วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ปฏิปักษ์แบบกว้างและมีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือน สำหรับใช้ควบคุมโรคลำต้นเน่าดำมันสำปะหลัง

Screening for broad spectrum antagonistic *Bacillus* spp. with plant growth promotion capability from cassava stem and vermi-compost for control black stem rot disease of cassava

สุพิชญา เผยศิริ[1] และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล[1]*

Supichaya Phoeisiri[1] and Petcharat Thummabenjapone[1]*

[1] *สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[1] *Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแนวกว้างและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในจีนัส *Bacillus* spp. จากต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือน สำหรับใช้ควบคุมโรคลำต้นเน่าดำในมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ดำเนินการโดย แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากลำต้นมันสำปะหลังและจากตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนบนอาหาร NA คัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายจีนัส *Bacillus* spp. ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ คือ เชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Sclerotium rolfsii*, *Lasiodiplodia* sp. และ *Colletotrichum capsici* ด้วยเทคนิค dual culture bioassay ประเมินความสามารถด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 3 คุณสมบัติ ได้แก่ความสามารถในการสังเคราะห์ IAA, การละลายฟอสเฟต และการสร้างสาร siderophore ผลการดำเนินงาน ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 106 ไอโซเลต โดยมี 12 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้สำหรับทดสอบต่อไป คือ CS1, CS22, CS42, CS76, CS99, CS115, VCP-B3, VCP-B4, VCP-13, VCP-B14, VCP-B22 และ VCP-B24 นำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-NTS3 ซึ่งเป็น broad spectrum antagonist ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล โดยวิธี dual culture bioassay กับเชื้อรา *L. theobromae* ไอโซเลต LS02 และ LS08 ที่แยกได้จากอาการลำต้นเน่าดำของมันสำปะหลังจากจังหวัดระยอง และขอนแก่น ตามลำดับซึ่งเป็นไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรงที่สุด โดยผลการจำแนกระบุชนิดด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน internal transcribed spacer region ITS1-5.8S-ITS2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ primer ITS5f และ ITS4r พบว่า เป็นเชื้อรา *L. theobromae* เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต CS1, CS22 และ CS99 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้กว้างมากที่สุด 48.72-56.41 เปอร์เซ็นต์ โดยยับยั้งได้ดีกว่า *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-NTS3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ 2.91-7.41 µg/ml ละลายฟอสเฟตได้กว้างมีดัชนีการละลายฟอสเฟตที่ 1.17-1.22 และผลิตสาร siderophore ได้โดยมีดัชนีความกว้างของวงใสที่ 1.70-2.40 ผลการจำแนกชนิดโดยส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ระบุชนิดเป็น *Bacillus velezensis* จำนวน 10 ไอโซเลตซึ่งรวมทั้ง CS1, CS22 และ CS99 ส่วน *Bacillus*-CS115 จำแนกได้เป็น *B. thuringiensis* ในขณะที่ไอโซเลต VCP-B14 เป็นเชื้อ *Bacillus* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ดังนั้น *Bacillus velezensis*-CS1, CS22 และ CS99 จึงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์บาซิลลัสที่มีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชและสามารถควบคุมโรคพืชได้กว้างขวางสำหรับใช้ควบคุมโรคลำต้นเน่าดำและโรคอื่นๆ ที่สำคัญของมันสำปะหลังและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังด้วย ส่วน *Bacillus thuringiensis*-CS115 มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพและชีวภัณฑ์คุมโรคจากไส้เดือนฝอยรากปมและแมลงศัตรูพืช

คำสำคัญ: การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี; การผลิตมันสำปะหลังอย่างยั่งยืน; ชีวภัณฑ์คุมโรคพืช; ชีวภัณฑ์คุมแมลงศัตรูพืช; ปุ๋ยชีวภาพ

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th

Received: date; August 15, 2025 Revised: date; October 27, 2025

Accepted: date; October 27, 2025 Published: date; February 6, 2026

ABSTRACT: This research article had main objective for screening *Bacillus* spp. which being as broad-spectrum antagonistic bacteria and plant growth promotion as well. The *Bacillus* spp. isolates were isolated from healthy stem of cassava varieties and vermi-compost using NA medium. The Gram-positive bacteria which colony morphology resemble to *Bacillus* spp. were collected. The ability to inhibit growth of selected plant pathogenic bacteria *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pectobacterium carotovorum* and *Ralstonia solanacearum* were tested by dual culture bioassay. The ability to control the major plant pathogenic fungi, e.g., *Sclerotium rolfsii*, *Lasiodiplodia* spp. and *Colletotrichum capsici* were also tested by dual culture bioassay. Ability for plant growth promotion was evaluated using 3 criteria including the ability to produce indole-3-acetic acid (IAA), phosphate solubilization and siderophore production. Total 106 isolates were obtained, and 12 *Bacillus* isolates were good candidates for further testing to control *L. theobromae*, the causal agent of black stem rot disease of cassava. The ability of 12 selected *Bacillus* isolates to inhibit the growth of *Lasiodiplodia*-LS02 and -LS08 were tested by dual culture bioassay compared with the broad-spectrum antagonistic *Bacillus*-BS and *Bacillus*-NTS3 obtained from Assoc. Prof. Petcharat Thummabenjapone and control (agar disc) treatment. The *Lasiodiplodia*-LS02 and *Lasidiplodia*-LS08 were the most aggressive isolates. The species determination using the nucleotide sequence of internal transcribed spacer of ITS1 -5.8s-ITS2 region using primer ITS5f and ITS4r showed that the *Lasiodiplodia*-LS02 and *Lasiodiplodia*-LS08 were designated as *L. theobromae*. Results revealed that the 3 top isolates were CS1, CS22 and CS99, which strongly inhibited at 48.72-56.41 inhibition percentage, significantly better than the ability of *Bacillus*-BS and *Bacillus*-NTS3 isolates. They produced IAA at a rate of 2.91-7.41 µg/ml, phosphate solubilization index was 1.17-1.22 and produced siderophore with an index at 1.70-2.40. Based on the nucleotide sequence of 16S rDNA, 10 isolates of 12 selected antagonistic *Bacillus* spp. were *Bacillus velezensis* including the CS1, CS22 and CS99 isolates. The CS115 was *Bacillus thuringiensis*, while the VCB-B14 could not determine the species name. Therefore, the *B. velenzensis*-CS1, -CS22 and CS99 are high-potential isolates for developing bioproducts for controlling both black rot disease and other major diseases of cassava and promote the growth of cassava as well. In addition, the *B. thuringiensis*-CS115 could be used for biofertilizer and has high potential for controlling root knot nematode and insect pests for cassava.
Keyword: biological control; sustainable cassava production; bioproduct for control plant diseases; biopesticide; biofertilizer

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2567 มีการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมูลค่ารวมกว่า 110,276 ล้านบาท (สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า, 2568) ปัญหาสำคัญในการปลูกมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา คือ โรคลำต้นเน่าดำ และรากเน่าดำ (Black stem and root rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*, *L. euphorbicola* และ *L. pseudotheobromae* แต่ส่วนใหญ่เป็น *L. theobromae* ซึ่งส่งผลเสียต่อผลผลิตมันสำปะหลังเป็นอย่างมาก เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายได้ทั้งลำต้น ราก และหัว ทำให้ลำต้นเน่าแห้ง บริเวณที่เป็นโรคจะพบเส้นใยเชื้อราสีเทาเข้มหรือดำปกคลุม พบโครงสร้างพิคนีเดียของเชื้อสาเหตุโรคมีลักษณะเป็นตุ่มนูนบริเวณแผลสีดำหรือเทาเข้ม (Brito, 2020; สุทธิสา, 2558.) *L. theobromae* สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทุกระยะ ทนต่อสภาพแวดล้อมได้สูงและอยู่รอดได้ดีในดิน และยังเข้าทำลายพืชชนิดอื่นๆ ที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้ เช่น ทุเรียน อาโวคาโด มะม่วง เป็นต้น นอกจากนี้ในมันสำปะหลังยังมีโรคที่สำคัญอื่นๆ อีกได้แก่โรคใบไหม้จากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas manihotis*, โรคหัวเน่าจากเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* โรคเหี่ยวและหัวเน่าจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ โรคใบด่างมันสำปะหลังจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* เป็นต้น ในขณะที่ส่วนของต้นพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่ในปัจจุบันก็ยังมีเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญชนิดต่างๆ ที่ได้กล่าวข้างต้น ด้วย จึงทำให้การผลิตมันสำปะหลังได้รับความเสียหายจากโรคพืชที่หลากชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และโรคไวรัสที่ติดมากับท่อนพันธุ์ เกิดการกระจายระบาดเพิ่มเติมในแปลงปลูก และได้ผลผลิตต่ำ ประกอบกับพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังมักเป็นดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์และปลูกเป็นพื้นที่กว้าง การใส่ปุ๋ยเคมีเพิ่มเติมจึงทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสูง ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีเด่นหลายด้านทั้งความสามารถด้านการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชที่กว้างขวางและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปพร้อมๆ กันด้วยนั้น จึงเป็นแนวทางที่ยั่งยืนสำหรับการผลิตมันสำปะหลัง เพราะนอกจากจะช่วยลดสารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคพืชชนิดต่างๆ แล้ว ยังใช้กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ดีเหล่านี้มาช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินในแปลงปลูกพืชและลดการใช้ปุ๋ยเคมีสำหรับเพาะปลูกพืชได้

ในการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สกุล *Bacillus* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการเกษตร (Radhakrishnan et al., 2017) มีคุณลักษณะเด่นหลายประการ เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนทานต่อ สารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์แบคทีเรียปกติ (Kloepper et al., 2004) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้กว้าง มีกลไกในการควบคุมโรคพืชได้หลายด้าน เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์หลายชนิดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เช่น surfactin, iturin, fengymycin, bacilysin, rhizocticin, chlorotetain, bacitracin, glucanase และ chitinase เป็นต้น (Fan et al., 2017; Anckaert et al., 2021) *Bacillus* spp. เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ทำให้แข่งขันในการครอบครองพื้นที่กับเชื้อสาเหตุโรคพืช (competition) ได้ดีมาก และยังมีกลไกที่ชักนำพืชให้เกิดระบบภูมิต้านทานโรคพืช (induced systemic resistance, ISR) ด้วย (Shafi et al., 2017; Ramamoorthy et al., 2001) ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสด้วย

ในการวิจัยนี้ต้องการได้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้และเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วย เพื่อให้เหมาะสมกับมันสำปะหลังที่เพาะปลูกในสภาพพืชไร่ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไม่ทำให้พืชเกิดโรคแต่ช่วยให้เกิดประโยชน์แก่พืชได้ในหลายๆ ด้าน และ สามารถพบได้ทั้งในส่วนของราก ลำต้น และใบ จึงคัดเลือกจากเชื้อที่แยกได้จากภายในลำต้นของมันสำปะหลัง และค้นหาจากแหล่งอื่นที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืชมาเพิ่มเติม เช่น ปุ๋ยมูลไส้เดือน African night crawler (*Eudrilus eugeniae*) และ Tiger worm (*Eisenia foetida*) (อานัฐ, 2557; Pathma and Sakthivel, 2012) สำหรับนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับชุดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในพืชเศรษฐกิจ และเชื้อราสาเหตุโรคในมันสำปะหลัง โดยเน้นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าดำ รากเน่าดำเป็นต้นแบบในการดำเนินงานวิจัย ซึ่งเป้าหมายสุดท้ายคือการได้ไอโซเลตเชื้อ *Bacillus* ที่ดีเด่นสำหรับนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เอนกประสงค์ คุมโรคพืชได้กว้างขวางหลายโรคและมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังด้วย สำหรับใช้ลดปัญหาด้านโรคพืช ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับมันสำปะหลัง และช่วยลดต้นทุนการผลิตมันสำปะหลังได้อย่างยั่งยืน

วิธีการศึกษา

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นมันสำปะหลัง

เก็บรวบรวมตัวอย่างต้นมันสำปะหลังที่มีความสมบูรณ์ไม่เป็นโรคจำนวน 7 สายพันธุ์ จากเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ได้แก่ เกษตรศาสตร์50 ระยอง89 ระยอง11 ห้วยบง60 พิรุณ1 พิรุณ2 และมัน 5 นาที นำมาตัดเป็นชิ้นโดยตัดให้มีขนาดยาว 2 ซม./ชิ้น ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ ชิ้นส่วนต้นมันสำปะหลังใน 70% EtOH นาน 1 นาที, 2.5% NaOCl นาน 3 นาที และ ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อนาน 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง (ดัดแปลงวิธีการจาก Machado et al., 2014) นำมาบดให้ละเอียดและแยกเชื้อโดยวิธีการ serial dilution บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมานับจำนวนและคัดแยกโคโลนีของแบคทีเรียนำไปเลี้ยงทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (Stereoscopic microscope) ทดสอบชนิดแกรมโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 3% ตามวิธีการมาตรฐานในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 25% ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือน

นำปุ๋ยมูลไส้เดือนที่ได้จากแก่นพะยอมฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ African night crawler และ Tiger worm แยกเชื้อโดยวิธีการ serial dilution บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Gopalakrishnan et al., 2014) คัดแยกโคโลนีของแบคทีเรีย แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereoscopic microscope) ทดสอบชนิดแกรมโดยใช้สารละลาย KOH 3% ตามวิธีการมาตรฐานในการศึกษาคุณสมบัติ

ของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 25% ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคให้กับพืช

นำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากข้อ 1.1 และ 1.2 มาทดสอบการก่อโรคให้กับพืช โดยใช้ต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 28 วัน เป็นพืชทดสอบ เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีค่าการดูดซับแสง (absorbance) optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร OD_{600} เท่ากับ 0.2 (10^6 cfu/ml) นำไปปลูกเชื้อบนต้นพืชทดสอบโดยวิธีอัดใบ (Infiltration method) ดัดแปลงจาก Hoshikawa et al. (2019) ทำการทดลองจำนวน 2 ใบต่อต้น 3 ต้นต่อกรรมวิธี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธี Disease control (เชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของพริกและมะเขือเทศ) และกรรมวิธีควบคุมปกติที่ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อฉีดเข้าไปในใบพืชทดสอบ

ประเมินผลการทดสอบที่เวลา 2 วัน โดยสังเกตแผลฉ่ำน้ำที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกรรมวิธี Disease control วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์กว้างและมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture bioassay

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้จากต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือน, เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลตคือ *Bacillus*-Bs และ *Bacillus*-NTS3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคซึ่งได้แก่ เชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* และ *Pectobacterium carotovorum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสาเหตุโรคให้มีความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 0.2 (10^6 cfu/ml) แล้วนำไปทา (Swab plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เจาะชิ้นวุ้นที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญอยู่ จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นไปวางลงบนอาหาร NA ที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยเทคนิค dual culture bioassay บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชม. (ทวินันท์ และ เพชรรัตน์, 2564) วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คือ ชิ้นวุ้นอาหาร NA ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) นำไปเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture bioassay

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้จากต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือนและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลตคือ *Bacillus*-Bs และ *Bacillus*-NTS3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี streak plate บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 28°ซ. นาน 48 ชั่วโมง และเชื้อราสาเหตุโรคในมันสำปะหลังและในพืชอื่นๆ ได้แก่เชื้อ *Sclerotium rolfsii* และ *Colletotrichum capsici* ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ที่แยกได้จากอาการลำต้นเน่าดำมันสำปะหลัง มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดสอบโดยใช้ corkborer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ย้ายไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียตรงข้ามกันมีระยะห่างระหว่างเชื้อ 5 ซม. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 7-14 วัน วัดรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม วางแผนทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics ด้วยวิธี Duncan's Multiple

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Kabiret et al., 2012) PIRG = ((R1-R2)/R1) x 100 โดย R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราในกรรมวิธีควบคุม, R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราที่ทดสอบ

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสังเคราะห์ Indole-3-Acetic Acid (IAA)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้าย Single colony ลงในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่เติม 2mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น IAA โดยตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที และเติม 85% orthophosphoric acid จำนวน 2 หยด พร้อมเขย่า หลังจากนั้นเติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว จึงบ่มในที่มืด นำมาวัดความเข้มสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร (ทวินันท์ และ เพชรรัตน์, 2564) โดยหากมี IAA สารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู และนำค่า OD เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ IAA วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics ด้วยวิธี Duncan's Multiple

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria; PSB)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่ ย้ายไปวางบนอาหารทดสอบ Pikovskaya’s agar ที่ผสม 0.5% insoluble tricalcium phosphate $Ca_3(PO4)_2$ (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. นาน 7 วันถ้ามี กิจกรรมการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้น บนอาหารบริเวณขอบของโคโลนีจะเปลี่ยนจากลักษณะขุ่นเป็นวงใส (clear zone) ล้อมรอบโคโลนี วัดรัศมีโคโลนีและวงใสที่เกิดขึ้นเพื่อนำมาคำนวณค่า solubilization index (S.I.) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี+วงใส)/ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Collavino et al., 2010) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสาร siderophore

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.เจาะบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่ ย้ายไปวางบนอาหารทดสอบ Chrome azural S (CAS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. นาน 7 วัน (Schwyn and Neilands, 1987) ถ้ามีกิจกรรมการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ เกิดขึ้น บนอาหารบริเวณขอบของโคโลนีจะเปลี่ยนจากลักษณะขุ่นเป็นวงใสสีเหลือง (Yellow zone) ล้อมรอบโคโลนี วัดรัศมีโคโลนีและวงใสที่เกิดขึ้นเพื่อนำมาคำนวณค่า Solubilization index (S.I.) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี+วงใส)/ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

การแยกเชื้อบริสุทธิ์และทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. จากต้นมันสำปะหลัง

เก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Lasiodiplodia* spp.จากอาการลำต้นเน่าดำในมันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงอาการเป็นโรคลำต้นเน่าดำจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เกษตรศาสตร์50 ระยอง89 ระยอง11 ห้วยบง60 พิรุณ1 และพิรุณ2 ซึ่งได้มาจากแปลงปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น พันธุ์ระยอง 89 จากจังหวัดระยอง พันธุ์ห้วยบง60จากจังหวัดชลบุรี และพันธุ์ระยอง11จากจังหวัดสระบุรี มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยด้วยการแช่ชิ้นส่วนท่อนมันสำปะหลังด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที ตามด้วย 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) นาน 3 นาที และล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อนาน 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Machado et al., 2014) แล้วนำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธีการแยกสปอร์เดียว (single spore isolation) โดยทำการแยกเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Choi et al., 1999) จากนั้นชักนำให้เชื้อเกิดการสร้างสปอร์ภายใต้แสง near UV สลับ 12 ชั่วโมง โดยทำการบ่มเป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา (Compound light microscope) เก็บบันทึกข้อมูลลักษณะเส้นใยและสปอร์เชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมดเก็บรักษาไว้ในอาหารเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

ทดสอบการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

นำเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่คัดแยกได้ มาทดสอบการเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรคในตัวอย่างใบและท่อนมันสำปะหลัง โดยในตัวอย่างใบมันสำปะหลังปลูกเชื้อ (inoculation) ด้วยวิธีการ Agar plug ใช้เข็มเจาะลงบนใบมันสำปะหลังให้ทะลุ จำนวน 1 แผลต่อ 1 ใบย่อย 2 ใบย่อยต่อใบ จากนั้นวางชิ้นวุ้นเชื้อราขนาด 0.5 ซม.ลงบนแผล และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ส่วนท่อนมันสำปะหลังใช้ส่วนของลำต้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ซม. นำมาตัดให้ได้ความยาว 5 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยด้วยการแช่ชิ้นส่วนท่อนมันสำปะหลังด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที ตามด้วย 2.5% NaOCl นาน 3 นาที และล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อนาน 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้ง (ดัดแปลงวิธีการจาก Machado et al., 2014) ปลูกเชื้อลงบนท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง ด้วยวิธีการ Agar plug โดยใช้เชื้อราบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 7 วัน ทำแผลโดยการใช้เข็มเจาะลงไปลึก 5 มม. จากนั้นวางชิ้นวุ้นเชื้อราขนาด 0.5 ซม.ลงบนแผล และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองที่ 3, 5 และ 7 วัน โดยการวัดขนาดความยาวของแผลและนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test คัดเลือกเชื้อลักษณะที่ต่างกันที่มีความรุนแรงมาก ที่สุด 2 ลำดับ เพื่อให้มีความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การจำแนกระบุชนิดของเชื้อ *Lasiodiplodia* spp.ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นเน่าดำ

นำเชื้อราสาเหตุโรค *Lasiodiplodia* spp. ไอโซเลตที่มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค CTAB method ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1x TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในส่วน internal transcribed spacer region ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้ primers ITS5f (5’ GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3’) และ ITS4r (5’ TCCTCCGCTTATTGA TATGC 3’) (White et al., 1990) โดยใช้ PCR reaction 50 µl มีส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ 10X buffer, 2.5 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM primer (ITS5f และ ITS4r), และ 1U Taq DNA polymerase แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ Pre-Incubation ที่ 96°ซ. นาน 2 นาที แล้วเริ่มโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย Denature ที่96°ซ. นาน1 นาที, Annealing ที่ 53 °Cนาน1 นาที Extension ที่72°ซ.1 นาที 30 วินาที จำนวน 35 รอบ แล้ว Final Extension ที่ 72°ซ. นาน10 นาทีตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของส่วน 16s rRNA gene โดยการนำโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR จำนวน 4 µl ไปแยกขนาดด้วย 1 % agarose gel electrophoresis และนำเอา PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจากนั้นนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. สาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture bioassay

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้กว้างและมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ดีที่สุดจากข้อ 3 จำนวน 12 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-Bs และ *Bacillus*-NTS3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่ก่อโรครุนแรงที่สุด 2 ไอโซเลต ด้วยวิธีการ dual culture bioassay เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA โดยวิธี streak plate บ่มไว้ที อุณหภูมิ 28°ซ. นาน 48 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และเชื้อราสาเหตุโรคที่เตรียมไว้มาใช้ในการทดสอบโดยทำการใช้เข็มเขี่ยปลายมนที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ aseptic technique ขีดเชื้อแบคทีเรียให้มีความกว้าง 0.5 ซม. ยาว 9 ซม. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และใช้ corkborer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่ได้เป็น culture disk ย้ายไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการขีดด้วยเชื้อแบคทีเรียไว้ โดยวางเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในตำแหน่งที่ตรงข้ามกันมีระยะห่างระหว่างเชื้อ 2.5 ซม. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาเชื้อแบคทีเรียโดยเริ่มวัดจากรัศมีชิ้นวุ้นไปหาปลายเส้นใย

แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อขีดแทนเชื้อแบคทีเรีย การทดลองวางแผนแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Kabiret et al., 2012) PIRG = ((R1-R2)/R1) x100 โดย R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราในกรรมวิธีควบคุม, R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราที่ทดสอบ นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลความกว้างของรัศมีเส้นใยที่ถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) โดย ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS Statistics และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test จากนั้นนำเส้นใยมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเปรียบเทียบกับเส้นใยเชื้อราในกรรมวิธีควบคุม

การระบุและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ CS1, CS22, CS42, CS76, CS99, CS115-2, VCP-B3, VCP-B4, VCP-B13, VCP-B14, VCP-B22 และ VCP-B24 โดยดัดแปลงวิธีการจาก สุปรียา (2547) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียจากการดูดสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 3 มล. โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย Lysis buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K solution (ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มก./มล. ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 65°ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำมาเติม 20 เปอร์เซ็นต์ N-Lauroylsarcosine (sarkosyl) ปริมาตร 30 µl กำจัดตะกอนโปรตีนและเศษเซลล์โดยการเติม Chloroform : isoamyl อัตราส่วน 24 : 1 โดยปริมาตร 400 ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M Sodium acetate pH 5.2 ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร และเติม Isopropanol ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 20°ซ. นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % เอทานอล จำนวน 2 ครั้ง และตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 25 µl และนำดีเอ็นเอเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การเพิ่มปริมาณส่วน 16s rRNA gene ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำดีเอ็นเอจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สกัดได้ มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณส่วนยีน 16s rRNA โดยการใช้ primers 27f (5’ AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3’) และ 1492r (5’ GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3’) (Heuer et al, 1997) ทำใน PCR reaction 50 µl มีส่วนผสมต่างๆดังนี้ 2X Gold Taq 25 µl, dH_2O 15 µl,, 10µM primer f 1 µl, 10µM primer r 1 µl และ DNA Template 8 µl แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ Pre-Incubation ที่ 94°ซ. นาน 5 นาที ขั้นตอน Amplification ดำเนินการ 35 รอบ ประกอบด้วย Denature ที่ 94°ซ. นาน 30 วินาที - Annealing ที่ 49°ซ. นาน 30 วินาที – Extensionที่ 72°ซ. นาน 30 วินาที จากนั้นปิดท้ายด้วยFinal Extension ที่ 72°ซ. นาน 7 นาที และ Cooling ที่ 4°ซ. จนกว่าจะนำออกไปตรวจสอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR product 4 µl จากนั้นนำเอา PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบข้อมูลกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank

ผลการศึกษา

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นมันสำปะหลัง

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมันสำปะหลังระยอง89, ระยอง11, ห้วยบง60, พิรุณ 1, พิรุณ 2, เกษตรศาสตร์ 50 และ มัน 5 นาที ได้ทั้งหมด 62 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มลักษณะโคโลนี คือ 1) โคโลนีสีขาวขุ่นรูปร่างไม่แน่นอน จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ CS1, CS17, CS18, CS20, CS21, CS22, CS44, CS45 และ CS99 2) โคโลนีสีขาวขุ่นรูปร่างกลมผิวขรุขระ จำนวน 53 ไอโซเลต ได้แก่ CS3, CS7.2, CS9,

CS12, CS13, CS14, CS15, CS16, CS23, CS24, CS25, CS26, CS27, CS29, CS31, CS32, CS33, CS34, CS35, CS36, CS38, CS39, CS40, CS41, CS42, CS43, CS46, CS47, CS48, CS49, CS51, CS52, CS53, CS55, CS56, CS57, CS60, CS61, CS63, CS64, CS65, CS67, CS70, CS71, CS72, CS73, CS74, CS75, CS76, CS77, CS78, CS79 และ CS115-2

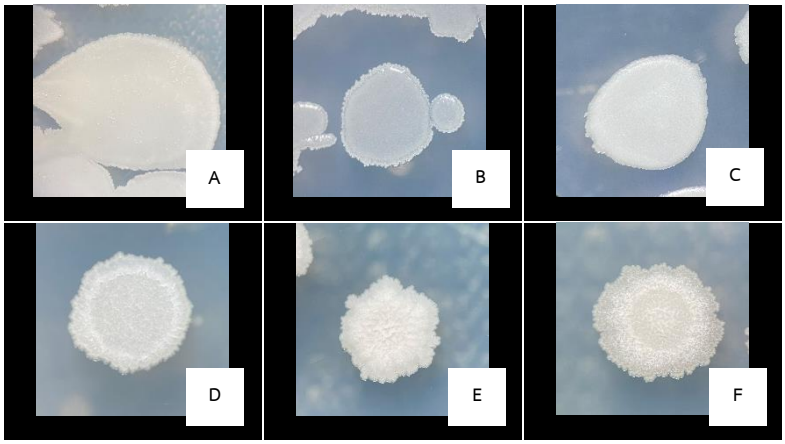


Figure 1 Examples of bacterial colony characteristics isolated from cassava, group 1: Irregular white, opaque colonies (A= CS1, B= CS18 and C= CS20) group 2: Round, rough-surfaced, white, opaque colonies (D=CS13, E=CS15 and F=CS57)

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือน

ปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้งสายพันธุ์ Tiger worm และ African Nightcrawler มีเชื้อแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมากทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ดำเนินการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเฉพาะแกรมบวกที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Bacillus* spp. จากปุ๋ยมูลไส้เดือนทั้งสองชนิด ได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มลักษณะโคโลนี คือ 1) โคโลนีสีขาวขุ่นรูปร่างไม่แน่นอนผิวขรุขระ จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ VCP-B3, VCP-B13, VCP-B14 และ VCP-B24 2) โคโลนีสีขาวขุ่นรูปร่างกลมขอบเรียบผิวขรุขระ จำนวน 40 ไอโซเลต ได้แก่ VCP-B1, VCP-B2, VCP-B4, VCP-B5, VCP-B6, VCP-B7, VCP-B8, VCP-B9, VCP-B10, VCP-B11, VCP-B12, VCP-B15, VCP-B16, VCP-B17, VCP-B18, VCP-B19, VCP-B20, VCP-B21, VCP-B22, VCP-B23, VCP-B25, VCP-B26, VCP-B27, VCP-B28, VCP-B29, VCP-B30, VCP-B31, VCP-B32, VCP-B33, VCP-B34, VCP-B35, VCP-B36, VCP-B37, VCP-B38, VCP-B39, VCP-B40, VCP-B41, VCP-B42, VCP-B43 และ VCP-B44

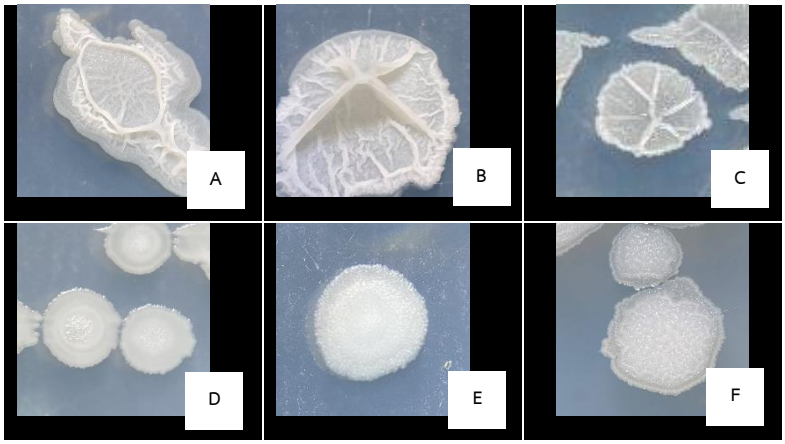


Figure 2 Examples of bacterial colony characteristics isolated from vermi-compost, group 1: Irregularly shaped, white, opaque colonies with rough surfaces (A= VCP-B3, B= VCP-B13 and C= VCP-B24) group 2: White, opaque colonies, round in shape, smooth edges, rough surface (D=VCP-B4, E=VCP-B15 and F=VCP-B37)

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคให้กับพืช

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นมันสำปะหลังทั้ง 62 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยมูลไส้เดือน จำนวน 44 ไอโซเลต มาทดสอบการก่อโรคให้กับพืชบนใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาด้วยวิธีอัดเข้าใบพืช (Infiltration method) ดัดแปลงจาก Hoshikawa et al. (2019) หลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแบคทีเรียทดสอบทุกไอโซเลตไม่ก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี disease control โดยใช้สารแขวนลอยเชื้อ *X. euvesicatoria* ที่เกิดแผลฉ่ำน้ำชัดเจนและกรรมวิธีควบคุมปกติที่ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อฉีดเข้าไปในใบพืชทดสอบไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์กว้างและมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช

ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากลำต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือนแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่นำมาทดสอบได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีสามารถยับยั้งเชื้อ *X. euvesicatoria* ได้ดีโดยเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 2 ซม. ขึ้นไป มี 71 ไอโซเลต ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต CS79 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างเท่ากับ 4.07 ซม. รองลงมาคือ ไอโซเลต *Bacillus*-NTS3 เท่ากับ 3.30 ซม. ตามด้วย ไอโซเลต CS9, CS51, CS15 และ CS12 เท่ากับ 3.03, 3.03, 3.02 และ 3.01 ซม. ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. carotovorum* ได้ดีโดยเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 2 ซม.ขึ้นไป มี 18 ไอโซเลต ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต CS13 และ CS9 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างเท่ากับ 2.56 และ 2.50 ซม. ตามลำดับ รองลงมาคือ ไอโซเลต CS14 เท่ากับ 2.49 ซม. ตามด้วย ไอโซเลต *Bacillus*-BS, CS7.2, CS12 และ CS3 มีความกว้างของวงใสเท่ากับ 2.41, 2.40, 2.37 และ 2.35 ซม. ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 2 ซม. มีจำนวนทั้งหมด 61 ไอโซเลต ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต CS76 และ CS29 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างเท่ากับ เท่ากับ 2.88 และ 2.83 ซม. ตามลำดับ รองลงมาคือ ไอโซเลต *Bacillus*-NTS3, CS31 และ CS42 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างเท่ากับ 2.79, 2.77 และ 2.74 ซม. ตามลำดับ **(Table 1)**

ทดสอบความสามารถเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากลำต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือนแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่นำมาทดสอบได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50% มีจำนวน 66 ไอโซเลต ไอโซเลตที่มีความสามารถมากที่สุดคือ VCP-B32 และ CS67 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เท่ากับ 60.58 และ 60.00% ตามลำดับ รองลงมาคือ CS16, VCP-B3, CS9, CS46, CS57 และ VCP-B23 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 59.81, 59.81, 59.42, 59.42, 59.23 และ 59.23% ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Lasiodiplodia* spp. ได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50%ขึ้นไป มีจำนวนทั้งหมด 12 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่มีความสามารถมากที่สุดคือ CS99, CS22 และ CS1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 60.19, 59.81 และ 59.62% ตามลำดับ รองลงมาคือ CS76 เท่ากับ 58.08% ตามด้วย CS65 เท่ากับ 55.39% เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. capsici* ได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50% มีจำนวน 84 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่มีความสามารถมากที่สุดคือ VCP-B12 และ VCP-B13 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เท่ากับ 87.88 และ 87.69% ตามลำดับ รองลงมาคือ VCP-B3 และ VCP-B32 เท่ากับ 86.15% ตามด้วย CS99, VCP-B23, VCP-B36 และ *Bacillus*-NTS3 เท่ากับ 84.81, 84.81, 84.62 และ 84.43% ตามลำดับ **(Table 1)**

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสังเคราะห์ Indole-3-Acetic Acid (IAA)

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความสามารถในการสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) ได้ ยกเว้นไอโซเลต VCP-B35 และ VCP-B36 ที่ไม่สร้าง IAA เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ดี มีค่าอยู่ที่ 2.00-7.41 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้ IAA ที่ทราบความเข้มข้น มีจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่มีความสามารถในการ

สังเคราะห์ IAA ได้มากที่สุด คือ CS22 และ CS42 เท่ากับ 7.41 และ 7.19 µg/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ CS99 เท่ากับ 5.74 µg/ml ตามด้วย VCP-B39 และ CS115-2 เท่ากับ 4.09 และ 3.99 µg/ml ตามลำดับ **(Table 1)**

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการละลายฟอตเฟต (Phosphate solubilizing bacteria; PSB)

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบ พบว่าทุกไอโซเลตมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ ยกเว้นไอโซเลต VCP-B35, VCP-B36 และ VCP-B39 โดยค่าดัชนีการละลายมีค่าอยู่ที่ 0.50-1.73 ไอโซเลตที่มีความสามารถมากที่สุด คือ VCP-B4 เท่ากับ 1.73 รองลงมาคือ VCP-B21, VCP-B16 และ VCP-B17 เท่ากับ 1.60, 1.54 และ 1.54 ตามลำดับ ตามด้วย VCP-B5, VCP-B10 และ VCP-B42 เท่ากับ 1.49, 1.46 และ 1.44 ตามลำดับ **(Table 1)**

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสาร siderophore

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความสามารถในการสร้างสาร siderophore ได้ ยกเว้นไอโซเลต VCP-B35, VCP-B36 และ VCP-B39 โดยค่าดัชนีการละลายมีค่าอยู่ที่ 0.50-3.57 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างสาร siderophore ได้มากที่สุด คือ ไอโซเลต CS42, CS13 และ CS75 เท่ากับ 3.57, 3.54 และ 3.48 ตามลำดับ รองลงมาคือ ไอโซเลต CS15, VCP-B22 และ VCP-B37 เท่ากับ 3.09, 3.07 และ 3.02 ตามลำดับ ตามด้วยไอโซเลต CS73 และ CS70 เท่ากับ 2.97 และ 2.92 ตามลำดับ **(Table 1)**

Table 1 Results of the antagonistic effect of bacteria isolated from cassava stems and vermi-compost against the pathogenic bacteria and fungi and their plant growth promotion activities

Isolates	Clear zone (mm.)[1/2/]			Inhibition of mycelium growth (%)[1/2/] of pathogenic fungi			IAA production (µg/ml)[1/2/]	solubilization index (S.I)[1/2/]	
	X. euvesicatoria	*P. carotovorum*	*R. solanacearum*	*S. rofsii*	*Lasiodiplodia* spp.	*C. capsici*		Phosphate	siderophore
CS1	2.55 ± 0.06^{I-T}	1.70 ± 0.07^{RST}	2.62 ± 0.05^{EFG}	55.39 ± 1.88^{F-O}	59.62 ± 3.80^{A}	82.69 ± 1.93^{A-F}	2.91 ± 0.20^{GHI}	1.17 ± 0.01^{T-d}	2.40 ± 0.28^{I-Y}
CS3	2.96 ± 0.09^{C-F}	2.35 ± 0.09^{C}	2.46 ± 0.27^{IJ}	48.08 ± 0.44^{UV}	45.38 ± 2.17^{G-M}	79.62 ± 0.44^{B-G}	2.23 ± 0.08^{L-R}	1.08 ± 0.03^{c-g}	2.37 ± 0.26^{K-Z}
CS7.2	2.82 ± 0.09^{C-I}	2.40 ± 0.07^{C}	2.35 ± 0.03^{KLM}	56.15 ± 2.66^{D-M}	26.54 ± 3.79^{Y-c}	81.16 ± 0.99^{A-G}	1.84 ± 0.06^{R-b}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.43 ± 0.11^{I-X}
CS9	3.03 ± 0.10^{BC}	2.50 ± 0.04^{AB}	2.36 ± 0.11^{KL}	59.42 ± 0.74^{A-D}	26.54 ± 5.42^{Y-c}	79.62 ± 1.60^{B-G}	1.82 ± 0.12^{R-b}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.49 ± 0.32^{H-X}
CS12	3.01 ± 0.12^{C-F}	2.37 ± 0.03^{C}	2.41 ± 0.03^{JKL}	56.35 ± 1.31^{D-L}	24.81 ± 3.52^{Z-c}	76.73 ± 2.30^{D-G}	1.62 ± 0.24^{V-d}	1.08 ± 0.01^{c-g}	2.17 ± 0.14^{R-c}
CS13	2.65 ± 0.08^{G-P}	2.56 ± 0.06^{A}	2.56 ± 0.07^{FGH}	55.58 ± 1.15^{F-O}	31.16 ± 8.06^{S-a}	76.15 ± 1.66^{F-G}	1.65 ± 0.23^{V-d}	1.12 ± 0.03^{W-f}	3.54 ± 0.57^{AB}
CS14	2.91 ± 0.09^{C-G}	2.49 ± 0.08^{B}	2.61 ± 0.22^{EFG}	56.35 ± 1.31^{D-L}	19.61 ± 9.03^{cd}	76.73 ± 0.97^{D-G}	1.55 ± 0.18^{W-d}	1.08 ± 0.01^{a-g}	2.42 ± 0.49^{I-Y}
CS15	3.02 ± 0.08^{CDE}	1.74 ± 0.02^{PQR}	2.68 ± 0.14^{DE}	55.00 ± 2.98^{G-P}	40.58 ± 9.76^{K-R}	77.31 ± 0.44^{C-G}	1.65 ± 0.09^{V-d}	1.00 ± 0.00^{g}	3.09 ± 0.20^{BCD}
CS16	2.98 ± 0.36^{C-F}	1.53 ± 0.02^{Z}	2.15 ± 0.02^{R-W}	59.81 ± 3.47^{ABC}	39.23 ± 7.87^{M-R}	80.58 ± 1.32^{A-G}	0.61 ± 0.09^{m-s}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.61 ± 0.36^{F-S}
CS17	1.86 ± 0.04^{YZ}	1.53 ± 0.00^{Z}	1.71 ± 0.03^{mno}	54.62 ± 1.40^{G-R}	31.35 ± 3.52^{S-a}	81.93 ± 1.83^{A-F}	1.81 ± 0.15^{R-b}	1.08 ± 0.01^{a-g}	1.21 ± 0.30^{T-d}
CS18	2.81 ± 0.06^{C-I}	2.21 ± 0.12^{D}	2.26 ± 0.06^{NOP}	54.62 ± 1.40^{G-R}	25.96 ± 3.52^{Y-c}	81.93 ± 2.04^{A-F}	3.52 ± 0.27^{EF}	1.07 ± 0.02^{efg}	1.60 ± 0.14^{e-l}
CS20	2.52 ± 0.02^{J-U}	2.04 ± 0.01^{GH}	2.19 ± 0.06^{P-S}	53.66 ± 1.58^{J-S}	28.46 ± 8.45^{V-b}	76.73 ± 1.45^{D-G}	2.77 ± 0.10^{G-K}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.20 ± 0.49^{Q-b}
CS21	2.51 ± 0.13^{K-V}	2.04 ± 0.03^{GH}	1.78 ± 0.02^{klm}	53.47 ± 1.33^{K-S}	29.62 ± 4.24^{U-b}	80.77 ± 1.09^{A-G}	1.67 ± 0.16^{V-d}	1.11 ± 0.02^{X-f}	2.35 ± 0.28^{L-Z}
CS22	2.73 ± 0.04^{E-N}	1.94 ± 0.06^{IJK}	2.56 ± 0.05^{GH}	55.00 ± 0.99^{G-P}	59.81 ± 2.03^{A}	82.31 ± 1.41^{A-F}	7.41 ± 1.06^{A}	1.17 ± 0.05^{T-c}	2.06 ± 0.30^{X-e}
CS23	2.95 ± 0.09^{C-F}	1.66 ± 0.05^{S-V}	2.61 ± 0.07^{EFG}	57.69 ± 1.99^{A-G}	30.00 ± 11.93^{T-b}	78.27 ± 2.38^{B-G}	1.07 ± 0.12^{e-l}	1.08 ± 0.02^{a-g}	2.34 ± 0.14^{L-Z}
CS24	2.54 ± 0.03^{I-T}	2.06 ± 0.03^{FG}	2.17 ± 0.02^{Q-T}	51.35 ± 1.71^{R-U}	27.31 ± 8.08^{W-b}	77.11 ± 0.74^{C-G}	0.47 ± 0.48^{o-v}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.43 ± 0.33^{I-X}
CS25	2.21 ± 0.06^{WX}	2.11 ± 0.08^{EF}	2.02 ± 0.02^{Z-g}	51.54 ± 1.66^{Q-T}	37.12 ± 7.86^{N-S}	81.93 ± 0.99^{A-F}	1.96 ± 0.45^{p-w}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.61 ± 0.43^{E-R}
CS26	2.93 ± 0.22^{C-G}	1.65 ± 0.01^{S-V}	2.04 ± 0.05^{X-f}	49.04 ± 4.14^{TUV}	23.08 ± 5.51^{bcd}	81.16 ± 0.99^{A-G}	1.83 ± 0.23^{R-b}	1.08 ± 0.00^{b-g}	2.28 ± 0.30^{N-b}
CS27	2.21 ± 0.01^{WX}	1.98 ± 0.01^{HI}	1.86 ± 0.05^{ijk}	49.04 ± 1.93^{TUV}	30.58 ± 2.77^{S-a}	80.96 ± 1.16^{A-G}	1.01 ± 0.32^{i-n}	1.09 ± 0.01^{a-g}	2.36 ± 0.36^{K-Z}
CS29	2.73 ± 0.16^{F-N}	1.92 ± 0.18^{I-L}	2.83 ± 0.08^{AB}	57.31 ± 1.83^{A-H}	34.23 ± 7.60^{Q-W}	77.11 ± 1.16^{C-G}	3.55 ± 0.22^{DE}	1.09 ± 0.02^{Z-g}	2.11 ± 0.34^{U-d}
CS31	2.75 ± 0.08^{D-M}	1.91 ± 0.01^{I-M}	2.77 ± 0.04^{BC}	56.15 ± 0.63^{D-M}	46.92 ± 4.44^{E-K}	80.19 ± 2.77^{A-G}	1.47 ± 0.10^{Y-g}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.65 ± 0.45^{D-Q}
CS32	2.50 ± 0.01^{K-V}	2.07 ± 0.05^{FG}	2.10 ± 0.05^{T-Z}	53.66 ± 1.31^{J-S}	25.00 ± 4.00^{Y-c}	78.27 ± 1.71^{B-G}	2.00 ± 0.13^{O-V}	1.07 ± 0.04^{efg}	2.43 ± 0.35^{I-X}
CS33	2.87 ± 0.09^{C-H}	1.82 ± 0.09^{NO}	2.41 ± 0.09^{JKL}	56.15 ± 1.40^{D-M}	26.54 ± 5.04^{Y-c}	79.42 ± 1.46^{B-G}	2.05 ± 0.31^{O-V}	1.12 ± 0.02^{X-f}	2.52 ± 0.60^{G-W}
CS34	2.80 ± 0.09^{C-J}	1.55 ± 0.04^{XYZ}	2.14 ± 0.12^{S-W}	57.89 ± 4.32^{A-G}	29.04 ± 2.12^{U-b}	77.50 ± 0.74^{C-G}	1.73 ± 0.05^{T-c}	1.08 ± 0.01^{d-g}	2.38 ± 0.38^{J-Y}
CS35	2.52 ± 0.09^{K-U}	1.61 ± 0.09^{V-Y}	2.16 ± 0.02^{R-U}	57.50 ± 0.39^{A-G}	16.93 ± 9.23^{d}	81.73 ± 1.93^{A-G}	1.45 ± 0.43^{Z-i}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.38 ± 0.40^{J-Z}
CS36	2.45 ± 0.09^{N-W}	1.92 ± 0.09^{I-L}	2.64 ± 0.09^{EF}	57.89 ± 7.33^{A-G}	39.42 ± 5.16^{L-R}	78.08 ± 0.99^{C-G}	1.51 ± 0.48^{W-e}	1.08 ± 0.01^{b-g}	1.92 ± 0.78^{Z-g}
CS38	2.36 ± 0.07^{R-W}	1.89 ± 0.04^{J-M}	2.11 ± 0.04^{S-Y}	51.93 ± 1.60^{P-T}	51.54 ± 4.74^{B-G}	77.69 ± 0.63^{C-G}	0.91 ± 0.25^{j-o}	1.08 ± 0.00^{b-g}	2.63 ± 0.32^{D-R}
CS39	2.34 ± 0.12^{R-W}	1.64 ± 0.07^{S-W}	2.50 ± 0.01^{HI}	53.85 ± 1.09^{I-S}	31.54 ± 2.09^{S-Z}	77.69 ± 0.63^{C-G}	2.36 ± 0.16^{K-Q}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.61 ± 0.13^{F-S}
CS40	2.33 ± 0.10^{S-W}	1.53 ± 0.02^{Z}	2.03 ± 0.03^{Y-f}	58.65 ± 2.21^{A-F}	34.42 ± 4.50^{Q-V}	77.88 ± 1.16^{C-G}	1.02 ± 0.27^{g-n}	1.09 ± 0.04^{Z-g}	2.18 ± 0.20^{R-c}
CS41	2.42 ± 0.05^{O-W}	1.53± 0.02^{Z}	1.97 ± 0.03^{e-h}	52.31 ± 1.26^{O-T}	24.62 ± 3.50^{Z-c}	77.69 ± 0.89^{C-G}	1.22 ± 0.14^{d-k}	1.07 ± 0.01^{efg}	2.06 ± 0.25^{W-e}
CS42	2.65 ± 0.07^{G-Q}	1.85 ± 0.06^{MN}	2.74 ± 0.09^{CD}	50.96 ± 2.47^{S-V}	54.04 ± 2.02^{A-D}	66.73± 2.02^{HI}	7.19 ± 0.34^{A}	1.28 ± 0.03^{M-S}	3.57± 0.54^{A}
CS43	2.36 ± 0.09^{R-W}	1.77± 0.02^{OPQ}	1.93 ± 0.03^{hij}	52.70 ± 0.99^{N-S}	45.38 ± 7.40^{G-M}	73.85± 2.43^{GH}	2.89 ± 0.68^{GHI}	1.11 ± 0.01^{X-f}	2.20 ± 0.47^{Q-c}

Table 1 Results of the antagonistic effect of bacteria isolated from cassava stems and vermi-compost against the pathogenic bacteria and fungi and their plant growth promotion activities (Continue)

Isolates	Clear zone (mm.)[1/2/]			Inhibition of mycelium growth (%)[1/2/] of pathogenic fungi			IAA production	solubilization index (S.I)[1/2/]	
	X.	*P.*	*R.*	*S. rofsii*	*Lasiodiplodia* spp.	*C. capsici*	(µg/ml)[1/2/]	Phosphate	siderophore
CS44	2.75 ± 0.11^{D-M}	1.60 ± 0.05^{V-Y}	2.12 ± 0.09^{S-X}	56.92 ± 0.63^{B-J}	40.58 ± 2.77^{K-R}	77.88 ± 1.46^{C-G}	2.81 ± 0.15^{G-J}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.73 ± 0.27^{D-N}
CS45	2.34 ± 0.10^{R-W}	1.95 ± 0.11^{IJ}	2.34 ± 0.06^{LMN}	56.54 ± 1.93^{C-K}	50.19 ± 2.21^{C-H}	78.27 ± 0.74^{B-G}	2.37 ± 0.21^{J-P}	1.13 ± 0.02^{V-f}	2.83 ± 0.33^{D-J}
CS46	2.55 ± 0.10^{I-T}	1.64 ± 0.03^{S-W}	2.09 ± 0.10^{T-a}	59.42 ± 1.32^{A-D}	53.85 ± 2.43^{A-E}	77.11 ± 0.74^{C-G}	1.50 ± 0.06^{X-f}	1.08 ± 0.01^{a-g}	2.33 ± 0.23^{M-a}
CS47	2.48 ± 0.03^{L-W}	1.59 ± 0.07^{V-Z}	2.04 ± 0.03^{Y-f}	54.81 ± 1.3^{G-Q}	43.85 ± 4.53^{H-N}	76.73 ± 0.74^{D-G}	1.72 ± 0.02^{U-c}	1.08 ± 0.01^{d-g}	2.26 ± 0.27^{O-b}
CS48	2.23 ± 0.03^{VWX}	2.07 ± 0.05^{FG}	2.08 ± 0.05^{U-c}	53.66 ± 0.39^{J-S}	34.42 ± 5.08^{Q-V}	77.11 ± 0.39^{C-G}	1.88 ± 0.04^{R-a}	1.11 ± 0.05^{X-f}	2.83 ± 0.21^{D-J}
CS49	2.20 ± 0.05^{WX}	2.10 ± 0.04^{EFG}	2.07 ± 0.01^{W-d}	55.96 ± 2.62^{E-N}	41.73 ± 9.96^{I-P}	77.88 ± 0.74^{C-G}	2.38 ± 0.22^{J-P}	1.10 ± 0.02^{Y-f}	2.09 ± 0.18^{V-d}
CS51	3.03 ± 0.17^{BCD}	1.54 ± 0.05^{YZ}	2.25± 0.05^{OPQ}	51.54 ± 2.27^{Q-T}	40.96 ± 5.16^{J-Q}	79.23 ± 0.00^{B-G}	1.92 ± 0.48^{Q-Y}	1.13 ± 0.05^{V-f}	1.97 ± 0.38^{Y-f}
CS52	2.91 ± 0.13^{C-G}	1.63 ± 0.05^{T-W}	2.03 ± 0.10^{Y-f}	53.85 ± 2.17^{I-S}	31.35 ± 3.69^{S-a}	77.31 ± 0.44^{C-G}	1.65 ± 0.43^{V-d}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.46 ± 0.35^{H-X}
CS53	2.78 ± 0.06^{C-K}	1.86 ± 0.09 ^{LMN}	2.09 ± 0.05^{U-a}	54.04 ± 0.96^{H-S}	48.27 ± 5.45^{D-I}	77.31 ± 0.99^{C-G}	1.26 ± 0.15^{d-k}	1.08 ± 0.01^{b-g}	2.53 ± 0.27^{G-V}
CS55	2.41 ± 0.15^{O-W}	2.12 ± 0.07^{EF}	2.27 ± 0.04^{MNO}	47.69 ± 1.66^{V}	35.39 ± 5.26^{P-V}	76.92 ± 2.26^{C-G}	2.43 ± 0.14^{J-O}	1.07 ± 0.01^{efg}	2.40 ± 0.27^{I-Y}
CS56	2.52 ± 0.04^{K-U}	1.54 ± 0.05^{YZ}	2.02 ± 0.01^{Z-g}	53.85 ± 1.66^{I-S}	24.42 ± 4.96^{abc}	77.31 ± 0.44^{C-G}	2.54 ± 0.27^{I-N}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.55 ± 0.38^{G-V}
CS57	2.66 ± 0.13^{G-O}	1.57 ± 0.07^{W-Z}	2.05 ± 0.05^{X-e}	59.23 ± 2.51^{A-E}	39.42 ± 2.62^{L-R}	76.92 ± 0.63^{C-G}	1.43 ± 0.41^{b-i}	1.08 ± 0.01^{d-g}	2.61 ± 0.18^{E-R}
CS60	2.86 ± 0.08^{C-H}	1.54 ± 0.04^{YZ}	2.05 ± 0.01^{X-f}	51.93 ± 2.22 $^{P-T}$	33.85 ± 1.40^{R-X}	77.50 ± 0.39^{C-G}	1.80 ± 0.15^{R-b}	1.06 ± 0.02^{efg}	2.52 ± 0.18^{G-W}
CS61	2.47 ± 0.18^{M-W}	1.53 ± 0.02^{Z}	2.08 ± 0.02^{U-b}	57.12 ± 1.81^{B-I}	27.12 ± 3.68^{X-b}	77.69 ± 0.63^{C-G}	1.92 ± 0.16^{Q-Y}	1.04 ± 0.09^{fg}	2.15 ± 0.45^{S-d}
CS63	2.62 ± 0.12^{H-R}	1.61 ± 0.05^{V-Y}	2.14 ± 0.09^{S-W}	55.39 ± 1.08^{F-O}	30.58 ± 2.91^{S-a}	81.73 ± 1.32^{A-G}	1.31 ± 0.14^{c-j}	1.10 ± 0.02^{Y-f}	2.69 ± 0.67^{D-O}
CS64	2.48 ± 0.16^{L-W}	1.88 ± 0.02^{K-N}	2.03 ± 0.10^{Z-g}	55.96 ± 2.21^{E-N}	28.84 ± 4.93^{V-b}	78.85 ± 1.60^{B-G}	1.40 ± 0.22^{b-i}	1.08 ± 0.01^{a-g}	2.81 ± 0.30^{D-K}
CS65	2.45 ± 0.05^{N-W}	1.89 ± 0.11^{J-M}	2.23 ± 0.08^{O-R}	56.16 ± 2.17^{D-M}	55.39 ± 4.30^{ABC}	77.11 ± 0.74^{C-G}	2.20 ± 0.14^{M-S}	1.07 ± 0.01^{efg}	2.84 ± 0.17^{D-I}
CS67	2.61 ± 0.11^{H-S}	1.54 ± 0.05^{YZ}	2.07 ± 0.05^{W-d}	60.00 ± 5.37^{AB}	46.73 ± 5.80^{F-K}	76.54 ± 0.44^{EFG}	1.66 ± 0.16^{V-d}	1.08 ± 0.01^{c-g}	2.80 ± 0.29^{D-L}
CS70	2.25 ± 0.1^{U-X}	1.54± 0.04^{YZ}	2.00 ± 0.01^{b-h}	49.04 ± 3.47^{TUV}	47.50 ± 5.27^{D-K}	75.96 ± 0.96^{FG}	2.15 ± 0.27^{N-U}	1.08 ± 0.01^{c-g}	2.92 ± 0.53^{D-H}
CS71	2.37 ± 0.07^{Q-W}	1.70 ± 0.08^{QRS}	2.57± 0.04^{FGH}	50.96 ± 2.03^{S-V}	39.23 ± 7.08^{M-K}	79.23 ± 1.66^{B-G}	1.94 ± 0.23^{P-X}	1.08 ± 0.01^{c-g}	2.43 ± 0.20^{I-X}
CS72	2.61 ± 0.13^{H-S}	1.55 ± 0.04^{XYZ}	2.01 ± 0.02^{a-h}	51.54 ± 1.89^{Q-T}	44.04 ± 9.70^{H-N}	77.11 ± 0.97^{C-G}	1.44 ± 0.13^{a-i}	1.08 ± 0.03^{a-g}	2.21 ± 0.12^{P-b}
CS73	2.56 ± 0.07^{I-T}	1.53 ± 0.03^{Z}	2.00 ± 0.01^{c-h}	53.85 ± 0.89^{I-S}	34.23 ± 12.94^{Q-W}	77.11 ± 0.39^{C-G}	1.77 ± 0.21^{S-b}	1.08 ± 0.03^{d-g}	2.97 ± 0.36^{D-G}
CS74	2.54 ± 0.05^{I-T}	1.62 ± 0.02^{U-X}	2.02 ± 0.03^{Z-g}	51.93 ± 2.39^{P-T}	40.58 ± 13.72^{K-R}	76.92 ± 1.09^{C-G}	1.63 ± 0.26^{V-d}	1.08 ± 0.00^{b-g}	2.78 ± 0.28^{D-M}
CS75	2.74 ± 0.05^{E-N}	1.59 ± 0.01^{V-Z}	1.97 ± 0.01^{fgh}	52.89 ± 2.12^{M-S}	50.19 ± 7.12^{C-H}	78.65 ± 0.74^{B-G}	1.46 ± 0.08^{Z-h}	1.08 ± 0.01^{d-g}	3.48 ± 0.13^{ABC}
CS76	2.99 ± 0.12^{C-F}	1.95 ± 0.07^{IJ}	2.88 ± 0.01^{A}	55.96 ± 1.45^{E-N}	58.08 ± 3.63^{AB}	81.16 ± 0.44^{A-G}	2.24 ± 0.08^{L-R}	1.09 ± 0.01^{Z-g}	2.45 ± 0.16^{I-X}
CS77	2.30 ± 0.06^{T-X}	1.69 ± 0.01^{R-U}	2.08 ± 0.04^{V-c}	55.58 ± 3.34^{F-O}	31.93 ± 5.53^{S-Y}	76.15 ± 0.89^{F-G}	1.65 ± 0.27^{V-d}	1.10 ± 0.02^{Y-f}	2.27 ± 0.53^{O-b}
CS78	2.95 ± 0.13^{C-F}	1.63 ± 0.03^{UVW}	1.95 ± 0.08^{ghi}	47.69 ± 2.95^{V}	34.23 ± 17.50^{Q-W}	77.69 ± 1.41^{C-G}	1.43 ± 0.20^{b-i}	1.08 ± 0.01^{c-g}	2.47 ± 0.52^{H-X}
CS79	4.07 ± 1.92^{A}	1.81 ± 0.10^{NOP}	2.56 ± 0.08^{GH}	50.96 ± 0.97^{S-V}	42.88 ± 13.75^{I-O}	75.58 ± 1.31^{F-G}	1.90 ± 0.99^{R-Z}	1.18 ± 0.03^{T-a}	2.17 ± 0.32^{R-c}
CS99	2.57 ± 0.02^{I-T}	1.76 ± 0.10^{O-R}	2.59 ± 0.06^{FG}	57.50 ± 0.74^{A-G}	60.19 ± 3.52^{A}	84.81 ± 0.38^{ABC}	5.74 ± 0.25^{B}	1.22 ± 0.20^{Q-V}	1.70 ± 0.11^{d-j}
CS115	0.60 ± 0.00^{fg}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	13.08 ± 1.09^{ab}	7.69 ± 0.00^{e}	33.46 ± 9.94^{Q}	3.99 ± 0.25^{CD}	1.24 ± 0.09^{P-U}	1.16 ± 0.04^{lmn}
VCP-B1	1.77 ± 0.02^{YZa}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	46.15 ± 0.89^{P}	0.53 ± 0.12^{o-v}	1.37 ± 0.10^{E-M}	1.47 ± 0.05^{g-n}
VCP-B2	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	45.77 ± 0.44^{P}	0.45 ± 0.41^{p-v}	1.43 ± 0.07^{D-H}	1.16 ± 0.07^{k-n}
VCP-B3	2.47 ± 0.10^{M-W}	1.81 ± 0.04^{NOP}	2.15 ± 0.03^{R-W}	55.96 ± 3.79^{E-N}	52.31 ± 0.63^{B-G}	86.15 ± 2.17^{AB}	2.67 ± 0.90^{H-L}	1.17 ± 0.03^{T-b}	2.14 ± 0.22^{T-d}

Table 1 Results of the antagonistic effect of bacteria isolated from cassava stems and vermi-compost against the pathogenic bacteria and fungi and their plant growth promotion activities.

(Continue)

Isolates	Clear zone (mm.)[1/2/]			Inhibition of mycelium growth (%)[1/2/] of pathogenic fungi			IAA production (µg/ml)[1/2/]	solubilization index (S.I)[1/2/]	
	X. euvesicatoria	*P. carotovorum*	*R. solanacearum*	*S. rofsii*	*Lasiodiplodia* spp.	*C. capsici*		Phosphate	siderophore
VCP-B4	0.97 ± 0.09^{de}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00^{T}	2.77 ± 0.35^{G-K}	1.73 ± 0.13^{A}	1.74 ± 0.11^{c-i}
VCP-B5	0.88 ± 0.06^{ef}	0.50 ± 0.00^{c}	0.79 ± 0.00^{r}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	1.08 ± 0.38^{e-l}	1.49 ± 0.14^{CD}	1.61 ± 0.13^{e-k}
VCP-B6	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	23.08 ± 0.00^{XY}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	1.06 ± 0.12^{f-m}	1.37 ± 0.08^{E-M}	1.14 ± 0.05^{mn}
VCP-B7	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	24.23 ± 4.59^{X}	0.00 ± 0.00^{f}	44.81 ± 0.73^{P}	1.23 ± 0.30^{d-k}	1.20 ± 0.05^{S-X}	1.14 ± 0.13^{mn}
VCP-B8	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	48.46 ± 1.41^{M-P}	0.22 ± 0.16^{q-w}	1.35 ± 0.09^{G-N}	1.07 ± 0.02^{n}
VCP-B9	0.87 ± 0.03^{ef}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	55.39 ± 0.88^{J-M}	0.09 ± 0.03^{vw}	1.34 ± 0.02^{H-O}	1.16 ± 0.09^{k-n}
VCP-B10	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.75 ± 0.00^{lmn}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	55.77 ± 4.00^{J-M}	3.37 ± 0.93^{EF}	1.46 ± 0.21^{CDE}	1.71 ± 0.16^{d-j}
VCP-B11	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.66 ± 0.00^{o}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	57.50 ± 0.97^{JK}	1.50 ± 0.31^{X-f}	1.43 ± 0.04^{D-H}	1.84 ± 0.12^{b-h}
VCP-B12	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.65 ± 0.00^{o}	56.35 ± 2.62^{D-L}	53.47 ± 0.44^{A-F}	87.88 ± 0.39^{A}	0.44 ± 0.20^{p-w}	1.40 ± 0.15^{D-J}	1.88 ± 0.07^{a-g}
VCP-B13	2.96 ± 0.08^{C-F}	1.75 ± 0.07^{O-R}	2.42± 0.06^{IJK}	59.81 ± 4.32^{ABC}	46.34 ± 0.39^{G-L}	87.69 ± 0.63^{A}	3.09 ± 0.30^{FGH}	1.25 ± 0.02^{N-T}	2.67 ± 0.56^{D-P}
VCP-B14	2.57 ± 0.02^{I-T}	1.59 ± 0.16^{V-Z}	2.26 ± 0.14^{NOP}	30.77 ± 0.00^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	46.15 ± 0.63^{P}	2.61 ± 0.26^{I-M}	1.21 ± 0.05^{R-W}	2.56 ± 0.48^{F-U}
VCP-B15	2.05 ± 0.14^{XY}	0.50 ± 0.00^{c}	0.93 ± 0.00^{q}	7.69 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.86 ± 0.56^{k-p}	1.30 ± 0.06^{K-R}	1.83 ± 0.29^{b-h}
VCP-B16	0.50± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	7.88 ± 0.39^{de}	0.00 ± 0.00^{f}	57.69 ± 1.78^{JK}	0.18 ± 0.24^{s-w}	1.54 ± 0.10^{BC}	1.11 ± 0.03^{n}
VCP-B17	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.76 ± 0.00^{lmn}	13.46 ± 6.78^{a}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.22 ± 0.08^{s-w}	1.54 ± 0.20^{BC}	1.33 ± 0.05^{i-n}
VCP-B18	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	7.69 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}	54.42 ± 1.58^{J-O}	1.01 ± 0.10^{h-n}	1.33 ± 0.08^{I-P}	1.20 ± 0.17^{k-n}
VCP-B19	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	8.65 ± 1.46^{cde}	0.00 ± 0.00^{f}	51.16 ± 1.33^{K-P}	1.63 ± 0.16^{V-d}	1.39 ± 0.09^{E-K}	1.07 ± 0.02^{n}
VCP-B20	1.09 ± 0.04^{cde}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	12.50 ± 2.62^{ab}	0.00 ± 0.00^{f}	59.23 ± 0.00^{IJ}	0.14 ± 0.10^{uvw}	1.36 ± 0.11^{F-M}	1.20 ± 0.47^{k-n}
VCP-B21	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.83 ± 0.00^{kl}	53.85 ± 2.17^{I-S}	47.69 ± 1.09^{D-J}	82.89 ± 0.74^{A-F}	0.17 ± 0.08^{s-w}	1.60 ± 0.16^{B}	1.49 ± 0.12^{g-n}
VCP-B22	2.76 ± 0.03^{C-L}	1.03 ± 0.05^{a}	2.38 ± 0.05^{JKL}	11.15 ± 3.69^{a-d}	0.00 ± 0.00^{f}	36.34 ± 0.39^{Q}	3.19 ± 0.34^{EFG}	1.38 ± 0.10^{E-L}	3.07 ± 0.24^{CDE}
VCP-B23	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	59.23 ± 2.27^{A-E}	0.00 ± 0.00^{f}	84.81 ± 1.15^{ABC}	0.24 ± 0.11^{q-w}	1.44 ± 0.17^{D-G}	1.61 ± 0.54^{e-l}
VCP-B24	2.38 ± 0.06^{O-W}	2.07 ± 0.02^{FG}	2.16 ± 0.07^{R-V}	11.35 ± 4.23^{abc}	0.00 ± 0.00^{f}	56.73 ± 1.70^{JKL}	2.17 ± 0.26^{M-T}	1.08 ± 0.01^{a-g}	2.48 ± 0.21^{H-X}
VCP-B25	0.85 ± 0.06^{ef}	0.50 ± 0.00^{c}	1.69 ± 0.00^{no}	7.69 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}	46.54 ± 1.33^{OP}	0.19 ± 0.08^{s-w}	1.23 ± 0.03^{Q-U}	1.17 ± 0.10^{k-n}
VCP-B26	0.50 ± 0.00^{g}	0.5 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	31.54 ± 5.03^{W}	0.00 ± 0.00^{f}	48.85 ± 2.22^{L-P}	0.28 ± 0.13^{q-w}	1.15 ± 0.01^{U-e}	1.35 ± 0.15^{i-n}
VCP-B27	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.71 ± 0.00^{rs}	10.00 ± 2.27^{b-e}	0.00 ± 0.00^{f}	11.73 ± 3.47^{S}	0.51 ± 0.31^{o-v}	1.39 ± 0.02^{E-K}	1.27 ± 0.15^{j-n}
VCP-B28	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.64 ± 0.00^{s}	20.58 ± 8.96^{YZ}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	1.44 ± 0.04^{a-i}	1.25 ± 0.03^{O-T}	1.40 ± 0.22^{h-n}
VCP-B29	1.80 ± 0.02^{YZ}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	9.04 ± 2.21^{cde}	0.00 ± 0.00^{f}	47.31 ± 0.44^{NOP}	0.35 ± 0.08^{q-w}	1.31 ± 0.08^{J-Q}	1.09 ± 0.04^{n}
VCP-B30	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	11.54 ± 2.59^{abc}	0.00 ± 0.00^{f}	60.39 ± 0.44^{IJ}	0.27 ± 0.08^{q-w}	1.12 ± 0.01^{X-f}	1.22 ± 0.07^{k-n}
VCP-B31	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	1.85 ± 0.00^{jk}	17.50 ± 1.46^{Z}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.55 ± 0.33^{o-u}	1.39 ± 0.07^{E-K}	1.59 ± 0.16^{f-l}
VCP-B32	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	60.58 ± 2.97^{A}	0.00 ± 0.00^{f}	86.15 ± 1.54^{AB}	0.45 ± 0.41^{o-u}	1.23 ± 0.01^{Q-U}	1.57 ± 0.95^{f-m}
VCP-B33	2.37 ± 0.07^{P-W}	1.06 ± 0.00^{a}	1.99 ± 0.02^{d-h}	53.08 ± 2.26^{L-S}	0.00 ± 0.00^{f}	82.31 ± 2.18^{A-F}	0.14 ± 0.23^{uvw}	1.17 ± 0.00^{t-c}	2.23 ± 0.07^{O-b}
VCP-B34	2.40 ± 0.04^{O-W}	0.76 ± 0.06^{b}	1.69 ± 0.03^{no}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.31 ± 0.63^{q-w}	1.07 ± 0.00^{efg}	2.24 ± 0.15^{O-b}
VCP-B35	1.80 ± 0.11^{YZ}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.00 ± 0.00^{w}	0.00 ± 0.00^{j}	0.00 ± 0.00^{p}
VCP-B36	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	56.15 ± 2.74^{D-M}	0.00 ± 0.00^{f}	84.62 ± 1.25^{A-D}	0.00 ± 0.00^{w}	0.00 ± 0.00^{j}	0.00 ± 0.00^{p}

Table Results of the antagonistic effect of bacteria isolated from cassava stems and vermi-compost against the pathogenic bacteria and fungi and their plant growth promotion activities.

(Continue)

Isolates	Clear zone (mm.)[1/2/]			Inhibition of mycelium growth (%)[1/2/]of pathogenic fungi			IAA production (µg/ml)[1/2/]	solubilization index (S.I)[1/2/]	
	X. euvesicatoria	*P. carotovorum*	*R. solanacearum*	*S. rofsii*	*Lasiodiplodia* spp.	*C. capsici*		Phosphate	siderophore
VCP-B37	2.38 ± 0.08^{O-W}	1.53 ± 0.02^{Z}	2.26 ± 0.05^{NOP}	55.19 ± 2.97^{G-P}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.24 ± 0.15^{q-w}	1.13 ± 0.00^{V-e}	3.02 ± 0.42^{DEF}
VCP-B38	1.69 ± 0.04^{Za}	0.81 ± 0.08^{b}	1.15 ± 0.05^{P}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	77.69 ± 0.89^{C-G}	0.66 ± 0.10^{L-q}	1.18 ± 0.07^{T-Z}	1.58 ± 0.23^{f-m}
VCP-B39	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	21.92 ± 43.85^{R}	4.09 ± 0.73^{C}	0.00 ± 0.00^{i}	0.00 ± 0.00^{p}
VCP-B40	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	8.27 ± 1.16^{cde}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.64 ± 0.60^{L-r}	1.41 ± 0.12^{D-I}	1.17 ± 0.07^{k-n}
VCP-B41	1.52 ± 0.10^{ab}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	55.19 ± 36.96^{J-N}	1.62 ± 0.59^{V-d}	1.31 ± 0.04^{J-Q}	1.35 ± 0.30^{i-n}
VCP-B42	1.19 ± 0.07^{cd}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	7.69 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}	75.38 ± 0.00^{FG}	0.20 ± 0.06^{r-w}	1.44 ± 0.08^{DEF}	1.21 ± 0.09^{k-n}
VCP-B43	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.66 ± 0.00^{s}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.37 ± 0.11^{q-w}	1.28 ± 0.30^{L-S}	1.21 ± 0.05^{k-n}
VCP-B44	1.33 ± 0.03^{bc}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	11.35± 3.16^{abc}	0.00 ± 0.00^{f}	60.77 ± 0.00^{IJ}	0.16 ± 0.11^{t-w}	1.30 ± 0.03^{K-R}	1.23 ± 0.07^{k-n}
BS	2.59 ± 0.14^{H-S}	2.41 ± 0.06^{C}	2.46 ± 0.09^{IJ}	54.81 ± 4.37^{G-Q}	36.73 ± 3.84^{O-T}	83.27 ± 1.16^{A-F}	2.57 ± 0.32^{I-N}	1.25 ± 0.05^{P-T}	2.58 ± 0.54^{F-T}
NTS3	3.30 ± 0.04^{B}	2.16 ± 0.06^{DE}	2.79 ± 0.16^{BC}	55.96 ± 3.79^{E-N}	35.96 ± 8.27^{O-U}	84.43 ± 0.97^{A-E}	0.61 ± 0.34^{n-t}	1.19 ± 0.05^{S-Y}	2.51 ± 0.10^{H-X}
Control	0.50 ± 0.00^{g}	0.50 ± 0.00^{c}	0.50 ± 0.00^{t}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{T}	0.00 ± 0.00^{w}	0.50 ± 0.00^{h}	0.50 ± 0.00^{o}
F-test	*	*	*	**	**	**	**	**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.05**).

[2/]Data represent means ± SD of three replication.

การแยกเชื้อบริสุทธิ์และทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. จากต้นมันสำปะหลัง

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ รา *Lasiodiplodia* spp.จากอาการลำต้นเน่าดำในมันสำปะหลัง

แยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลต ได้แก่ LS01, LS02, LS03, LS04, LS05, LS06, LS07, LS08, LS09, LS10, LS11, LS12, LS13 และ LS14 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 2 วัน เส้นใยเชื้อราจะเจริญเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยมีสีขาว ฟู เมื่ออายุ 7 วัน เส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อนไปจนถึงเทาดำ เมื่อชักนำให้มีการสร้างสปอร์ เชื้อมีการสร้างพิคนีเดียที่เป็นกลุ่มเส้นใยสีเทาดำและสร้างคอนนิเดียรูปร่างกลมรี สีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา มีผนังกั้น 1 ขั้น โดยเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 14 ไอโซเลต มีความสามารถสร้างพิคนิเดียและคอนนิเดียในลักษณะเดียวกันได้ทั้งหมด **(Figure 3, Table 1)**

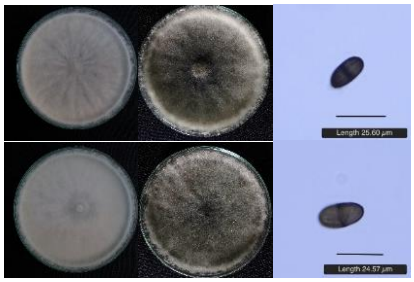


Figure 3 Characteristic of mycelium at 2 and 7 days on PDA and spore after induction of *Lasiodiplodia theobromae* isolate LS02 (upper) and LS08 (lower)

ทดสอบการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. จำนวน 14 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ มีความสามารถในการก่อโรคให้กับพืชทดสอบได้ แต่มีแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยในส่วนของความรุนแรงของอาการโรค ลักษณะแผลที่ปลูกเชื้อพบเส้นใยสีเทาเจริญอยู่และมีอาการเนื้อเยื่อตายบนใบพืชที่ปลูกเชื้อ บนส่วนท่อนพันธุ์มีอาการเน่าดำมีการสร้างพิคนิเดียเจริญอยู่บนแผล เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่แสดงอาการเกิดโรค ไอโซเลต *Lasiodiplodia*-LS02 จากแหล่งปลูกจังหวัดระยองและ ไอโซเลต *Lasiodiplodia*-LS08 จากแหล่งปลูกจังหวัดขอนแก่น ทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่บนส่วนใบที่ปลูกเชื้อ เฉลี่ย 5.42-5.45 ซม. และเมื่อปลูกเชื้อบนส่วนท่อนพันธุ์ พบแผลยาว 5.12-5.42 ซม. เปรียบเทียบกับขนาดแผลบนใบและลำต้นของกรรมวิธีควบคุมที่มีความยาว 0.5 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **(Table 2)**

Table 2 Results of disease incidence test in cassava leaves and cassava cuttings

Treatment	detail	Leaf /wound size (cm)[1/]	Cutting /wound size (cm)[1/]
LS01	Kasetsart50/Khonkaen	4.02 ± 0.53[c]	1.73 ± 0.33[c]
LS02	Rayong89/Rayong	5.42 ± 0.67[a]	5.12 ± 0.58[a]
LS03	Piroon1/Khon Kaen	0.77 ± 0.06[c]	1.62 ± 0.13[c]
LS04	Rayong89/Khon Kaen	0.06 ± 0.08[c]	1.82 ± 0.18[c]
LS05	Rayong89/Khon Kaen	0.78 ± 0.08[c]	1.97 ± 0.34[c]
LS06	Rayong11/Khon Kaen	0.67 ± 0.06[c]	1.27 ± 0.03[c]
LS07	Rayong11/Khon Kaen	0.72 ± 0.03[c]	2.17 ± 0.38[c]
LS08	Rayong11/ Khon Kaen	5.45 ± 0.20[a]	5.42 ± 0.14[a]
LS09	Rayong11/ Saraburi	2.98 ± 1.89[b]	3.97 ± 1.44[b]
LS10	Huai Bong60/ Chonburi	0.68 ± 0.08[c]	2.01 ± 0.25[c]
LS11	Huai Bong60/ Chonburi	0.70 ± 0.10[c]	1.90 ± 0.41[c]
LS12	Huai Bong60/ Chonburi	0.75 ± 0.10[c]	1.43 ± 0.10[c]
LS13	Piroon2/Khon Kaen	2.10 ± 1.86[c]	1.98 ± 0. 40[c]
LS14	Piroon2/Khon Kaen	0.60 ± 0.00[c]	1.65 ± 0.18[c]
control	Distilled water	0.50 ± 0.00[d]	0.50 ± 0.00[d]
F-test		**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.05**).

[2/]Data represent means ± SD of three replication.

จัดจำแนกและระบุชนิดเชื้อราที่คัดแยกได้จากอาการลำต้นเน่าดำมันสำปะหลัง

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงในพืชทดสอบมากที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลต คือ LS02 และ LS08 มาจัดจำแนกและระบุชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน internal transcribed spacer region ITS1-ITS2 พบว่า ทั้งสองไอโซเลตได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 541 bp และ 548 bp ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อราทั้งสองไอโซเลตมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* accession MN180881.1100 และ OR733558.1 สูงสุด 100% ดังนั้นจึงระบุชนิดได้ว่า LS02 และ LS08 เป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้ในการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ด้วยวิธี dual culture bioassay

แบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ CS1, CS22, CS42, CS76, CS99, CS115, VCP-B3, VCP-B4, VCP-B13, VCP-B14, VCP-B22, VCP-B24 และ *Bacillus*-BS, *Bacillus*-NTS3 ที่นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *L. theobromae*-LS02 และ *L. theobromae*-LS08 ด้วยเทคนิค dual culture bioassay มีความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *L. theobromae*-LS02 ได้ดีที่สุด คือ CS22 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.38% รองลงมาคือ ไอโซเลต CS1 และ CS99 เท่ากับ 48.72 และ 45.64% ตามลำดับ ตามด้วยไอโซเลต VCP-B14 และ VCP-B3 เท่ากับ 40.00 และ 39.49% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lasiodiplodia*-LS08 นั้นพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลต CS22, CS1 และ VCP-B3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.41, 54.87 และ 52.3% ตามลำดับ รองลงมาคือ ไอโซเลต CS99 เท่ากับ 48.72% ตามด้วยไอโซเลต VCP-B14 เท่ากับ 40.00% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-BS (ยับยั้งได้ 28.01%, 28.20%) และ *Bacillus*-NTS3 (ยับยั้งได้ 32.3% และ 31.28%) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต CS115 และ VCP-B4 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. theobromae* LS02 และ *L. theobromae*-LS08 ได้ ในขณะนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตอื่นๆ ยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* ทั้งสองไอโซเลตไปในระดับใกล้เคียงกัน ยกเว้นไอโซเลต VCP-B22 ที่ยับยั้ง *L. theobromae*-LS02 ได้ต่ำกว่า *L. theobromae*-LS08 อย่างชัดเจน

เมื่อนำเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* บริเวณที่เกิดแนวยับยั้งที่อายุ 7 วัน มาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยจากกรรมวิธีที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเส้นใยปกติ คือ เส้นใยบวมพองและบิดงอ ผนังหนาขึ้นโดยมีความแตกต่างกันบ้างตามไอโซเลตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ อย่างไรก็ตามพบว่าเส้นใย *L. theobromae* ในกรรมวิธีที่ใช้ไอโซเลต CS115 และ VCP-B4 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเส้นใยได้เล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยปกติในกรรมวิธีควบคุม **(Table 3, Figure 6)** ดังนั้นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงสุด 3 อันดับแรกสำหรับการยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ CS1, CS22 และ CS99

Table 3 Dual culture bioassay between antagonistic bacteria and *Lasiodiplodia* spp. isolates LS02 and LS-08

Isolates	Inhibition of mycelium growth (%)[1/] of pathogenic fungi	
	Lasiodiplodia-LS02	*Lasiodiplodia*-LS08
CS1	48.72 ± 0.89^{b}	54.87 ± 0.89^{a}
CS22	55.38 ± 1.54^{a}	56.41 ± 0.89^{a}
CS42	17.95 ± 0.89^{f}	21.03 ± 0.89^{e}
CS76	30.77 ± 0.00^{e}	28.72 ± 2.35^{d}
CS99	45.64 ± 0.89^{bc}	48.72 ± 2.35^{b}
CS115	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{f}
VCP-B3	39.49 ± 0.89^{d}	52.31 ± 1.54^{ab}
VCP-B4	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{f}
VCP-B13	31.79 ± 0.89^{e}	31.79 ± 0.89^{d}
VCP-B14	40.00 ± 9.23^{cd}	40.00 ± 9.23^{c}
VCP-B22	10.77 ± 1.54^{g}	22.56 ± 3.87^{e}
VCP-B24	19.49 ± 3.87^{f}	22.56 ± 2.35^{e}
BS	28.21 ± 5.40^{e}	28.21 ± 3.87^{e}
NTS3	32.31 ± 6.15^{e}	31.28 ± 0.89^{d}
Control	0.00 ± 0.00^{h}	0.00 ± 0.00^{f}
F-test	**	**

[1/]Means in a same column followed by the different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P<0.05**).

[2/]Data represent means ± SD of three replication.

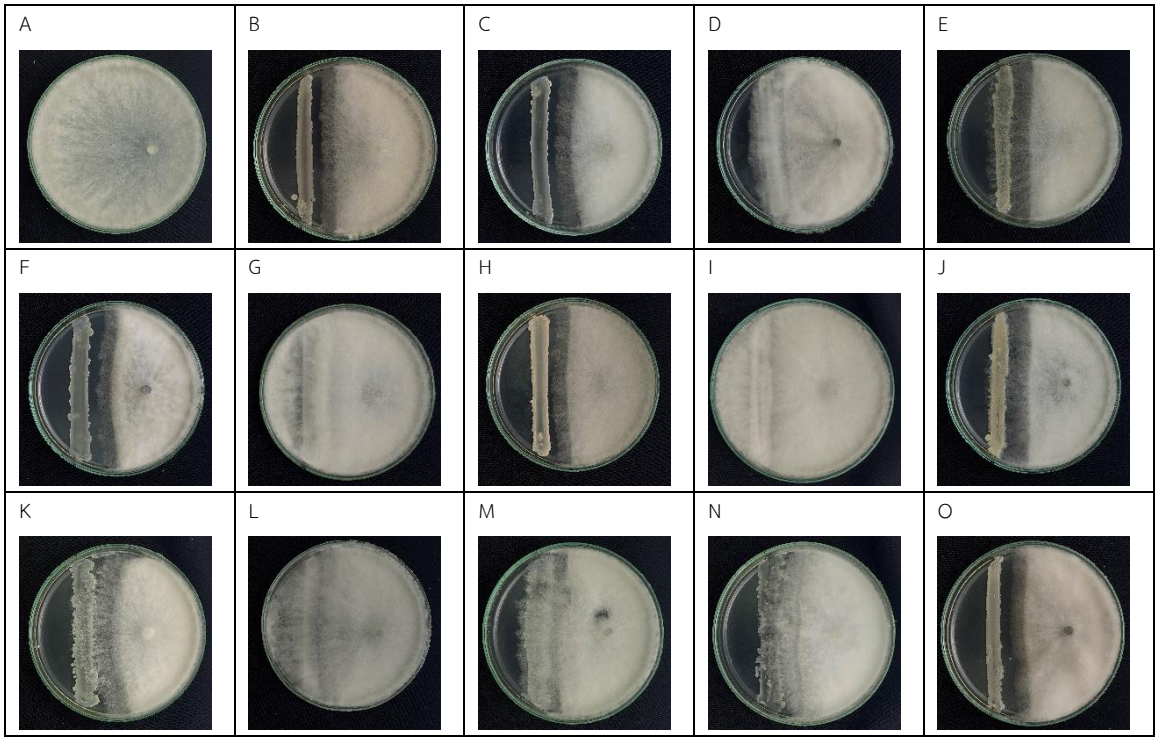


Figure 4 The ability of broad-spectrum antagonistic bacteria to inhibit mycelium growth of *Lasiodiplodia theobromae*-LS02. (A) Control treatment, (B) CS1, (C) CS22, (D) CS42, (E) CS76, (F) CS99, (G) CS115-2, (H) VCP-B3, (I) VCP-B4, (J) VCP-B13, (K) VCP-B14, (L) VCP-B22, (M) VCP-B24, (N) *Bacillus*-BS, (O) *Bacillus*-NTS3

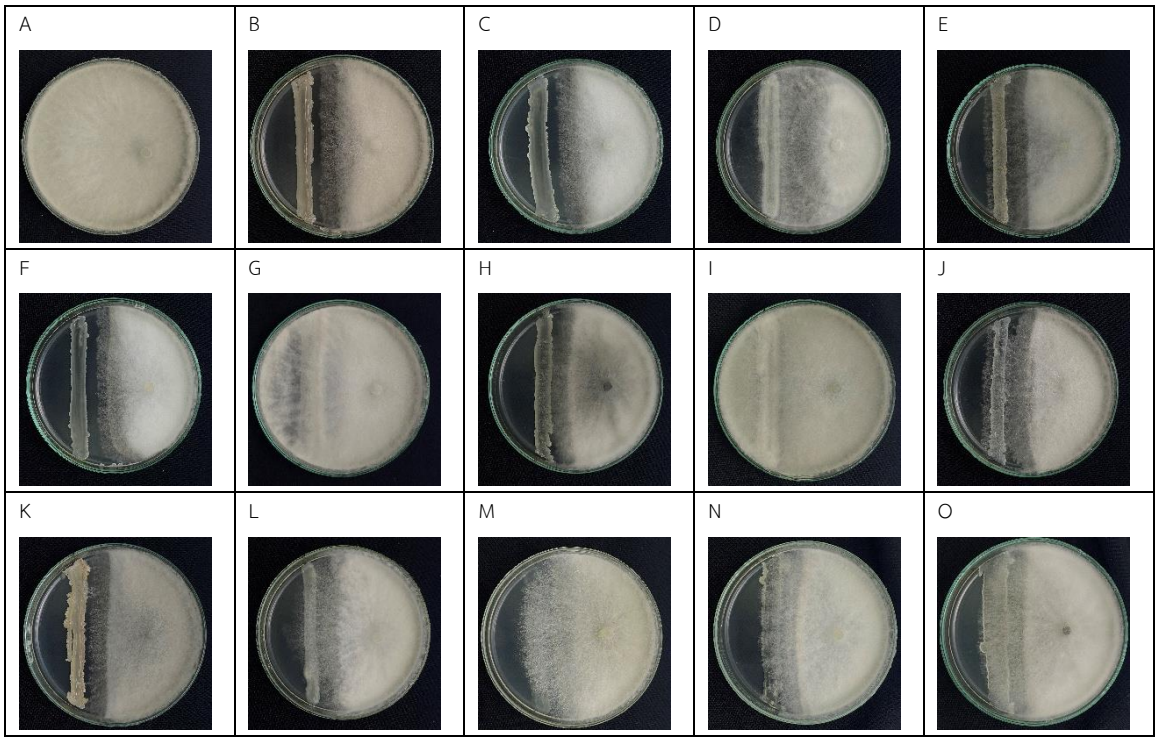


Figure 5 The ability of broad-spectrum antagonistic bacteria to inhibit mycelium growth of *Lasiodiplodia* - LS08. (A) Control treatment, (B) CS1, (C) CS22, (D) CS42, (E) CS76, (F) CS99, (G) CS115, (H) VCP-B3, (I) VCP-B4, (J) VCP-B13, (K) VCP-B14, (L) VCP-B22, (M) VCP-B24, (N) *Bacillus*-BS, (O) *Bacillus*-NTS

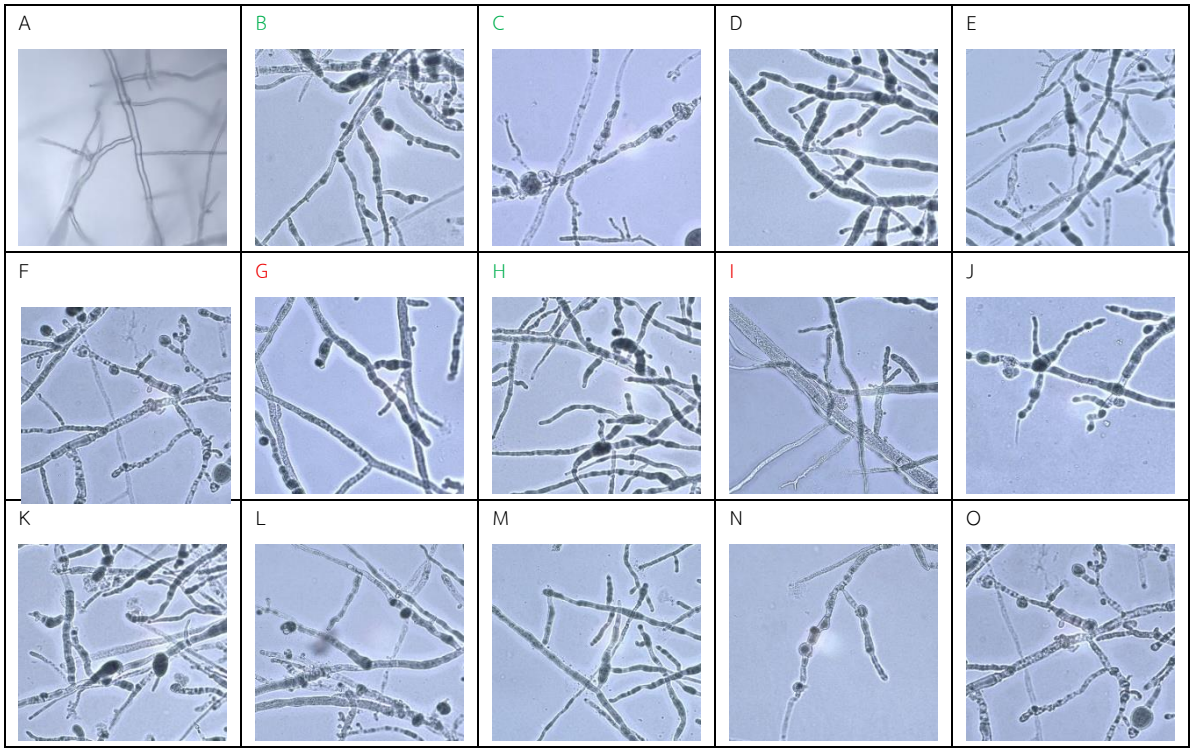


Figure 6 Antagonistic effect of various antagonistic *Bacillus* isolates against the mycelium of *Lasiodiplodia* spp. at inhibition zone after examination under microscope with magnification 40X compared with normal mycelium in control treatment.

(A) Control treatment, (B) CS1, (C) CS22, (D) CS42, (E) CS76, (F) CS99, (G) CS115, (H) VCP-B3, (I) VCP-B4, (J) VCP-B13, (K) VCP-B14, (L) VCP-B22, (M) VCP-B24, (N) *Bacillus*-BS, (O) *Bacillus*-NTS3

การจัดจำแนกและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้จำนวน 12 ไอโซเลตคือ CS1, CS22, CS42, CS76, CS99, CS115, VCP-B3, VCP-B4, VCP-B13, VCP-B14, VCP-B22 และ VCP-B24 มาจำแนกระบุชนิดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rRNA gene ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 1351-1428 bp สามารถจำแนกระบุชนิดได้เป็น *Bacillus velezensis* จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต CS01 (99.79% homology), CS22 (99.86% homology), CS42 (99.79% homology), CS76(99.79% homology), CS99 (100% homology), VCP-B3 (99.86%homology), VCP-B4 (99.96%homology) VCP-B22 (99.79%homology, VCP-B24 (99.79% homology) และ VCP-B13 (99.93% homology) ไอโซเลต CS115 จำแนกชนิดได้เป็น *Bacillus thuringiensis* (99.86 % homology) ส่วนไอโซเลต VCP-B14 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จึงจัดเป็น unclassified *Bacillus* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Bacillus* sp. OxB-1 chromosome 82.90% homology **(Table 4)**

Table 4 Identification of selected antagonistic and plant growth promoting *Bacillus* spp. from cassava and vermi-compost based on 16 s rDNA nucleotide sequences

isolate	Length (bp) (16S rRNA gene)	Organism (Partial based on 16S rRNA gene sequencing)	Maximum Precent identity
CS1	1419	*Bacillus velezensis*	99.79
CS22	1421	*B. velezensis*	99.86
CS42	1422	*B.velezensis*	99.79
CS76	1420	*B. velezensis*	99.79
CSS9	1420	*B. velezensis*	100
CS115	1428	*B. thuringiensis*	99.86
VCP-B3	1420	*B. velezensis*	99.86
VCP-B4	1420	*B. velezensis*	99.93
VCP-B13	1420	*B.velezensis*	99.93
VCP-B14	1351	Unclassified *Bacillus*	99.25
VCP-B22	1424	*B. velezensis*	99.79
VCP-B24	1422	*B. velezensis*	99.79

สรุปและวิจารณ์

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำต้นมันสำปะหลังและปุ๋ยมูลไส้เดือนที่มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์แนวกว้าง ที่ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดทั้งเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญทางเศรษฐกิจ คือ เชื้อ *X. euvesicatoria*, *P. carotovorum*, *R. solanacearum* และยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii, C. capsici* และ *L. theobromae* ที่ก่อโรคได้ในมันสำปะหลัง และมีความสามารถด้านการผลิต IAA, ละลายฟอสเฟต และผลิตซิเดอร์โรฟอร์ได้มากด้วยนั้น พบว่า ได้จำนวน 12 ไอโซเลตจากทั้งหมด 106 ไอโซเลตซึ่งเมื่อจำแนกระบุชนิดแล้วระบุได้เป็น *Bacillus velezensis* จำนวน 10 ไอโซเลต *Bacillus thuringiensis* 1 ไอโซเลต (CS115) ซึ่งได้มาจากลำต้นมันสำปะหลัง และเป็น *Bacillus* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ 1 ไอโซเลต (VCP-B14) ซึ่งแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน การจำแนกชนิดจึงควรต้องดำเนินการต่อโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอื่นๆ มาประกอบเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยนี้พบว่าเชื้อ *B. velezensis* ที่มีความสามารถดีเด่นทั้งด้านการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้นั้น สามารถพบได้ทั้งจากลำต้นมันสำปะหลัง (เอนโดไฟต์) และจากปุ๋ยมูลไส้เดือน ซึ่ง *B. velezensis* มีรายงานการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ชนิดใหม่ที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับคุมโรคพืชและช่วยเพิ่มผลผลิตพืช เนื่องจากมีความสามารถเป็นทั้งปฏิปักษ์คุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในแนวกว้างโดยการผลิตสารเมตะบอไลท์ที่ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดและการเป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Jin et al., 2025) และคาดว่า *B. velenzensis* ที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนสามารถดำรงชีพภายในต้นพืชในสถานะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยเช่นกัน นอกจากมันสำปะหลังแล้วยังสามารถนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้นี้ไปใช้ควบคุมโรคที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ด้วยโดยพิจารณาจากชุดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่นำมาใช้คัดเลือกไอโซเลตที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในแนวกว้างตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการทดสอบ

จากงานวิจัยนี้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแนวกว้างที่ยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* จากมันสำปะหลังได้ดีมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ *Bacillus velenzensis* -CS1, *B. velezensis*-CS22 และ *B. velezensis*-CS99 มีศักยภาพสูงสุดสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชีว

ภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคลำต้นเน่าดำ โรคเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญและส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง เพื่อให้การผลิตมันสำปะหลังเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเน้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ดีเหล่านี้มาช่วยลดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่ในดินพร้อมทั้งฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของดินไปพร้อมๆกัน ตลอดจนการนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านการชักนำภูมิต้านทานโรคต่อเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* สาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับจัดการโรคสำคัญของมันสำปะหลังได้อย่างยั่งยืน นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้สำหรับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ที่มีช่วงอายุการเพาะปลูกนานมีปัญหาโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจคือ *L. theobromae* ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าดำซึ่งก่อความเสียหายมากทั้งก่อนและภายหลังการเก็บเกี่ยว เช่น มะม่วง อาโวคาโด และทุเรียน ตลอดจนการนำเอาไปใช้ในพืชไร่อุตสาหกรรมเช่น อ้อย เป็นต้น

ส่วน ไอโซเลต CS115 จำแนกเป็น *B. thuringiensis* ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* LS02 และ LS08 ได้ แต่พบว่ามีประโยชน์ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเป็นไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้ในระดับสูงปานกลาง (3.99 µg/ml) สามารถละลายฟอสเฟตได้ มีค่า S.I. เท่ากับ 1.24 และสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ได้ S.I. เท่ากับ 1.16 ซึ่งจัดว่าเอนกประสงค์สำหรับช่วยให้พืชเจริญเติบโตดี มีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เป็น ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) และอาจช่วยลดความเสียหายของต้นพืชที่ได้รับผลกระทบจากเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ทำให้พืชแคระแกร็นหรือใบเปลี่ยนรูปร่าง เช่นกลุ่มไวรัสพืช หรือไฟโตพลาสมา เป็นต้น ส่วนเชื้อ *B. thuringiensis* มีรายงานที่รู้จักโดยทั่วไปว่าใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และด้วงชนิดต่างๆ และยังมีรายงานจาก Kumar et al. (2021) ถึงบทบาทด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งในส่วนคุณสมบัติด้านการผลิต IAA การละลายฟอสเฟตและการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ สำหรับดึงธาตุเหล็กในสภาพแวดล้อมแล้วปลดปล่อยให้พืชเอาไปใช้ได้เช่นเดียวกัน และยังมีรายงานการใช้ เชื้อ *B. thuringiensis* เพื่อลดจำนวนกลุ่มไข่ และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในรากมะเขือเทศ และลดระดับการเกิดโรครากปมในมะเขือเทศได้มากกว่าสารเคมีที่ใช้ควบคุมเปรียบเทียบ (Ramalakshmi et al., 2020) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า *B. thuringiensis*-CS115 จะมีศักยภาพสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ใหม่ที่เสริมประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชและแมลงศัตรูพืชสำหรับใช้ในการผลิตมันสำปะหลังและพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ซึ่งจะทำให้มีชีวภัณฑ์ *Bacillus* ที่หลากหลายชนิดมากขึ้นสำหรับการจัดการโรคพืชและแมลงศัตรูพืชแบบผสมผสานหรือแบบอินทรีย์ สามารถนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับผืนดินซึ่งนำไปใช้ได้ทั้งการผลิตพืชแบบ GAP และแบบอินทรีย์ ส่งเสริมการลดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและปุ๋ยเคมีให้กับเกษตรกรได้อย่างชัดเจนมากขึ้นเข้าสู่ระบบการผลิตพืชที่ยั่งยืนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ได้สนับสนุนโครงการวิจัย เรื่อง Screening and development of antagonistic product against *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* โดยมี รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล เป็นหัวหน้าโครงการ ซึ่งมีส่วนช่วยสนับสนุนทรัพยากรสำหรับการทำวิจัยในเรื่องนี้ ขอบคุณ รศ.ดร. ปรเมศ บรรเทิง ที่ให้ความอนุเคราะห์ต้นมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย และขอบคุณสาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือต่างๆ และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ทวินันท์ บางขาม และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2564. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก. แก่นเกษตร. 6: 1502–1514.

สุปรียา หมื่นสกุล. 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bacillus* spp. จากแหล่งต่างๆและประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สุทธิสา ดัชนีย. 2558. การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า. 2568. การส่งออกมันสำปะหลังกลับมาฟื้นตัวในรอบ 14 เดือน ส่งออกจีนขยายตัวร้อยละ 25.1. แหล่งข้อมูล: https://tpso.go.th/news/2501-0000000014. ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2568.

อานัฐ ตันโช. 2557. สายพันธุ์ไส้เดือนดินที่น่าเลี้ยง. ดินและปุ๋ย. 36: 6–12.

Anckaert, A., A. Arguelles Arias, G. Hoff, M. Calonne-Salmon, S. Declerck, and M. Ongena. 2021. The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases. In: Burleigh Dodds Series in Agricultural Science. Burleigh Dodds Science Publishing, UK.

Brito, A. C. Q. 2020. Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in Manihot esculenta in Brazil. European Journal of Plant Pathology. 157: 583–598.

Choi, Y. W., K. D. Hyde, and W. H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Diversity. 3: 29–38.

Collavino, M. M., P. A. Sansberro, L. A. Mroginski, and O. M. Aguilar. 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote Phaseolus vulgaris growth. Biology and Fertility of Soils. 46: 727–738.

Fan, H., Z. Zhang, Y. Li, X. Zhang, Y. Duan, and Q. I. Wang. 2017. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. Frontiers in Microbiology. 8: 1973.

Gopalakrishnan, S., S. Vadlamudi, S. Apparla, P. Bandikinda, R. Vijayabharathi, R. K. Bhimineni, and O. Rupela. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. Microbiological Research. 169: 40-48.

Heuer, H., M. Kresek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology. 63: 3233-3241.

Hoshikawa, K., S. Fujita, N. Renhu, K. Ezura, T. Yamamoto, S. Nonaka, and K. Miura. 2019. Efficient transient protein zexpression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system. Plant Cell Reports. 38: 75-84.

Jin, P., L. Chu L, Z. Xuan, Z. Lin, and Y. Fang. 2025. *Bacillus velezensis*, a new valuable source of bioactive molecules within plant microbiomes and natural weapons for the biocontrol of plant pathogens. Tropical Plants. 4: e001.

Kabir, L., W. K. Sang, S. K. Yun, and S. L. Youn. 2012. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper. Mycobiology. 40: 244-251.

Kloepper, J. W., C. M. Ryu, and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology. 94: 1259-1266.

Kumar, P., M. Kamle, R. Borah, D. K. Mahato, and B. Sharma. 2021. Bacillus thuringiensis as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 31: 95.

Machado, A. R., D. B. Pinho, and O. L. Pereira. 2014. Phylogeny, identification and pathogenicity of the botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with A description of new species of *Lasiodiplodia*. Fungal Diversity. 67: 231-247.

Pathma, J., and N. Sakthivel. 2012. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. Journal of Environmental Management. 112: 410-418.

Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17: 362-370.

Radhakrishnan, R., A. Hashem, and E. F. Abd-Allah. 2017. Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. Frontiers in Physiology. 8: 667.

Ramalakshmi, A., R. Sharmila, M. Iniyakumar, and V. Gomathi. 2020. Nematicidal activity of native Bacillus thuringiensis against the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White). Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30: 90.

Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection. 20: 1-11.

Schwyn, B., and J. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160: 47-56.

Shafi, J., H. Tian, and M. Ji. 2017. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 31: 446-459.

White, T. J., T. Bruns, S. J. W. T. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. 18: 315-322.