

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะบริเวณรอบรากผักกระเฉด ที่ผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน

Efficiency of Antagonistic Rhizobacteria from *Neptunia natans* and Their Secondary Metabolites Against Soil-borne Plant Pathogenic Fungi

ชนากานต์ รัตนศักดิ์ชัยชาญ และ ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล*

Chanakarn Ratanasakchaicharn and Pilunthana Thapanapongworakul*

ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: pilunthana.t@cmu.ac.th

(Received: 30 April 2018; Accepted: 18 September 2018)

Abstract: This study aims to select potential rhizobacteria from *Neptunia natans* to inhibit mycelial growth of soil-borne pathogens such as *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. and *Fusarium oxysporum* which cause root and stem rot disease in lettuce. Using dual culture and volatilization by sealed plate method, the results showed that four soil-borne phytopathogenic fungi were significantly inhibited by ten isolates of rhizobacteria, R1016, R1029, R1033, R1036, J3002, Rr4007, Rr4053, Rr4058, Rr4082 and Rr4084 ($P<0.05$). These isolates exhibited high percentage of mycelial growth inhibition at 75-100% for *S. rolfsii* and *Pythium* sp., 53-57% for *R. solani*, and 12% for *F. oxysporum*. Moreover, the volatiles produced by the rhizobacteria induced qualitative morphological abnormalities, such as lysis and degradation of fungal structures and quantitative effects of fungal growth on potato dextrose agar (PDA). The result suggested that antagonistic rhizobacteria had antifungal activities against a wide spectrum of soil-borne fungal pathogens. Five rhizobacteria isolates, R1033, Rr4053, Rr4058, Rr4082 and Rr4084, completely inhibited mycelial growth of *S. rolfsii*. When mycelial plugs were transferred to fresh PDA agar plates, the pathogen could not grow, and some rhizobacteria can also produce secondary metabolites, suggesting their potential role in biological control. This study contributes to understanding the use of antifungal volatiles in suppression of root and stem rot disease and promote growth of plant.

Keywords: Rhizobacteria, *Neptunia natans*, volatiles, soil-borne pathogenic fungi, secondary metabolite

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์บริเวณรอบรากผักกระเฉดที่มีศักยภาพยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน ได้แก่ *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. และ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของผักสลัด เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture และผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยสารระเหย (volatiles) ด้วยวิธี sealed plate พบว่า เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 10 ไอโซเลท คือ R1016, R1029, R1033, R1036, J3002, Rr4007, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทางดินทั้ง 4 ชนิดได้ และผลของสารระเหยของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้ทุกชนิด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* และ *Pythium* sp. สูงสุดอยู่ในช่วง 75-100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อรา *R. solani* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วง 53-57 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *F. oxysporum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้สูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผลของสารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียบางไอโซเลท ทำให้เส้นใยมีลักษณะผิดปกติ และส่งผลกระทบต่อปริมาณการเจริญของเส้นใยบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบ 5 ไอโซเลท ได้แก่ R1033, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำเส้นใยย้ายไปวางบนอาหาร PDA เชื้อไม่สามารถเจริญได้ อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์บางไอโซเลทสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ กล่าวได้ว่า สารระเหยและสารทุติยภูมิมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคโดยชีววิธี การศึกษานี้เป็นแนวทางการใช้สารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์เพื่อควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าและส่งเสริมการเจริญของพืช

คำสำคัญ: เชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช ผักกระเฉด สารระเหย เชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน สารทุติยภูมิ

คำนำ

โรครากเน่าโคนเน่า (root and stem rot disease) ของผักหลายชนิด มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* เป็นโรคที่มีความสำคัญและก่อความเสียหายต่อผลผลิตเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชผักได้อย่างกว้างขวาง การแพร่ระบาดของโรคเกิดได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง โดยพืชจะแสดงอาการเป็นแผลสีน้ำตาลบริเวณโคนต้นใบเหลืองเหี่ยวหลุดร่วง ลำต้นแคระแกร็น ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว จึงทำให้มีการนำวิธีการควบคุมโรคมาใช้หลายวิธี โดยเฉพาะการใช้สารเคมีทางการเกษตรซึ่งเกษตรกรนิยมใช้กันอย่างมาก เนื่องจากให้ผลในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีมากเกินไปจนอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ สิ่งแวดล้อม และสัตว์ป่า รวมถึงการปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้ ผู้บริโภค และเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุโรคพืชเกิด

การกลายพันธุ์อีกด้วย (ปิลันธนา และชนากานต์, 2559; Burr et al., 1988; Ekman et al., 2014; Richard, 2004)

ปัจจุบันจึงมีการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบักร์ (antagonistic microorganism) เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี นำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะการใช้เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชหรืออาจอยู่ภายในรากพืช (plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR) เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม PGPR ได้แก่ *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium* และ *Serratia* เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีกลไกยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ต่างกัน เช่น การสร้างและหลั่งเอนไซม์ การละลายธาตุอาหารในดิน การสร้างสาร siderophore การสร้างสารปฏิชีวนะ กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ต่างชนิดและต่างสายพันธุ์กันก็มีกลไกการแสดงออกที่แตกต่างกัน (Kai et al., 2007; van Loon et al., 1998)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture พบมีรายงานว่า สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Phytophthora megasperma*, *Pythium ultimum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* และ *Rhizoctonia solani*. (Antoun et al., 1998; Deshwal et al., 2003; Harman et al., 2004; Homma et al., 1989) ที่น่าสนใจคือ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds: VOCs) ได้นั้น ปัจจุบันยังมีข้อมูลการศึกษาน้อยมากและการทดสอบสารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชยังมีจำกัดอยู่ โดยนักวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสนใจเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืชต่าง ๆ หลายหลายชนิด ในขณะที่ พืชที่อาศัยและเจริญเติบโตได้ทั้งบนดินและบนผิวน้ำ มีรากที่สามารถลอยตัวและสร้างปมช่วยในการตรึงไนโตรเจนได้ ยังไม่ได้รับความสนใจและเป็นที่มีการศึกษาอย่างจำกัดนั้นคือ ผักกระเฉด (*Neptunia natans* (L.f.) Druce) มีรายงานว่า สารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียมีศักยภาพในการต้านเชื้อรา (Alstrom, 2001; Wheatley, 2002) และมีการยืนยันว่า สารระเหยที่ปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคพืชทางดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kai et al., 2007) และ Fiddaman and Rossall (1994) กล่าวว่า สารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เส้นใยเกิดการสลายตัว แตกสลาย และยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคอีกด้วย (Nelson et al., 1986) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Astrom and Gerhardson (1988) และ Kurze et al. (2001) พบว่าสารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* และ *Rhizobium* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดินได้หลายชนิด เช่น *Fusarium culmorum*, *Pythium spp.*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Verticillium dahliae* เป็นต้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อ

แบคทีเรียบริเวณรอบรากผักกระเฉดที่มีศักยภาพผลิตสารระเหยและสารทุติยภูมิอื่น ๆ (secondary metabolites) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน โดยการทดสอบด้วยวิธี dual culture และการสร้างสารระเหยด้วยวิธี sealed plate ในสภาพห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน

เก็บตัวอย่างผักสลัด (lettuce: *Lactuca sativa* Linn) ที่แสดงอาการโรครากเน่าโคนเน่าจากโรงเรือนปลูกผักสลัดในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (hydroponics) นำมาสองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope ตรวจดูลักษณะโครงสร้าง และสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope และแยกให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จากนั้นทดสอบความสามารถในการเกิดโรคตามวิธีของ Koch's postulate (Agrios, 2005) และเก็บเชื้อราสาเหตุโรคบริสุทธิ์เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียจากรอบรากผักกระเฉด

สุ่มเก็บตัวอย่างรากของผักกระเฉด (water mimosa: *Neptunia natans* (L.f.) Druce) จากพื้นที่ 3 แห่ง ในอำเภอแมริม และอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาคัดแยกหาเชื้อแบคทีเรียโดยล้างรากพืชผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างดินและเชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะรากพืชแบบหลวม ๆ ออกไปก่อน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำรากที่ผ่านการล้างมาแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะผิวรากได้ดีออกมา แล้วนำไป spread บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน และเลือกเก็บโคโลนีเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียจากรอบรากผัก กระเจตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พืชทางดิน

ทดสอบด้วยวิธี dual culture

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียรอบรากผักกระเจตที่แยกได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของผักสลัด ด้วยวิธี dual culture โดยนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร nutrient agar (NA) แบบ spot inoculum ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส วัดขนาดรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญ

ทดสอบการสร้างสารระเหย

ทดสอบการสร้างสารระเหยด้วยวิธี sealed plate โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเชื้อปริมาณ 200 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานอาหาร PDA ที่เลี้ยงเชื้อรา *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* มาประกบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ผลของสารระเหยที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อรา สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า

ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

ตรวจสอบความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน ด้วยวิธี sealed plate ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่ถูกยับยั้ง และนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope บันทึกลักษณะความผิดปกติของเส้นใยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

ตรวจสอบความผิดปกติของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน ด้วยวิธี sealed plate ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามวิธีของ Chaurasia *et al.* (2005) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่ถูกยับยั้ง นำชิ้นส่วนของเชื้อราสาเหตุโรคมาตรวจสอบ ด้วยวิธี serial dilution ดูดสารแขวนลอย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง colony forming units (cfus) จากสูตร $(C1-C2/C1) \times 100$ โดยที่ C1 คือ โคโลนีในชุดควบคุม และ C2 คือ โคโลนีในชุดทดสอบ

การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารทุติยภูมิของ เชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์

การสร้างสาร siderophore

ตรวจสอบการสร้างสาร siderophore บนอาหาร chrome azurol S (CAS) agar ตามวิธีของ Bhatia *et al.* (2005) นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์เลี้ยงบนจานอาหาร CAS และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกขนาดวงใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย

การละลายฟอสเฟต

ทดสอบการละลายฟอสเฟตตามวิธีของ Bhatia *et al.* (2005) นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์เลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya's medium และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกขนาดวงใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย

การย่อยสลายเซลลูโลส

ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) ตามวิธีของ Khianngam *et al.* (2014) โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์เลี้ยงบนจานอาหาร CMC และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ เทลงบนอาหารเพื่อเป็นการย้อมสี เป็นเวลา 20 นาที แล้วเททิ้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมล เป็นเวลา

15 นาที แล้วทดสอบละลายทิ้ง บันทึกรูปร่างวงใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย

การสร้างฮอร์โมน IAA (indole-3-acetic acid)

ทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ตามวิธีของมานะและคณะ (2556) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ในอาหาร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษ nitrocellulose วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมสาร L-TRP (ความเข้มข้น 5 mM) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ป่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิต IAA โดยหยดสาร Salkowski reagent ลงบนกระดาษ nitrocellulose ป่มทิ้งไว้ เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต IAA ได้จะเกิดสีชมพู (+) และถ้าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถผลิต IAA ได้จะเกิดสีเหลือง (-)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน

จากการเก็บตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรครากเน่าโคนเน่า พบแสดงอาการใบเหี่ยว ฟุบตัวลง บริเวณโคนต้นมีแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ช้ำ ฉ่ำน้ำ และระบบรากถูกทำลาย เมื่อแยกเชื้อสาเหตุโรคให้บริสุทธิ์และตรวจสอบลักษณะโครงสร้าง และสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พบเชื้อราสาเหตุโรค 4 ชนิด คือ เชื้อรา *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* (ภาพที่ 1A, B) เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรค พบว่า โคนต้นบริเวณโคนถูกเข้าทำลาย แผลมีสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ และพบเส้นใยของเชื้อราเจริญในบริเวณที่แสดงอาการ (ภาพที่ 1C) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Richard (2004) และ Ekman *et al.* (2014) ที่รายงานว่า โรคที่สำคัญของผักสลัดมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* และ *Fusarium* spp.

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียจากรอบรากผักกระเฉด

จากการเก็บตัวอย่างรากผักกระเฉดจากพื้นที่ 3 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียรอบรากได้ทั้งหมด จำนวน 142 ไอโซเลท โดยในอำเภอแมริม จำนวน 54 ไอโซเลท และอำเภอแม่วาง จำนวน 88 ไอโซเลท

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียจากรอบรากผักกระเฉดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน

ทดสอบด้วยวิธี dual culture

ผลจากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า จากเชื้อแบคทีเรียรอบรากผักกระเฉด จำนวน 142 ไอโซเลท

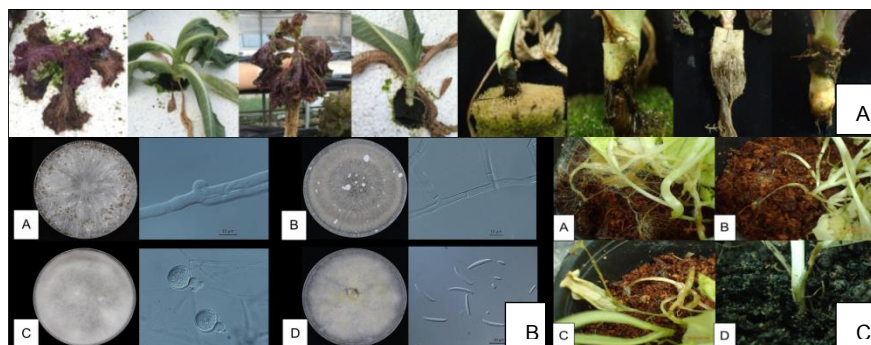


Figure 1. Natural infection of root and stem rot disease of lettuce (A), Colony of pathogens on PDA and morphological characteristic of pathogens under compound microscope (B): A) *Sclerotium rolfsii*, B) *Rhizoctonia solani*, C) *Pythium* sp. and D) *Fusarium oxysporum*, and the pathogenicity test of fungal pathogens causing root and stem rot disease (C): A) *Sclerotium rolfsii* B) *Rhizoctonia solani* C) *Pythium* sp. and D) *Fusarium oxysporum* at 5 days after inoculation

มีเพียง 10 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท R1016, R1029, R1033, R1036, J3002, Rr4007, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร NA ได้ดี (ตารางที่ 1) จากงานวิจัยของ Tenorio-Salgado *et al.* (2013) พบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia tropica* สายพันธุ์ MTo293 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* ได้ ส่วน Calvo *et al.* (2010) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 63 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* อยู่ในช่วง 69-91 เปอร์เซ็นต์ และรายงานวิจัยของ Bardin *et al.* (2004) ทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* จำนวน 10 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. พบมีเพียง 1 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งได้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรงอาจมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากหรือน้อยนั้นไม่สามารถทราบกันได้แต่ศักยภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากการสร้างและหลั่งสารต่าง ๆ มายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งทางตรงและทางอ้อม และอาจช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย จากรายงานการศึกษาดังกล่าว

จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้ง 4 ชนิด นำมาทดสอบการสร้างสารระเหยต่อไป

ทดสอบการสร้างสารระเหย

นำเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทางดิน 4 ชนิด ด้วยวิธี sealed plate ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2) พบเชื้อแบคทีเรียปฏิบักษ์สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) มี 7 ไอโซเลท คือ R1016, R1033, J3002, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 71.43-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 5 ไอโซเลท คือ R1033, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 46.67-57.78 เปอร์เซ็นต์ และมี 7 ไอโซเลท คือ R1016, R1033, J3002, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium* sp. ได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 45.18-85.93 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 1 ไอโซเลท คือ J3002 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

Table 1. The efficacy of 10 antagonistic rhizobacteria isolates against 4 soil-borne pathogens by dual culture method on PDA

Isolates	Inhibition mycelial growth/fungal pathogens			
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>
R1016	+++ ¹	+++	+++	+++
R1029	+++	+++	+++	+++
R1033	+++	+++	+++	+++
R1036	+++	+	+++	+
J3002	+++	+++	+++	+
Rr4007	+++	+++	+++	+++
Rr4053	+++	+++	+++	+
Rr4058	+++	+	+++	+
Rr4082	+++	++	+++	+++
Rr4084	+++	+	++	+++

¹ Four ratings were used: -, no inhibition zone (0%), +, inhibition zone and on growth of fungal on the bacteria (26-50%), ++, 1-5 mm inhibition zone (51-75%), +++, more than 5 mm inhibition zone (76-100%)

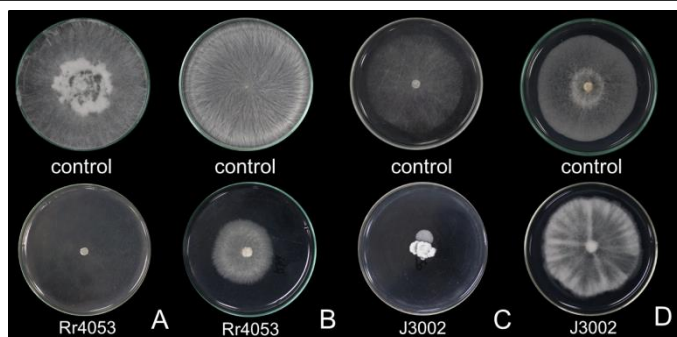


Figure 2. The efficacy of antagonistic rhizobacteria isolates Rr4053 and J3002 for suppression the mycelial growth of 4 soil-borne pathogens by sealed plate method at 72 hours: A) *Sclerotium rolfssii*, B) *Rhizoctonia solani*, C) *Pythium* sp. and D) *Fusarium oxysporum*

Table 2. Antagonistic activity of 10 rhizobacteria volatiles against the mycelial growth of 4 soil borne pathogens at 72 hours

Isolates	Percent inhibition of radial growth			
	<i>Sclerotium rolfssii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>
R1016	76.19B ¹	35.56D	45.18D	4.00C
R1029	7.62E	21.11E	3.70F	4.00C
R1033	100.00A	46.67C	48.15D	0.00D
R1036	28.57D	17.78E	20.74E	8.67B
J3002	71.43C	34.44D	85.93A	12.00A
Rr4007	1.91F	6.67F	3.70F	4.00C
Rr4053	100.00A	57.78A	58.52C	0.00D
Rr4058	100.00A	57.78A	61.48C	0.00D
Rr4082	100.00A	53.33B	75.56B	4.00C
Rr4084	100.00A	55.55AB	85.18A	0.00D
LSD _(0.05)	1.54	4.15	5.86	0.62
CV (%)	1.32	6.30	7.05	9.96

¹ Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level by LSD test

F. oxysporum ได้ดีที่สุดเท่ากับ 12.00 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Tenorio-Salgado *et al.* (2013) พบว่า สารระเหยจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia tropica* ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfssii* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ และ Kai *et al.* (2007) รายงานว่า สารระเหยจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia plymuthica* 3Re4-18, *Bacillus subtilis* B2g และ *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* มีเปอร์เซ็นต์

การยับยั้งเท่ากับ 85, 82 และ 79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม Fiddaman and Rossall (1993) รายงานว่า สารระเหยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้สูงสุดเท่ากับ 44.44 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. ultimum* ได้ ในขณะที่ Chaurasia *et al.* (2005) ทดสอบสารระเหยของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เช่นเดียวกัน แต่ผลปรากฏว่า สารระเหยที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้ง

การเจริญของเชื้อรา *P. afertile* ได้มากที่สุดเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Arfaoui *et al.* (2006) ทดสอบสารระเหยจากเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว จำนวน 12 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 9.18-10.71 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

ผลของสารระเหยที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า

ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

เมื่อศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า ได้แก่ *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* ด้วยวิธี sealed plate method ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 3A, 4A, 5A และ 6A ตามลำดับ พบว่า เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* มีลักษณะไม่เรียบ โค้งงอ เป็นคลื่น (ภาพที่ 3B) เส้นใยบวมพองขึ้น บางส่วนคอดเล็กลง ปลายเส้นใยบวมพอง (ภาพที่ 3C) และพบการแตกสลาย (degradation) ของเส้นใย (ภาพที่ 3D)

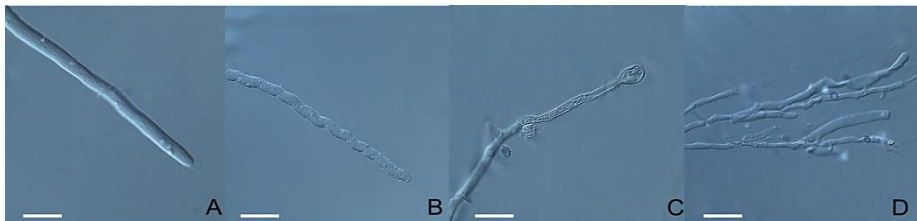


Figure 3. Morphological effects of 3 rhizobacteria volatiles on *Sclerotium rolfsii*: (A) control hyphae, (B) irregular of hyphal (R1036), (C) swelling of hyphal tip (Rr4053) and (D) lysis of fungal hyphae (Rr4084) (bar = 20 μ m)

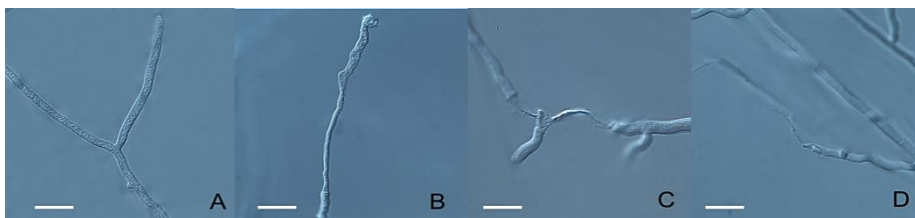


Figure 4. Morphological effects of 3 rhizobacteria volatiles on *Rhizoctonia solani*: (A) control hyphae, (B) swelling and to irregular of hyphal (R1033) and (C-D) lysis of fungal hyphae (Rr4053 and Rr4058) (bar = 20 μ m)

เส้นใยเชื้อรา *R. solani* มีลักษณะบิดเบี้ยว ไม่แน่นอน เนื่องจากเส้นใยส่วนหนึ่งบวมพอง แต่ส่วนหนึ่งคอดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4B) และพบการสลายตัว (lysis) ของเส้นใย (ภาพที่ 4C, D) ซึ่งสอดคล้องกับ Fiddaman and Rossall (1993) ที่รายงานว่า สารระเหยจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ส่งผลให้ปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* บวมพองขึ้น และ ปิ่ลันธนา และศราวิชญ์ (2558) ทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* ในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ด้วยวิธี dual culture และ pour plate พบปลายเส้นใยเชื้อราที่มีลักษณะฉีกขาด และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย สำหรับเส้นใยเชื้อรา *Pythium* sp. มีลักษณะคดงอและไม่แน่นอน ปลายเส้นใยบวมพองขยายขึ้น และมีการแตกของปลายเส้นใยที่ผิดปกติไป (ภาพที่ 5B, C, D) และเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* มีลักษณะคดงอเล็กน้อยถึงปานกลาง และปลายเส้นใยบวมพองขึ้น (ภาพที่ 6B, C, D) มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Chaurasia *et al.* (2005) พบว่า สารระเหยของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทำให้เส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* มีลักษณะผิดปกติ บวมพอง และเกิดการสลายตัว

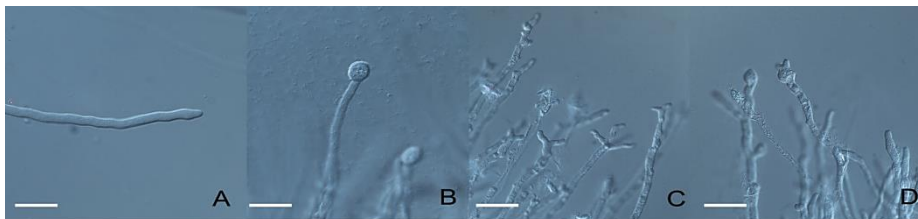


Figure 5. Morphological effects of 3 rhizobacteria volatiles on *Pythium* sp.: (A) control hyphae and (B-D) swelling and to irregular of hyphal (J3002, Rr4058 and Rr4084) (bar = 20 μm)

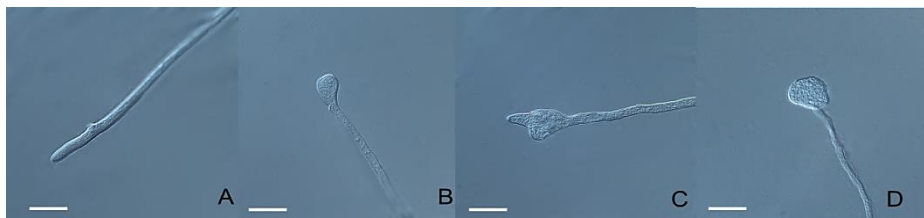


Figure 6. Morphological effects of 3 rhizobacteria volatiles on *Fusarium oxysporum*: (A) control hyphae and (B-D) swelling and to irregular of hyphal (R1036, J3002 and Rr4082) (bar = 20 μm)

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 4 ชนิด ที่เวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิบััษ์ทั้ง 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท คือ J3002, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างชัดเจน เมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfisii* และ *R. solani* ในขณะที่ผลของสารระเหยทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* ยังเจริญได้แต่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยอยู่ในช่วง 72.73-100 และ 77.27-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับรายงานของ Chaurasia *et al.* (2005) พบว่า สารระเหยจากเชื้อแบคทีเรียปฏิบััษ์สามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อราได้ดีกว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิบััษ์โดยตรง โดยสารระเหยจากเชื้อแบคทีเรียปฏิบััษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายได้ระยะไกล ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญในบริเวณที่สารระเหยคงอยู่ หากเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้แต่เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรครวมถึงส่วนขยายพันธุ์อาจผิดปกติไปจนส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของเชื้อราสาเหตุโรค อีกทั้ง Fernando and Linderman (1995) ได้ศึกษาผลของสาร

ระเหยจากเชื้อแบคทีเรีย กล่าวว่า สารระเหยมีบทบาทในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เนื่องจากสามารถทำลายสปอร์ที่อยู่ในดินรวมถึงจำกัดการเข้าทำลายและการเกิดโรคพืชอีกด้วย

การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารของเชื้อแบคทีเรียปฏิบััษ์

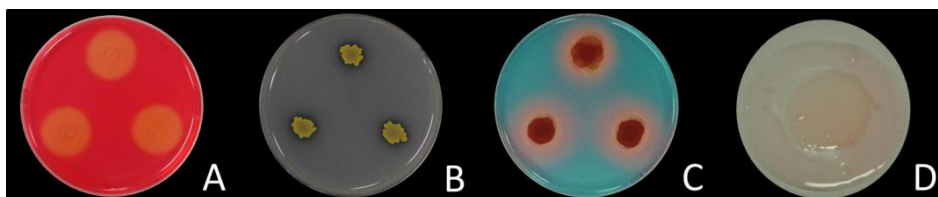
เมื่อทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิบััษ์ทั้ง 10 ไอโซเลท ในการผลิตเอนไซม์ cellulase บนอาหาร CMC พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้ โดยไอโซเลท Rr4053 เกิดวงใสมากที่สุดเท่ากับ 20 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบการละลาย phosphate บนอาหาร Pikovskaya's medium พบว่ามี 3 ไอโซเลท สามารถย่อยสลาย phosphate เกิดวงใสรอบโคโลนีได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อทดสอบการสร้างสาร siderophore บนอาหาร CAS พบว่ามี 7 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสาร siderophore โดยไอโซเลท Rr4082 มีวงสีใหญ่ที่สุดเท่ากับ 10 มิลลิเมตร และมีเพียง 2 ไอโซเลท คือ R1033 และ J3002 ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้ (ภาพที่ 7 และตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องตามรายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azobacter* และ *Rhizobium* สามารถสร้างสารและหลั่งสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Bhatia *et al.*, 2005;

Table 3. Five isolates of antagonistic rhizobacteria colony forming units developed from the control and antagonized pathogenic fungi

Isolates	Control		Volatiles			
	cfu ¹ /control plates		cfu/antagonised plates		Percent inhibition of radial growth ²	
	Py	Fu	Py	Fu	Py	Fu
J3002	11	23	3	2	72.73	91.30
Rr4053	2	21	0	0	100.00	100.00
Rr4058	6	25	0	2	100.00	92.00
Rr4082	8	22	1	5	87.50	77.27
Rr4084	3	28	0	0	100.00	100.00

¹ cfu = $nx10^3$ cells/ml; in all other cases cfu = $nx10^4$ cells/ml

² Percent inhibition at 72 hour: *Pythium* sp. (Py) and *Fusarium oxysporum* (Fu)

**Figure 7.** Beneficial properties of antagonistic rhizobacteria 4 isolates: (A) Cellulase production (Rr4053), (B) Phosphate solubilization (Rr4082), (C) Siderophore production (Rr4082) and (D) IAA production (J3002)**Table 4.** Potential antagonistic rhizobacteria 10 isolates from *Neptunia natans* with some secondary metabolites in vitro

Isolates	Cellulase production	Phosphate solubilization	Siderophore production	IAA production
R1016	— ¹	—	+	—
R1029	—	—	+	—
R1033	—	—	+	+
R1036	—	—	+	—
J3002	—	—	+	+
Rr4007	+	—	—	—
Rr4053	+	+	—	—
Rr4058	+	+	—	—
Rr4082	+	+	+	—
Rr4084	—	—	+	—

¹ +; Positive, —; Negative

Calvo *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม Deshwal *et al.* (2003) กล่าวว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร phytohormones และหลั่งสารทุติยภูมิ เช่น การสร้าง

เอนไซม์ สร้างสารปฏิชีวนะ การสร้างสาร HCN และการสร้างสาร siderophore สามารถเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค

เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถสร้างสาร siderophore ทำให้ขาดธาตุเหล็กส่งผลต่อการดำรงชีวิตและการสืบพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่อาศัยอยู่ในบริเวณรอบรากพืชหรือภายในรากพืชยังมีกลไกในการควบคุมโรค และการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานขึ้นในพืชแตกต่างกันรวมถึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (van Loon *et al.*, 1998)

สรุป

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์จากบริเวณรอบรากผักกระเฉด จำนวน 10 ไอโซเลท ด้วยวิธี dual culture สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของผักสลัดได้ แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งไม่เท่ากันในแต่ละเชื้อราสาเหตุโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี sealed plate method มีเพียง 7 ไอโซเลท คือ R1016, R1033, J3002, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถสร้างสารระเหยที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ *S. rolfsii*, *R. solani* และ *Pythium* sp. ได้ โดยพบ 5 ไอโซเลท คือ R1033, Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *R. solani* พบ 4 ไอโซเลท คือ Rr4053, Rr4058, Rr4082 และ Rr4084 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 57 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Pythium* sp. มีเพียง 2 ไอโซเลท คือ J3002 และ Rr4084 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดถึง 85 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งผลของสารระเหยทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคมีลักษณะผิดปกติเกิดการสลายตัวและการแตกสลาย แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์บางไอโซเลทสามารถผลิตสารระเหยและสารทุติยภูมิอื่น ๆ ที่มีศักยภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแบบ antibiosis ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียรอบรากผักกระเฉดได้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาและวิเคราะห์ชนิดของสารระเหย และจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชในสภาพเรือนทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนในการทำวิจัยเพื่อเป็นวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน เพื่อดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ปิลันธนา สุาปนพงษ์วรกุล และ ชนาภาณต์ รัตนศักดิ์ชัย-ชาญ. 2559. ประสิทธิภาพของน้ำสกัดชีวภาพจากเศษเหลือพริกต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ใน ส ก า พ ห้องปฏิบัติการ. วารสารเกษตร 32(1): 61-72.
- ปิลันธนา สุาปนพงษ์วรกุล และ ศรวิชัย สายมงคล. 2558. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6. วารสารเกษตร 31(3): 301-310.
- มานะ กาญจนมณีเสถียร อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒน์-ปัญญ์ และ วานิด รอดเนียม. 2556. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิบัฏษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัฏษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. 58 หน้า.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, New York. 592 p.
- Alstrom, S. 2001. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. Journal of Plant Pathology 149(2): 57-64.
- Antoun, H., C.J. Beauchamp, N. Goussard, R. Chabot and R. Lalande. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on

- non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil 204(1): 57-67.
- Arfaoui, A., B. Sifi, A. Boudabous, I.E. Hadrami and M. Chérif. 2006. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, The causal agent of fusarium wilt of chickpea. Journal of Plant Pathology 88(1): 67-75.
- Astrom, B. and B. Gerhardson. 1988. Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. Plant and Soil 109(2): 263-269.
- Bardin, S.D., H.C. Huang, J. Pinto, E.J. Amundsen and R.S. Erickson. 2004. Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. Canadian Journal of Botany 82(3): 291-296.
- Bhatia, S., R.C. Dubey and D.K. Maheshwari. 2005. Enhancement of plant growth and suppression of collar rot of sunflower caused by *Sclerotium rolfsii* through fluorescent *Pseudomonas*. Indian Phytopathology 58(1): 17-24.
- Burr, T.J., B.H. Katz, A.L. Bishop, C.A. Meyers and V.L. Mittak. 1988. Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infestations by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. American Journal of Enology and Viticulture 39: 67-70.
- Calvo, P., E. Ormeño-Orrillo, E. Martínez-Romero and D. Zúñiga. 2010. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. Brazilian Journal of Microbiology 41(4): 899-906.
- Chaurasia, B., A. Pandey, L.M. S. Palni, P. Trivedi, B. Kumar and N. Colvin. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiological Research 160(1): 75-81.
- Deshwal, V.K., P. Pandey, S.C. Kang and D.K. Maheshwari. 2003. Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. Indian Journal of Experimental Biology 41(10): 1160-1164.
- Ekman, J., L. Tesoriero and S. Grigg. 2014. Pests, Diseases and Disorders of Babyleaf Vegetables: A Field Identification Guide. Applied Horticultural Research, New South Wales. 114 p.
- Fernando, W.G.D. and R.G. Linderman. 1995. Inhibition of *Phytophthora vignae* and stem and root rot of cowpea by soil bacteria. Biological Agriculture and Horticulture 12(1): 1-14.
- Fiddaman, P.J. and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology 74(2): 119-126.
- Fiddaman, P.J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology 76(4): 395-405.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2(1): 43-56.
- Homma, Y., Z. Sato, F. Hirayama, K. Konno, H. Shirahama and T. Suzui. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne

- plant pathogens. Soil Biology and Biochemistry 21(5): 723-728.
- Kai, M., U. Effmert, G. Berg and B. Piechulla. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology 187(5): 351-360.
- Khianggam, S., Y. Pootaeng-on, T. Techakriengkrai and S. Tanasupawat. 2014. Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4(4): 090-096.
- Kurze, S., H. Bahl, R. Dahl and G. Berg. 2001. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. Plant Disease 85(5): 529-534.
- Nelson, E.B., W.L. Chao, J.M. Norton, G.T. Nash and G.E. Harman. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. Phytopathology 76(3): 327-335.
- Richard, N.R. 2004. Lettuce diseases and their management. pp. 121-147. In: S.A.M.H. Naqvi (ed.). Diseases of Fruits and Vegetables. Vol. 2. Springer, Dordrecht.
- Tenorio-Salgado, S., R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, J. Caballero-Mellado and E. Perez-Rueda. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered 4(4): 236-243.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453-483.
- Wheatley, R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. Antonie Van Leeuwenhoek 81: 357-364.
-