolfsii* isolated from tomato (Sc-T0KKU01), melon (Sc-MeKK01), Jerusalem artichoke (Sc-JaKK01), Sc-JaKK01 and cowpea (Sc-LeKK01) were tested with *Streptomyces*-PR87, *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-BK, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-029., *Bacillus*-032 and *Bacillus*-033) and *Serratia marcescens* by dual culture bioassay. The growth of *S. rolfsii* mycelium was clearly inhibited by *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-B.K, *Bacillus*-NTS3 and *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-032 or *Bacillus*-033 with highest percentage of inhibition range from 45% -67.95% Followed by the *Bacillus*-029 which showed 30.77% -55.64 % inhibition. The *Streptomyces*-PR87 and *S. marcescens* inhibited 3/5 isolates of tested *S. rolfsii*. In green house condition, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-NTS3, and *Bacillus*-B.K. significantly reduced the number of sclerotium wilt disease plants of tomato. They also reduced percentage of bacteria spot infected plant (natural infection) caused by *Xanthomonas* spp. The *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-NTS3, and *Bacillus*-B.K. produced 3-indole-acetic acid (IAA) which related to the role of plant growth promoting in the range of 5.65-13.56 micrograms per milliliter. These 3 *Bacillus* isolates, therefore, are highest potential to further development as bioproduct for control sclerotium wilt disease and promote growth of tomato plant.

Keywords: biological control, Tomato disease, plant growth promoting bacteria

บทนำ

โรคเหี่ยวสเคลอโรเตียม (sclerotium wilt หรือ southern blight) เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก ทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับและวัชพืชทั่วไป เนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 100 วงศ์ (Kator et al., 2015) พืชผักและไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น พริก มะเขือเทศ แตงเมลอน แตงโม แตงกวา มันฝรั่ง ดาวเรือง พืชไร่ เช่น ถั่วลิสง ถั่วพุ่ม และพืชทางเลือกใหม่ ไม้ดอกที่ใช้ส่วนหัวสำหรับเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ เช่น แก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) ก็ได้รับความเสียหายจากเชื้อรา *S. rolfsii* เป็นอย่างมาก (Sennoi et al., 2013) เชื้อรา *S. rolfsii* เข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโตและ เชื้อราเจริญเส้นใยได้รวดเร็วและอาศัยพักตัวอยู่ในดินปลูกได้เป็นระยะเวลานานในรูปแบบของเส้นใยที่อัดแน่นเป็นเม็ดสเคลอโรเตียม

การควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมโดยทั่วไปแนะนำการใช้วิธีการเกษตรกรรม คือ การจัดการแปลงปลูก ร่วมกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา carboxin (ศิริธร, 2545) เพื่อลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดิน ก่อนที่จะปลูกพืชรุ่นต่อไป ซึ่งการใช้สารเคมีนั้นก็ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรโดยตรง การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุม

โรคจึงเป็นแนวทางที่ยั่งยืน ซึ่งประสบผลสำเร็จในการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และใช้กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังมีข้อจำกัดในด้านการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและในการใช้จำเป็นต้องมีความชื้นที่มากพอเพียงจึงจะทำให้การควบคุมโรคเป็นไปได้ อย่างมีประสิทธิภาพ แนวคิดเรื่องการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้และควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่สำคัญและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะมะเขือเทศด้วยจึงเป็นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วยและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ที่เป็นที่รู้จักหรือมีรายงานแล้ว ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Schisler et al., 2004; Shafi et al., 2017), *Streptomyces* spp. (Elizabeth et al., 1999; เพชรรัตน์, 2551) และ *Serratia marcescens* มีรายงานการใช้ควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมของถั่วลิสง (Ordentlich et. al., 1987) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่ดีทั้งสองคุณลักษณะมาเพื่อทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมมะเขือเทศและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ดีเพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีอีกด้วย

วิธีการศึกษา

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคพืช *S. rolfsii* จากพืชต่างๆในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *S. rolfsii* ได้แก่ มะเขือเทศ พริก แก่นตะวัน เมล่อน แตงโม ดาวเรือง ถั่วลิสง ถั่วเขียว หรือจากดินบริเวณที่พืชเป็นโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียม ในเขตจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาจากสังเกตลักษณะอาการต้นพืชที่มีอาการเหี่ยว และพบเส้นใยขาว หยาบ บริเวณรอบโคนต้นพืช หรืออาจพบส่วนของเชื้อ (sign) ที่เป็นลักษณะเมดสเคลอโรเตียม (sclerotium) ซึ่งเป็นเส้นใยของเชื้อราที่อัดตัวกันแน่น เป็นเม็ดกลมสีดำจนถึงน้ำตาลเข้มแกมดำ พบบริเวณโคนต้น นำมาแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ส่วนตัวอย่างดินใช้วิธี Baiting โดยนำตัวอย่างดินมาใส่ลงในกล่องพลาสติก เติมน้ำลงไปเล็กน้อยพอให้ดินชื้น แล้ววางเมล็ดถั่วลิสงที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนตัวอย่างดิน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และจึงแยกเส้นใยเชื้อราออกจากเมล็ดถั่วลิสงตามวิธี direct isolation เพาะเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหาร PDA เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์ไว้บน PDA slant ที่อุณหภูมิห้องและที่ 10-12 องศาเซลเซียส

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหาร PDA

นำเชื้อ *S. rolfsii* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (difo®) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจนกว่าจะสร้างเมดสเคลอโรเตียม ที่ระยะเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใย การสร้างเมด ขนาด และสีของเมดสเคลอโรเตียม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลตของเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* ในระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมเชื้อ *S. rolfsii* ไอโซเลตที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ และตัวอย่างดินที่แยกเชื้อได้ จากข้อ 1 นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 5

วัน จากนั้นเตรียมผลมะเขือเทศสุก โดยทำความสะอาดฆ่าเชื้อที่ผิว โดยใช้ 3% NaOCl (Clorox®) แช่นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง วางผลมะเขือเทศลงในกล่องพลาสติก ทำแผลจำนวน 1 แผลบนผล มะเขือเทศโดยใช้เข็มเย็บปลายแหลมฉีดยาไฟให้ร้อนแดง ตามหลัก Aseptic technique ตัดชิ้นส่วนที่มีเส้นใยของเชื้อ *S. rolfsii* เจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปแปะบนผลมะเขือเทศ ตรงจุดที่ทำแผลไว้แล้ว กรรมวิธีควบคุมปกติคือ ชิ้นส่วนอาหาร PDA วางผลมะเขือเทศทดสอบไว้ในกล่องชื้น สังเกตการการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* บนผลมะเขือเทศ ที่ระยะ 5, 7 และ 14 วัน หลังทำการปลูกเชื้อทดสอบ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่ยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ในระดับห้องปฏิบัติการ

เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-B.K., *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-029., *Bacillus*-032 และ *Bacillus*-033 และ *Serratia marcescens* เลี้ยงเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar(PDA) อายุ 5 วัน และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ *Streptomyces*-PR87 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำเพาะ Arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) เป็นเวลา 7 วัน เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลต และ *S. marcescens* เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient agar(NA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ dual culture bioassay

การทดสอบ Dual culture bioassay

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรตัดชิ้นส่วนเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรงตำแหน่งที่กำหนดให้ ห่างจากจุดที่วางชิ้นส่วนที่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์เจริญอยู่ 5 เซนติเมตร และในกรรมวิธีควบคุมใช้ชิ้นส่วนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และบันทึกผลการทดลองที่ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำต่อไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ เมื่อครบ 7 วัน จึงนำส่วนของปลายเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* มาตรวจสอบการ

เปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ บันทึกการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียม

ศึกษาผลกระทบของสารเมตะบอลไลต์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเม็ดสเคลอโรเทียม

นำเม็ดสเคลอโรเทียมที่ได้จากการทดสอบ dual culture bioassay นาน 14 วัน มาประเมินความงอก มีขั้นตอนต่อไปนี้ ใช้คิมคิบเม็ดสเคลอโรเทียมมาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยการแช่ในสารละลาย 4% Clorox® (v/v) นาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA (Kamal et al., 2015) สังเกตการเปลี่ยนแปลงความงอกของเส้นใยจากเม็ด สเคลอโรเทียมที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงหลังวางเม็ด โดยกำหนดการให้แสง 12/12 ชั่วโมง จึงตรวจนับการงอกของเส้นใย (Boukaew et al., 2013) โดยคิดจากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{viability}(\%) = (R1-R2)/R1 \times 100$$

กำหนดให้ R1 แทน จำนวนเม็ด sclerotia ในหน่วยทดลองควบคุมที่มีการงอก

R2 แทน จำนวนเม็ด sclerotia ในหน่วยทดลองที่ทดสอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะที่มีการงอก

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเทียม

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ dual culture bioassay มาทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวต้นมะเขือเทศในระดับกระถาง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar(NA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มไว้ที่อุณหภูมิควบคุม 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (cell suspension) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ค่าความยาวคลื่น 600 nm. (OD=2) สำหรับใช้ในการทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้าชอกก้านใบ และการพ่นใบ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เพาะเมล็ดมะเขือเทศ พันธุ์สีดาลงวัสดุเพาะพีทมอสในถาดหลุม ขนาด 104 หลุม ดูแล

รดน้ำและควบคุมแสงพาดหะนำเชื้อไวรัส จนอายุกล้าได้ 1 เดือน จึงนำมาทดสอบในกระถางขนาด 4 นิ้วเตรียมไว้ทดสอบ 10 กระถางต่อกรรมวิธี

การเตรียมเชื้อ *S. rolfii* ที่ใช้ปลูกเชื้อ

แช่เมล็ดข้าวเปลือกในน้ำ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ใน 10% NaOCl (Clorox®) นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาผึ่งให้แห้งหมาด แบ่งใส่ถุงพลาสติกทึบร้อน หนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 20 นาที เมื่อข้าวเปลือกหนึ่งเย็นตัวลง จึงย้ายเชื้อ *S. rolfii*-TOKKU01 ลงไป บ่มเชื้อ นาน 10 วัน จึงนำไปปลูกเชื้อบนต้นมะเขือเทศ ในอัตรา 2 กรัม/กระถาง

กรรมวิธีในการทดสอบ ประกอบด้วย

ก. การฉีด (Inject) เชื้อปฏิชีวนะความเข้มข้น OD 2 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วันหลังย้ายปลูก

กรรมวิธี Inject + *Serratia marcescens*, Inject + *Streptomyces*-PR87, Inject+ *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, Inject + *Bacillus*-B.K., Inject + *Bacillus*-NTS3, Inject + *Bacillus*-MS4, Inject + *Bacillus*-029, Inject + *Bacillus*-s.032, Inject+ *Bacillus*-033, Inject+ control (sterile distilled water)

ข. การฉีดพ่น (Spray) เชื้อปฏิชีวนะ OD 2 จนเปียกทั่วใบและลำต้นจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วันหลังย้ายปลูก

กรรมวิธี Spray + *Serratia marcescens*, Spray + *Streptomyces*-PR87, Spray+ *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, Spray + *Bacillus*-B.K, Spray + *Bacillus*-.NTS3, Spray + *Bacillus*-MS4, Spray + *Bacillus*-029, Spray+ *Bacillus*-s.032, Spray + *Bacillus*-033, Spray + Control(sterile distilled water)

แต่ละกรรมวิธีทดสอบ 5 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT โรคเหี่ยวสเคลอโรเทียมภายหลังจากการปลูกเชื้อ *S. rolfii*-ToKK01 ไปแล้ว 1 สัปดาห์ และประเมินการเกิดโรคทางใบที่เกิดขึ้นตามสภาพธรรมชาติ ที่ 3 สัปดาห์หลังย้ายปลูก

การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช: การสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA)

ตรวจสอบการสร้าง IAA ของ *Bacillus* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลตและ *S. marcescens* ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Salkowski's method ตามวิธีที่ดัดแปลงโดย อัศศิริ และเพชรรัตน์ (2556) เปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptomyces-PR87* โดยปรับช่วงระยะเวลาการเลือกช่วงระยะการเจริญ Growth stage ของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

ผลการศึกษา

การศึกษาสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียม (Sclerotium wilt disease)

แยกเชื้อรา *Sclerotium* spp. ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต (Table 1) โดยเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* มีลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อแตกต่างกันไปบ้างเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระยะ 5 วัน โดยเชื้อที่แยกได้จากพริก มะเขือเทศ แตงโม และเมล่อน ไอโซเลต *Sclerotium-ToKKU01*, *Sclerotium-ToKKU011*, *Sclerotium-ToNK01*, *Sclerotium-ToChNK01*, *Sclerotium-Wa01*, *Sclerotium-MeCh021*, *Sclerotium-MeKo031*, *Sclerotium-MeKo032*, และ *Sclerotium-MeKo033* มีลักษณะเส้นใยสีขาวหยาบ ไม่ฟู บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบการสร้างเม็ดสเคลอโรเตียมที่ระยะ 7 วัน หลังจากเลี้ยงเชื้อ เม็ดสเคลอโรเตียมกลม ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม ส่วนเชื้อ *S. rolfsii* ที่แยกได้จากตัวอย่างของถั่วพุ่ม ถั่วลิสง แก่นตะวัน และดาวเรือง ได้แก่ ไอโซเลต *Sc-LeKKU01*, *Sc-BeKKU01*, *Sc-GAKKU01*, *Sc-JaKKU01*, *Sc-JaKKU02*, *Sc-MgFKKU01*, *Sc-MgFKKU02* และ *Sc-MgFKKU03* มีลักษณะเส้นใยสีขาวหยาบ ฟูบนผิวหน้า PDA คล้ายดอกไม้ พบการสร้างเม็ดสเคลอโรเตียมที่ระยะ 7 วัน หลังจากเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเม็ดสเคลอโรเตียมกลม ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม มีขนาดไม่สม่ำเสมอ นำตัวแทนของเชื้อ *S. rolfsii* จากพืชแต่ละชนิด คือ *Sc-ToKKU01*, *Sc-BeKKU01*, *Sc-*

MeKKU01, *Sc-WaKKU01*, *Sc-MgFKKU01*, *Sc-JaKKU01*, *Sc-JaKKU02* และ *Sc-LeKKU01* มาทดสอบการเกิดโรคบนผลมะเขือเทศพบว่า ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการก่อโรคในผลมะเขือเทศได้

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ไอโซเลตต่างๆ

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ทั้ง 5 ไอโซเลต เกิดแนวยับยั้งได้กว้างมากที่สุด ได้แก่ *B. subtilis-PRKKU.1*, *Bacillus-B.K.*, *Bacillus-NTS3* และ *Bacillus-MS4*, *Bacillus-032* และ *Bacillus-033* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* ในช่วง 45%-67.95% รองลงมาคือ *Bacillus-029* ที่ยับยั้งเชื้อ *Sclerotium-ToKKU01* ได้ 38.72% ส่วนการยับยั้ง *S. rolfsii* ไอโซเลตอื่นๆ อยู่ในระดับสูงมากไม่แตกต่างจากเชื้อ *Bacillus* spp. ในกลุ่ม 6 ไอโซเลตแรก ส่วนเชื้อ *Streptomyces-PR87* และ *S. marcescens* ยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้บางไอโซเลตเท่านั้น โดยเชื้อ *Streptomyces-PR87* ไม่ยับยั้งเชื้อ *Sclerotium-JaKKU02* และ *Sclerotium-MeKKU01* ส่วนในเชื้อ *Sclerotium-ToKKU01* ยับยั้งได้เพียง 15.64%, ยับยั้งเชื้อ *Sclerotium-JaKKU02* ได้ 34.36% และ ยับยั้ง *Sclerotium-LeKKU01* ได้ 21.37% ส่วนเชื้อ *S. marcescens* ยับยั้งได้ชัดเจนใน *Sclerotium-ToKKU01* 30.77% แต่ยับยั้ง *Sclerotium-JaKKU01* ได้เล็กน้อย 12.83% (Table 2)

การเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ได้จาก dual culture bioassay

ผลการศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* บริเวณแนวยับยั้งในการทดสอบ dual culture bioassay มาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยใน *Bacillus-NTS3*, *B. subtilis* และ *Bacillus-033* พบเส้นใยที่แตกหักหรือเสีรูปร่างมากกว่าไอโซเลตอื่นๆ ที่พบเป็นเส้นใยที่ลึบ มีขนาดเล็กน้อยกว่าเส้นใยในกรรมวิธี

Table 1 Isolate of *Sclerotium* spp. collected from infected plant or cultivated soil in Khon Kaen and Mahasarakham Provinces

Number	plant	Cultivated soil	location	Year.(A.D.)
1. Sc.-ToKKU01	Tomato	-	Khon Kaen	2015
2. Sc.-MeKKU011	Melon	-	Khon Kaen	2015
3. Sc.-MeCh021	-	Melon	Mahasarakham	2015
4. Sc.-MeKo031	-	Melon	Mahasarakham	2016
5. Sc.-MeKo032	Melon	-	Mahasarakham	2016
6. Sc.-MeKo033	Melon	-	Mahasarakham	2016
7. Sc.-JaKKU01	-	Jerusalem artichoke	Khon Kaen	2015
8. Sc.-JaKKU02	Jerusalem artichoke	-	Khon Kaen	2015
9. Sc.-JaKKU03	Jerusalem artichoke	-	Khon Kaen	2015
10. Sc.-JaBKKU01	-	Jerusalem artichoke	Khon Kaen	2015
11. Sc.-GrKKU01	Groundnut	-	Khon Kaen	2015
12. Sc.-GFKKU02	-	Groundnut	Khon Kaen	2016
13. Sc.-MgKKU01	Marigold	-	Khon Kaen	2015
14. Sc.-MgKKU02	Marigold	-	Khon Kaen	2015
15. Sc.-MgKKU03	-	Marigold	Khon Kaen	2015
16. Sc.-WaKKU01	Watermelon	-	Khon Kaen	2015
17. Sc.-BeKKU01	Cowpea	-	Khon Kaen	2015
18. Sc.-GAKKU01	-	Bean	Khon Kaen	2015
19. Sc.-LeKKU01	-	Long Bean	Khon Kaen	2016
20. Sc.-LeKKU02	Long Bean	-	Khon Kaen	2015

ควบคุม หรือมีองค์ประกอบภายในเส้นใยลดน้อยลง เช่นในกรรมวิธีที่ได้รับเชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-B.K., *Bacillus*-B.029 และ *Bacillus*-032 ส่วนในกรรมวิธีที่ได้รับเชื้อ *S. marcescens* เส้นใยของเชื้อ *S. rolfii* มีขนาดใหญ่ขึ้น บวมพองหรือหักงอมากกว่าเส้นใยปกติ

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเม็ดสเคลอโรเทียมที่ได้จากการทดสอบ dual culture bioassay

เมื่อนำเม็ดสเคลอโรเทียมจากไอโซเลต *Sclerotium*-ToKKU01 และ *S. rolfii*-MeKKU01 ที่เกิดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากทดสอบ dual culture bioassay มาตรวจสอบความมีชีวิตโดยกำหนดตัวบ่งชี้ความมีชีวิตคือ สามารถงอกเส้นใยได้เมื่อนำมาวางไว้บนอาหาร WA ภายใน 2 วัน พบว่าเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อ *S. rolfii* ทั้งสองไอโซ

เลตที่ได้รับสารเมตะบอไลต์ที่ปลดปล่อยออกจากเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *Bacillus* spp. ไอโซเลตต่างๆ และ *Streptomyces*-PR87 ลงสู่อาหารทดสอบนั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำกว่าเม็ดสเคลอโรเทียมจากกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ใช้ *S. marcescens* ที่มีการงอกได้ 100% มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *S. rolfii* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ dual culture bioassay (Table 3)

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเทียมในสภาพโรงเรือนทดลอง

ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเทียม เมื่อประเมินที่ 4 สัปดาห์ (ภายหลังจากการปลูกเชื้อ *S. rolfii*-ToKK1 ได้ 1 สัปดาห์)

Table 2 Percentages Inhibition growth of mycelium *Sclerotium rolfsii* by various antagonistic bacteria as measure by dual culture bioassay

Treatment	Percentages Inhibition growth of <i>S. rolfsii</i> (%) ¹				
	Isolate of <i>Sclerotium rolfsii</i>				
	ScT0KK01	ScJaKK01	ScJaKK02	ScLeKK01	ScMeKK01
<i>Streptomyces</i> -PR87	15.64 ^{cd}	0	34.36 ^e	21.37 ^a	0
<i>B.subtilis</i> -PRKKU.1	64.41 ^{ab}	60.31 ^b	67.95 ^{ab}	58.97 ^a	57.44 ^a
<i>Bacillus</i> -B.K.	50.26 ^b	57.69 ^b	61.80 ^{abc}	54.36 ^a	58.20 ^a
<i>Bacillus</i> -NTS3	45.64 ^{ab}	64.36 ^{ab}	61.02 ^{abc}	54.87 ^a	51.28 ^a
<i>Bacillus</i> -MS4	51.03 ^{ab}	65.13 ^b	61.79 ^a	55.89 ^a	53.85 ^a
<i>Bacillus</i> -029	38.72 ^c	47.95 ^b	55.64 ^{de}	49.23 ^a	30.77 ^b
<i>Bacillus</i> -032	46.92 ^{ab}	54.87 ^b	59.49 ^{bc}	56.66 ^a	82.82 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -033	48.46 ^a	54.61 ^b	61.47 ^{cd}	53.07 ^a	55.39 ^a
<i>S. marcescens</i>	30.77 ^d	7.69 ^c	12.82 ^e	0	0
F-test	**	**	**	**	**
%CV	11.81	17.51	9.17	20.69	17.26

Table 3 Effects of extracellular secondary metabolites from antagonistic bacteria to germination of sclerotia of *S.rolfsii* isolated from tomato and melon after dual culture bioassay for 14

Treatment	Germination of sclotia on WA(%) ^{1/}	
	Sc-T0KKU01	Sc-MeKKU01
ST- PR87	53.00cde	43.00e
<i>B. subtilis</i> -PRKKU.1	43.00de	60.00de
<i>Bacillus</i> -K.	39.00e	59.00de
<i>Bacillus</i> -NTS3	60.00cd	64.00cd
<i>Bacillus</i> -MS4	53.00cde	67.00bcd
<i>Bacillus</i> -029	51.00cde	84.00ab
<i>Bacillus</i> -032	68.00bc	79.00bcd
<i>Bacillus</i> -033	83.00ab	55.00de
<i>S. marcescens</i>	100.00a	100.00a
Control PDA	100.00a	100.00a
F-test	**	**
%CV	20.49	17.72

¹ Each value within a column by same letter(S) are not significantly different at P<0.05 using DMRT.

Table 4 Efficacy of antagonistic bacteria (9 isolates) to control sclerotium wilt disease (after inoculation) and bacterial spot disease (natural infection) after application by injection or spraying method

Treatment	% diseased plants after inoculation with <i>S. rolfsii</i>	% of bacterial spot disease plants
Inject + <i>Serratia marcescens</i>	100.00 ^a	25.00 ^b
Inject + <i>Streptomyces</i> -PR87	10.00 ^{ghi}	20.00 ^c
Inject + <i>B.subtilis</i> -PRKKU.1	15.00 ^{ght}	25.00 ^b
Inject + <i>Bacillus</i> -B.K.	20.00 ^{ght}	14.00 ^d
Inject + <i>Bacillus</i> -NTS3	10.00 ^{ght}	6.00 ^e
Inject + <i>Bacillus</i> -MS4	5.00 ^{hi}	16.200 ^d
Inject + <i>Bacillus</i> -029	20.00 ^{ght}	0.00 ^f
Inject + <i>Bacillus</i> -032	20.00 ^{ght}	50.00 ^a
Inject + <i>Bacillus</i> -033	10.00 ^{ght}	0.00 ^f
Inject + control (sterile distilled water)	70.00 ^{cd}	25.00 ^b
Spray + <i>Serratia marcescens</i>	75.00 ^{bc}	27.00 ^b
Spray + <i>Streptomyces</i> -PR87	35.00 ^{ef}	25.00 ^b
Spray + <i>B. subtilis</i> -PRKKU.1	30.00 ^{efg}	25.00 ^b
Spray + <i>Bacillus</i> -B.K.	15.00 ^{fghi}	24.00 ^b
Spray + <i>Bacillus</i> -NTS3	25.00 ^{gh}	0.00 ^f
Spray + <i>Bacillus</i> -MS4	0.00 ⁱ	15.00 ^d
Spray + <i>Bacillus</i> -029	50.00 ^{de}	3.00 ^e
Spray + <i>Bacillus</i> -032	60.00 ^{cd}	0.00 ^f
Spray + <i>Bacillus</i> -033	100.00 ^a	0.00 ^f
Spray + Control (sterile distilled water)	95.00 ^{ab}	25.00 ^b
F-test(A*B)	**	**
(%)CV	45.05	15.96

* Each value represent the five replication and Mean within a column by same letter(S) are not significantly different at P<0.05 using DMRT, ns = non significantly. Antagonist activity, I : Inhibition of interaction with Sclerotium-ToKKU01 Isolate and Antagonistic bacterial Isolate factor test.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อรา *S. rolfsii* มีพืชอาศัยกว้าง และมีความหลากหลายในลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA ทั้งความเร็วในการสร้างเส้นใยและการสร้างเม็ดสเคลอโรเตียม เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

เชื้อรา *S. rolfsii* ได้อย่างชัดเจน และกว้างขวางทำให้เส้นใยของเชื้อ *S. rolfsii* มีลักษณะผิดปกติลดความมีชีวิตของเม็ดสเคลอโรเตียมได้ และการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมของมะเขือเทศในโรงเรือนทดลองที่คัดเลือกไว้ 3 ไชโยเขต ได้แก่ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-NTS3 และ *Bacillus*-BK น่าจะมีศักยภาพสูงในการเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโด

ไฟโตที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยว สเคลอโรเทียมด้วย เมื่อประเมินจากผลการทดสอบทั้งวิธีการที่ฉีดเชื้อเข้าไปในลำต้นโดยตรงและการพ่นใบ/ลำต้นจำนวน 3 ครั้งห่างกันทุกสัปดาห์ ก่อนการปลูกเชื้อ *S. rolfii* และมีศักยภาพควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นตามสภาพธรรมชาติในระหว่างที่ทำการทดสอบด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของพริก-มะเขือเทศโดย dual culture bioassay เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถสร้างสาร IAA และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณมากตั้งแต่ 5.65-13.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87 ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ควบคุมโรคได้กว้างทั้งเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคที่สำคัญของพืชวงศ์แตง (ภัทรกร, 2548; เพชรรัตน์, 2551) โรคถอดฝักดาบของข้าว (ประภัสสร, 2560) ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสและควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของพริกได้ (รติกาล และคณะ, 2556) และผลิตสาร IAA ได้มาก ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสได้ (อัศศิริ และเพชรรัตน์, 2556; วิกรรณ์ 2557) พบว่า ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* ได้ต่ำกว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ไอโซเลต และมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงขยายเชื้อที่ใช้เวลานานกว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-NTS3 และ *Bacillus*-BK จึงเป็นเหมือนเชื้อปฏิปักษ์ทางเลือกใหม่ ที่เหมาะกับการวิจัยและพัฒนาต่อเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเทียม

โรคใบจุดแบคทีเรีย และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศด้วย ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้พิจารณาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชชนิดอื่นๆ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดียวกัน ส่วนเชื้อ *S. marcescens* ไอโซเลตที่ใช้ในการวิจัยนี้ยังเชื้อรา *S. rolfii* ได้เล็กน้อยในบางไอโซเลต แต่มีความสามารถในการสร้างสาร IAA ได้สูงมากที่สุด เชื้อเจริญเติบโตได้รวดเร็ว จึงน่าจะนำไปใช้ในแง่ของการเป็นจุลินทรีย์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งในด้านการใช้แบบเดี่ยวหรือการศึกษาการเข้ากันได้กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เพื่อนำไปใช้แบบ consortium ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการผลิตพืช หรือการนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าหรือโคนเน่าและเชื้อสาเหตุโรคทางใบเช่น ใบจุด ใบไหม้ อื่นๆ เช่นเดียวกับรายงานโดย Dhar Purkayastha et al., (2018) ที่ใช้ควบคุมโรคทางใบและรากเน่าของต้นชาที่เกิดจากเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae* (Root rot or diplodia) , *Rhizoctonia solani* (Root rot), *Sphaerostilbe repens* (Violet root rot), *Fomes lamaoensis* (Soft rot), *Ustilina zonata* (Stump rot), *Poria hypobrunnae* (Poria root rot and stem canker), *Pestalotiopsis theae* (Grey blight), *Colletotrichum camelliae* (Brown blight) *Curvularia eragrostidis* (Leaf spot) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นชาได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ

Table 5 Production of indole-3-acetic acid (IAA) from antagonistic bacterial isolates.

Antagonistic bacterial	Formation indole-3-acetic acid (IAA)(µg /ml.)
<i>Serratia marcescens</i>	35.24
<i>Bacillus subtilis</i> -PRKKU.1	6.93
<i>Bacillus</i> -B.K.	5.65
<i>Bacillus</i> -NTS3	13.56
<i>Bacillus</i> -MS4	6.63
<i>Bacillus</i> -029	9.56
<i>Bacillus</i> -032	4.08
<i>Bacillus</i> -033	14.01
<i>Streptomyces</i> -PR87	15.57

เอกสารอ้างอิง

- ปภัสสร สีลารักษ์. 2560. ประสิทธิภาพของเชื้อ *streptomyces*-PR15 และ *streptomyces*-PR87 ในการควบคุมโรคจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่นขอนแก่น.
- ภัทรกร ภูริชินวุฒิ. 2548. พันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* sub sp. *citrulli* และเชื้อรา *Didymellabryoniae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่นขอนแก่น.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2551. *Streptomyces* อีกมิติหนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. แก่นเกษตร. 30: 20-27.
- รัตติกาล ยุทธศิลป์, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อนันต์ หิรัญสาลี. 2556. ศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ปฏิบัติและวิธีการใช้สำหรับควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง. แก่นเกษตร. 41: 213-219
- อัศศิริ กลางสวัสดิ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2556. วิธีการใช้เชื้อ *Streptomyces*-PR87 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ. แก่นเกษตร. 41(พิเศษ 1): 205-212.
- วีรกรณ์ แสงไธย. 2557. บทบาทของ *Streptomyces* ปฏิบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิต้านทานโรคไวรัส TMV ของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- ศศิธร วุฒินิธิชัย. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- Boukaew, S., Plubrukam, A. and P. Prasertsan. 2013. Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. *Biocontrol* 4: 471-482.
- Dhar Purkayastha G, P. Mangar, A. Saha, and D. Saha. 2018. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *Plos ONE* 13(2): e019176. <https://DOI: 10.1371/journal.pone.0191761> (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191761>)
- Elizabeth, A., Emmert, B. and J. Handelsman. 1999. Biocontrol of plant disease : a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 1-9.
- Kamal, M.M., K.D. Linbeck, S. Savocchia, and G.J. Ash. 2015. Biological control of sclerotinia stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathology*. <https://DOI: 10.1111/ppa.12369>.
- Kator Liamngee, Hosea, Zakki Yula Hosea and Oche, Onah Daniel. 2015 . Sclerotium rolfsii; Causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Annals of Biological Research*. 11: 78-89.
- Ordentlich, A., Y. Elad, and I. Chet. 1987. Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 747-751.
- Schisler, DA., Slininger PJ., Behle RW. and Jackson MA. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. For Biological control of plant disease. *Phytopathology*. 94: 1267-1271.
- Sennoi, R., N. Singkham, S. Jogloy, S. Boonlue, W. Saksiriat, T. Kesmala, and A. Patanothai. 2013. Biological control of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Crop Protection*. 54: 148-153.
- Shafi, J., Hui Tian and Mingshan Ji. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:3, 446-459.
- Vurukonda, S.S.K.P.; D. Giovanardi, and E. Stefani. 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int. J. Mol. Sci*. 19: 952.