

การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุ โรคต้นแตกกยางไหลของเมลอน

Selection of Rhizobacteria Against of Gummy Stem Blight Pathogen of Melon

จันทรา อูปาลี และ อรุมา เรืองวงศ์
Jantar Aupalee and On-Uma Ruangwong*

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: On-uma.r@cmu.ac.th

(Received: 1 August 2017; Accepted: 27 October 2017)

Abstract: Selection of rhizobacteria from soil cultivated with melon crops from Pa Sang district, Lamphun province and Mae Hia Agricultural Research, Demonstrative and Training Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University for controlling *Didymella bryoniae* causal agent of melon gummy stem blight disease was conducted. Total of 149 rhizobacteria isolates were obtained and used for evaluation of antagonistic activity against *D. bryoniae* by dual culture method. Nine isolates of rhizobacteria showed the growth inhibition of *D. bryoniae*. Among them, isolate S93 and S138 showed the highest antagonistic activity to inhibit mycelial growth with 81.20 and 82.40%, respectively. Moreover, cell-free culture filtrated of isolates S93 caused malformation and swelling germtube of fungal pathogen and isolate S138 could delay fungal spore germination. Two antagonistic rhizobacteria were identified based on morphological characteristic and 16S rDNA gene. The result showed that isolate S93 was gram positive bacterium with rod shape cell and the 16S rDNA sequence of S93 showed 99% homology with *Bacillus subtilis*. Meanwhile, isolate S138 was gram negative bacterium with rod shape cell and its partial sequence was 99% homology with *Enterobacter asburiae*.

Keywords: Gummy stem blight, melon, *Didymella bryoniae*, antagonistic bacteria, biological control

บทคัดย่อ: การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบ ๆ ราก ของเมลอนที่ไม่เป็นโรค จากพื้นที่ปลูกเมลอน ในอำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน และศูนย์วิจัยสายิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อนำมาควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของเมลอน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียรอบรากได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *D. bryoniae* ด้วยวิธี dual culture พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ จำนวน 9 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S93 และ S138 ซึ่งมีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 81.20 และ 82.40 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำกรองของไอโซเลท S93 ทำให้การงอกของเชื้อราสาเหตุโรคมีความผิดปกติ โดยจะทำให้ germ tube มีลักษณะบวมพอง และไอโซเลท S138 ทำให้มีการชะลอการงอกของสปอร์ได้ เมื่อนำเชื้อ แบคทีเรียรอบรากทั้ง 2 ไอโซเลท มาจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท S93 เป็นแกรมบวก เชลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง และมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท S138 เป็นแกรมลบ เชลล์มีรูปร่างเป็นแท่งเล็ก ๆ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โรคต้นแตกยางไหล เมล่อน *Didymella bryoniae* เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ การควบคุมโดยชีววิธี

คำนำ

แตงเทศ หรือเมลอน (melon) และแคนตาลูป เป็นพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) (อภิชาติ และสุธิพงศ์, 2558) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกกันมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ พืชวงศ์แตงที่นิยมปลูกในประเทศไทย มีทั้งเพื่อรับประทานผลสด และเพื่อผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ส่งต่างประเทศ จึงอาจส่งผลให้เกิดปัญหาโรคของพืชวงศ์แตงเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องมาจากเมล็ดพันธุ์ไม่สะอาด มีการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคติดมากับเมล็ดพันธุ์ เมื่อนำเมล็ดที่มีเชื้อสาเหตุโรคมาปลูกจะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกด้วย (จุมพล และอรพรรณ, 2532)

โรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight) เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm. (ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ *Stagonosporopsis cucurbitacearum* ชื่อเดิม *Phoma cucurbitacearum*) (Keinath, 2012) เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาด และเข้าทำลายในพืชวงศ์แตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืชวงศ์แตงในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรค คือ บริเวณ

แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และจะแห้งอยู่บริเวณแผล โรคนี้หากมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก จะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง (ทัศนพร และพีระวรรณ, 2552) นอกจากนี้เชื้อสาเหตุดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดไปทางเมล็ดพันธุ์ได้ Sudisha *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *D. bryoniae* ผ่านทางเมล็ด โดยทำการเพาะเมล็ดเมลอนที่มีการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) พบว่า เชื้อจะเริ่มเข้าทำลายที่ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyls) และใบเลี้ยง (cotyledons) ต่อมาต้นกล้าจะแสดงอาการแคระแกรน นอกจากนี้ยังพบโครงสร้าง pycnidia ของเชื้อราบนเมล็ดที่ไม่งอก ดังนั้นในการผลิตเมล็ดพันธุ์หรือผลสดจากเมลอน ต้องมีการป้องกันกำจัดโรคนี้เป็นอย่างดี

การป้องกันกำจัดโรคของพืชวงศ์แตงมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การเกษตรกรรม การใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้สารเคมี สำหรับการให้พันธุ์ต้านทานนั้นมีค่าใช้จ่ายสูง และการใช้สารเคมีทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และเกิดการตกค้างของสารเคมีในพืช สภาพแวดล้อม รวมไปถึงเกษตรกรเอง ปัจจุบันยังได้มีการศึกษาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) อย่างกว้างขวาง เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรียบนผิวใบเสารวมควบคุมโรคแอนแทรคโนส

ของเส้นราที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* sp. (สุดาพร และคณะ, 2550) การใช้แอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบรากมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรคในแปลงปลูกมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ (อรอุมา และเบญจวรรณ, 2560) หรือ การใช้แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ลำไยมาควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย (เกวลิน และชัยพร, 2555) นอกจากนี้ Abd-El-Moity *et al.* (2003) รายงานว่า การนำเชื้อที่แยกจากดิน ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ผสมร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma hazianum* สามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราในพืชวงศ์แตงได้ Beneduzi *et al.* (2012) รายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* และ *Bacillus* บางชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณดินรอบ ๆ รากพืช (แบคทีเรียรอบราก) สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย โปโตซัว และไส้เดือนฝอย ที่อาศัยอยู่ในดิน และชักนำให้พืชเกิดการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียรอบรากพืช ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตงยางไหลของเมลอน ในสภาพห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคในแปลงปลูกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ และการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคต้นแตงยางไหลของเมลอน

สำรวจโรคต้นแตงยางไหล ในพื้นที่ปลูกเมลอน ตำบลหาดง อำเภอบางบาล และตำบลยุ้ว อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ และตำบลบ้านเรือน อำเภอบางบาล จังหวัดลำพูน และสุ่มเก็บต้นเมลอนและส่วนที่แสดงอาการของโรค มาตรวจสอบอาการและตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร PDA (potato dextrose agar; potato 200 กรัม, dextrose 20

กรัม, agar 17 กรัม, distilled water 1 ลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อที่ออกมาจากชั้นพีช จากนั้นแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อที่แยกได้เป็น stock culture เพื่อนำไปทำการศึกษาทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคต้นแตงยางไหลของเมลอน

นำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้สร้างสปอร์ (spore) ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Tsutsumi and da Silva (2004) ดังนี้ นำเชื้อราสาเหตุโรคมาเพาะเลี้ยงลงบนเมล็ดถั่วแดงญี่ปุ่น (azuki bean) ที่ผ่านการแช่น้ำสะอาดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดถั่วใส่ในขวดรูปชมพู่ และนำมาล้างเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นำเมล็ดถั่วที่ปลูกเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในที่มืด 12 ชั่วโมง สลับกับมีแสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ นำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ทำการเพาะเชื้อรา ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ชูดเบา ๆ บริเวณผิวเมล็ดถั่ว แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ซึ่งสปอร์ของเชื้อราที่ได้จะเป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ *S. cucurbitacearum* (Keinath, 2012) จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อมาปลูกลงบนต้นกล้าเมลอนพันธุ์อัลฟา (Alpha) ที่มีอายุประมาณ 10 วัน ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Nga *et al.* (2010) นำสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นลงบนใบจริงคู่แรกของต้นกล้าเมลอน จากนั้นบ่มไว้ในถุงพลาสติก ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาจึงนำต้นกล้าออกจากถุงพลาสติกเพื่อให้ได้รับแสงตามปกติ ส่วนชุดควบคุม ใช้น้ำที่ฆ่าแล้วพ่นลงบนใบเลี้ยงของต้นกล้าเมลอน สังเกตอาการที่เกิดขึ้นบนใบในวันที่ 1 และ 3 วันหลังการปลูกเชื้อ

3. การแยกแบคทีเรียรอบรากของเมลอน

การแยกแบคทีเรียรอบราก (rhizobacteria) ของต้นเมลอนที่ไม่เป็นโรค โดยแยกจากดินรอบรากของเมลอนที่สุ่มเก็บจากแปลงเมลอนใน ตำบลบ้านเรือน อำเภอบางบาล จังหวัดลำพูน และศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรม

การเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นนำดินมาแยกแบคทีเรีย ด้วยวิธีเจือจางสารละลายดิน (soil dilution method) โดย นำดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง เขย่าสาร 5 นาที ทั้งให้ตกตะกอน แล้วใช้ micro pipette ดูดสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำ กลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้สารแขวนลอยดิน เข้ากันแล้วเจือจางต่อไป นำสารแขวนลอยดินที่ความ เข้มข้น 10^{-4} - 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจาน อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (nutrient agar; peptone 5 กรัม, beef extract 3 กรัม, agar 20 กรัม, distilled water 1 ลิตร) จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ย (spread) สารละลายดิน ให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหาร ปิดฝาจาน อาหาร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 วัน จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียที่เจริญบน ผิวน้ำอาหาร มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากของเมลอนในการ ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคต้นแตงกวางไหลของเมลอนใน ห้องปฏิบัติการ

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย รอบรากที่แยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียรอบรากทุกไอโซเลทที่แยกได้มา ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) และเชื้อแบคทีเรียรอบรากแต่ ละไอโซเลท แล้วขีดลงบนอาหาร PDA ความยาว 7 เซนติเมตร ให้ห่างจากขอบจานอาหารด้านละ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มา เจาะด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นวุ้น ที่มีเชื้อรา (culture disc) ดังกล่าว มาวางบนจานอาหารที่ ได้ทำการขีดเชื้อ แบคทีเรียรอบราก ไว้ตามแบบการ ทดลองที่กำหนด โดยวางให้ห่างจากเชื้อแบคทีเรียรอบราก 4 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-8 วัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ การวัดผลโดยวัดความยาวรัศมีของเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ ร (percent inhibition of radial growth; PIRG) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามสูตรการคำนวณของ Skidmore and Dickinson (1976) ดังภาพที่ 1

4.2 การทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของ เชื้อแบคทีเรียรอบราก

นำเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพมาก ที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมาทำการทดสอบอีก ครั้ง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรอบรากเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน บนอาหาร NA จากนั้นจึงวางเชื้อ ราสาเหตุโรคเหมือนการทดลองที่ 4.1 แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-8 วัน วางแผนการ ทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ และวัดการเจริญของเชื้อ รา โดยวัดความยาวรัศมีของเส้นใย จากนั้นนำมา คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อตามวิธี

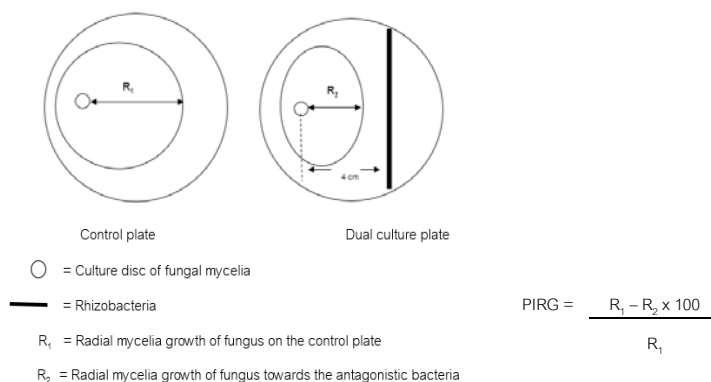


Figure 1. Dual culture method illustrating measurement of radial growth of fungal mycelia

ที่กล่าวข้างต้น และประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อราสาเหตุโรค จากร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ โดยใช้เกณฑ์ของ Kumar *et al.* (2007) ดังนี้ >90 % คือ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก, 76-90% คือ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง, 61-75% คือ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง และ <60% คือ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียรอบรากในการยับยั้งการออกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

นำเชื้อ แบคทีเรียรอบราก ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค มาเลี้ยงในอาหารเหลว PSB (potato sucrose broth; potato 200 กรัม, sucrose 20 กรัม, distilled water 1 ลิตร) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมารองด้วยที่กรองเซลล์แบคทีเรีย (membrane filter) ขนาด 0.22 มิลลิเมตร แล้วนำน้ำกรอง (culture filtrate) ที่ได้ใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *D. bryoniae* (ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) และ *S. cucurbitacearum* (ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ) ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิตร เติมน้ำลงในหลอด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นมาเชื้อ เติมน้ำลงในหลอด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร 5 นาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำส่วนผสมที่เตรียมได้ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ไปหยดลงบนชิ้นวุ้น WA (water agar; agar 17 กรัม, distilled water 1 ลิตร) ที่เตรียมเป็น slide culture ทำการทดสอบทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนับสปอร์ที่งอกภายใต้ compound microscope เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการนับสปอร์ที่งอก 100 สปอร์ต่อ 1 ซ้ำ โดยสปอร์ที่งอก หมายถึง สปอร์ที่งอก germ tube โดยมีความยาวเท่ากับความกว้างของสปอร์ (Lucas *et al.*, 1975) จากนั้นนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความงอกของสปอร์

6. การจัดจำแนกชนิด (identification) ของเชื้อแบคทีเรียรอบราก

6.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกต และบันทึกรูปร่างลักษณะ และสีของ colony ที่พบ และตรวจสอบ ด้วย 3% potassium hydroxide test (KOH) ตามวิธีของ Suslow *et al.* (1982) เพื่อเป็นการทดสอบแกรมเบื้องต้น จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสีแกรม (gram's stain) ตามวิธีของ Nga *et al.* (2010) เพื่อทดสอบแกรม และดูลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย

6.2 การจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม (genetic material)

จัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบรากโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย primer 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') การทำ PCR โดยมีขั้นตอน ดังนี้ initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มจำนวน 35 รอบ โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำ PCR products ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย multiscreen filter plate (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) แล้วตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Pane and Zaccardelli, 2015) เพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ และการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคต้นแตงยางไหลของเมลอน

จากการสำรวจโรคต้นแตงยางไหล ในพื้นที่ปลูกเมลอนจากพื้นที่ปลูกทั้ง 2 แหล่ง โดยอาการต้นแตงยางไหลของ เมลอนที่สำรวจพบในแปลงปลูก ส่วนใหญ่จะพบแผลบริเวณลำต้น (ภาพที่ 2A) ก้านใบของเมลอน (ภาพที่ 2B) และอาการที่ใบ (ภาพที่ 2C) แผลที่เป็นโรคจะมีลักษณะเป็นสีเทา ช้ำน้ำ แต่มีรูปร่างไม่แน่นอน และบริเวณแผลจะพบจุดสีดำขนาดเล็ก กระจายอยู่ทั่วแผล บางแผลอาจมองเห็นยางสีดำแห้งติดบริเวณแผลด้วย (ภาพที่ 2D)

เมื่อตรวจสอบแผลบริเวณลำต้นที่เป็นโรคภายใต้ stereo microscope พบโครงสร้าง perithecia สีดำ ที่มองเห็น ostiole ได้ชัดเจน (ภาพที่ 3A) ลักษณะสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคเมื่อตรวจภายใต้กล้อง compound microscope พบ ascospores อยู่ภายในถุงที่เรียกว่า ascus (ภาพที่ 3B) โดยสปอร์นี้มี 2 เซลล์ สีใส มีขนาด $3-4 \times 7-15$ ไมโครเมตร (ภาพที่ 3C) เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวอมเทาถึงสีดำ (ภาพที่ 4D) ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับเชื้อรา

D. bryoniae ที่มีการรายงานโดย Newark *et al.* (2014) และสามารถแยกได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต I1-I4

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคต้นแตงยางไหลของเมลอน

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าการปลูกเชื้อด้วยการพ่นสปอร์แขวนลอยบนต้นกล้าเมลอนอายุประมาณ 10 วัน สามารถทำให้ต้นกล้าเมลอนเกิดโรคได้ทุกไอโซเลต หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 วัน พบจุดช้ำน้ำบริเวณขอบใบ (ภาพที่ 4B-E) จากนั้นในวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ อาการจุดช้ำน้ำจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง ขนาดใหญ่ขึ้น ใบเริ่มแสดงอาการเหี่ยว และอาการลูกกลมลงมายังบริเวณลำต้น (ภาพที่ 4G-J) หากทิ้งไว้นานขึ้นต้นกล้าก็จะเกิดการแห้งพุ่มตัวลง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมต้นกล้าเมลอนยังคงเป็นสีเขียวปกติ และไม่พบอาการของโรค (ภาพที่ 4A, F) เมื่อนำต้นที่แสดงอาการของโรคมาตรวจสอบภายใต้ stereo microscope พบ perithecia ของเชื้อราเจริญตรงบริเวณลำต้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อรา *D. bryoniae* ตามการรายงานของ Newark *et al.* (2014)

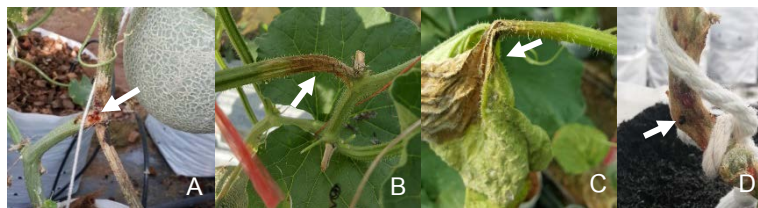


Figure 2. Symptoms of gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* on melon, lesion on stem (A), lesion on petiole (B) lesion on leaf (C) and gummy ooze on stem (D)

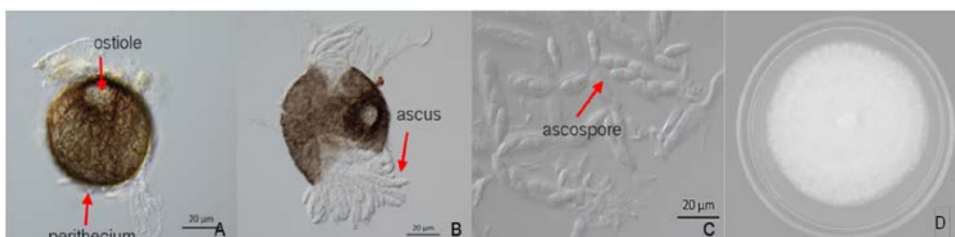


Figure 3. Morphological characteristic of *Didymella bryoniae* causal agent of gummy stem blight disease on melon in growing area at Chiang Mai province, perithecium (A), ascus (B), ascospores (C) and colony of *Didymella bryoniae* on PDA for 6 days (D)

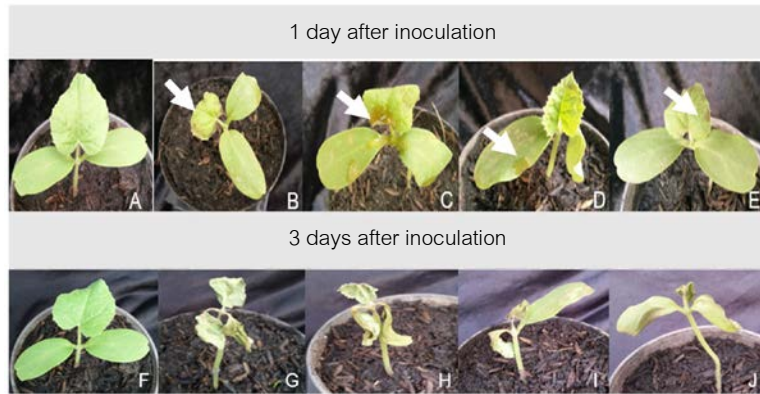


Figure 4. The pathogenicity test of fungal pathogen by spore suspension at concentration of 10^5 spores/ml, control (A, F), isolate I1 (B, G), isolate I2 (C, H), isolate I3 (D, I) and isolate I4 (E, J)

3. การแยกแบคทีเรียรอบรากของเมลอน

จากการแยกแบคทีเรียรอบรากด้วยวิธีเจือจาง สารละลายดิน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สามารถแยก แบคทีเรีย ได้ทั้งหมด จำนวน 149 ไอโซเลท โดยแยกจาก ดินของแปลงปลูกเมลอนใน ตำบลบ้านเรือน อำเภอ ปาซาง จังหวัดลำพูน ได้ 141 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S1 - S141 และจากศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตร แม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ได้ 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S142 - S149

4. การคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากของเมลอนในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคต้นแตงกวางไหลของเมลอนในห้องปฏิบัติการ

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียรอบรากจำนวน 149 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตงกวางไหลของเมลอนด้วยวิธี dual culture โดยการวางเชื้อแบคทีเรียรอบรากและเชื้อรา สาเหตุโรคร่วมกัน พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียรอบรากจำนวน 9 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งอยู่ในช่วง 14.8-40 (ตารางที่ 1) ได้แก่ ไอโซเลท 93, 138, 94, 119, 89, 121, 103, 122 และ 30 โดยมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 40.0, 33.6, 20.0, 19.6, 18.8, 16.0, 15.2, 14.8 และ 14.8 ตามลำดับ แต่อีก

140 ไอโซเลท ไม่พบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ จากผล การทดสอบเห็นได้ว่าร้อยละของการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ยังคงมีประสิทธิภาพต่ำ (<60%) อย่างไรก็ตามมีรายงาน การวิจัยที่มีการนำเชื้อปฏิปักษ์ไปใช้ก่อนการเกิดโรคหรือ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค และพบว่ามีประสิทธิภาพการ ควบคุมโรคได้ดี เช่น Zhang and Xue (2010) ทดสอบการ ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* SB24 ที่แยกมาจากรากของ ถั่วเหลือง ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotium* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของถั่วเหลือง ผลการทดสอบพบว่า การนำเชื้อแบคทีเรีย SB42 พ่นลงบนต้นพืชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค มีประสิทธิภาพในการ ควบคุมโรคได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาโดย Filippi *et al.* (2011) ที่ได้แยกเชื้อแบคทีเรียรอบรากของ ต้นข้าว เพื่อนำมาทดสอบการควบคุมโรคไหม้ของข้าวที่ เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* โดยพบว่า การราด ดินด้วยเชื้อ Rhizo-55 ก่อนเป็นเวลา 15 วัน และเชื้อ Rhizo-46 เป็นเวลา 2 วัน ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค สามารถลดการเกิดโรคไหม้ได้ถึงร้อยละ 90.7 และ 95.03 ตามลำดับ จากรายงานการศึกษาดังกล่าว จึงเกิดแนวคิด ในการนำเชื้อแบคทีเรียรอบรากปฏิปักษ์ที่มีร้อยละการ ยับยั้งมากที่สุดในสองลำดับแรกไปทดสอบเพื่อยืนยัน ประสิทธิภาพอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบระยะเวลาการนำ เชื้อปฏิปักษ์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารก่อนการนำเชื้อสาเหตุ โรคมาทดสอบ แล้วจึงวัดประสิทธิภาพ

Table 1. The efficacy of 9 antagonistic rhizobacteria isolates against *Didymella bryoniae* by dual culture method

Isolates	PIRG ² (%)
93	40.0 ^{a1}
138	33.6 ^b
94	20.0 ^c
119	19.6 ^c
89	18.8 ^c
121	16.0 ^c
103	15.2 ^c
122	14.8 ^c
30	14.8 ^c
Control	0.0 ^d
CV (%)	21.42

¹ Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $P=0.05$

² PIRG = Percent inhibition of radial growth

4.2 การทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียรอบราก

นำเชื้อแบคทีเรียรอบรากจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S93 และ S138 ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมาทดสอบประสิทธิภาพอีกครั้ง ด้วยวิธี dual culture โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท S93 และ S138 บนอาหาร NA เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน แล้วจึงนำเชื้อราสาเหตุโรคมาทดสอบ พบว่า ไอโซเลท S138 มีร้อยละการยับยั้งมากกว่าไอโซเลท S93 โดยไอโซเลท S138 มีการยับยั้งมากที่สุดในวันที่ 6 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 87.20 (ภาพที่ 5) และประสิทธิภาพจะลดลงในวันที่ 7 โดยสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 82.40 ในขณะที่ไอโซเลท S93 มีร้อยละการยับยั้งเพิ่มขึ้น และมีการยับยั้งมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน โดยมีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 81.20 (ตารางที่ 2) เมื่อประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา พบว่า ไอโซเลท S93 และ S138 มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง (ร้อยละ 75-90) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 6 วัน ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค จากผลการทดลองครั้งนี้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบข้อ 4.1

ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคได้เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น กลไกการยับยั้งโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชมีหลายแบบ เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ เป็นต้น ได้มีการศึกษาถึงช่วงเวลาในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น Hammami *et al.* (2009) ได้ศึกษาการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ bacteriocin ของเชื้อ *B. subtilis* strain 14B ที่ใช้ควบคุมเชื้อ *Agrobacterium* spp. สาเหตุโรคปุ่มปม (crown gall) ในพืชหลายชนิด โดยพบว่าการผลิตสาร bacteriocin มีมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Luria bertani (LB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 วัน นอกจากนี้ Georgakopoulos *et al.* (2002) ได้นำเอาเชื้อ *Pseudomonas* มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pythium ultimum* สาเหตุโรคเน่าคอดินของแตงกวาและผักกาดฝรั่ง (sugar beet) ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* บนอาหารแข็งชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน และ 4 วัน ก่อนการทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคเช่นเดียวกัน



Figure 5. The efficacy of isolate S93 and S138 for growth inhibition of *Didymella bryoniae* on PDA; 6 days of incubation period of rhizobacteria on PDA before placing the fungal pathogen

Table 2. The efficacy of the most effective rhizobacteria 2 isolates on growth inhibition of *Didymella bryoniae*

Isolates of rhizobacteria	PIRG ³						
	1 day ¹	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days
Control	0.00 ^{c2}	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	2.40 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b
S93	58.40 ^b	56.40 ^b	60.80 ^b	66.00 ^b	55.20 ^b	78.40 ^b	81.20 ^a
S138	60.40 ^a	64.00 ^a	68.80 ^a	75.20 ^a	70.40 ^a	87.20 ^a	82.40 ^a
CV (%)	7.66	5.15	7.61	10.6	9.55	2.09	10.73

¹ Incubation period of antagonistic bacteria on PDA before placing the fungal pathogen

² Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $P=0.05$

³ PIRG = Percent inhibition of radial growth

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียรอบรากในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

การทดสอบน้ำกรองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรอบรากไอโซเลท S93 และ S138 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ระยะการสืบพันธุ์ เมื่อตรวจนับการงอกของสปอร์ 15 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ พบว่าในชุดควบคุมมีการงอกของสปอร์เชื้อรา *D. bryoniae* และสปอร์ของเชื้อราในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เชื้อรา *S. cucurbitacearum* เท่ากับร้อยละ 100 ในขณะที่สปอร์ในชุดทดสอบกับไอโซเลท S93 และ S138 มีการงอกของเชื้อราทั้ง 2 ระยะเท่ากับร้อยละ 100 เช่นกัน เห็นได้ว่าน้ำกรองที่ได้จากไอโซเลท S93 และ S138 ไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ทั้ง 2 ระยะได้ อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบรูปร่างของสปอร์ พบว่ามีความผิดปกติ เมื่อทดสอบกับน้ำกรองของไอโซเลท S93 สปอร์ของเชื้อราที่มีการงอก

ซึ่งลักษณะของ germ tube มีรูปร่างผิดปกติ โดยมีการบวมพองของส่วน germ tube ซึ่งพบได้กับสปอร์ทั้ง 2 ระยะ (ภาพที่ 6B, E) ในขณะที่น้ำกรองของไอโซเลท S138 ทำให้เกิดการงอกของสปอร์ลดช้าลง แต่ไม่พบความผิดปกติของสปอร์เชื้อราทั้ง 2 ระยะ (ภาพที่ 6C, F) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเชื้อราที่มีการงอกปกติ (ภาพที่ 6A, D) มีรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าน้ำกรองที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาทดสอบการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคและให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการรายงานนี้ เช่น Phuakjaiphaeo *et al.* (2016) ได้นำน้ำกรองจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. CEN26 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project-z (ISP-2) ทดสอบต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า พบว่าน้ำกรองนั้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้และทำให้สปอร์เชื้อราที่มีรูปร่างผิดปกติ เช่น เกิดการบวมพองของ germ tube

หรือมีอัตราการงอกของสปอร์ช้าลง นอกจากนี้ Li *et al.* (2015) ได้รายงานผลการใช้น้ำกรองของเชื้อ *B. megaterium* strain L2 ในอาหาร nutrient broth (NB) โดยพบว่าน้ำกรองดังกล่าวมีผลทำให้สปอร์ของเชื้อรา *A. alternata* มีความผิดปกติและยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เช่นกัน จากผลการทดลองเป็นไปได้อย่างสำคัญ บางอย่างที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคยังคงมีอยู่ในอาหาร เหลวถึงแม้ว่าจะมีการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกและ ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้

6. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบราก

6.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

การตรวจสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียรอบรากไอโซเลท S93 และ S138 ดังนี้ โคโลนีของไอโซเลท S93 บนอาหาร NA จะมีสีครีม (cream)

ทึบแสง (opaque) มีขอบหยัก (undulate) รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) มีการยกตัวสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (raised) และผิวหน้าย่น (rugose) (ภาพที่ 7A) เมื่อนำมาทดสอบแกรมเบื้องต้นด้วย 3% KOH พบว่าไม่มีลักษณะเป็นสายเหนียวติดกับห่วงถ่ายเชื้อ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นนำมายืนยันผลอีกครั้งด้วยการย้อมแกรมพบว่า เซลล์ติดสีม่วงแสดงว่าเป็นแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) (ภาพที่ 7B) และส่วนไอโซเลท S138 จะมีโคโลนีสีขาวอมเหลือง โปร่งแสง (translucent) ขอบเรียบ (entire) รูปร่างกลม (circular) มีการยกตัวโค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร (convex) และผิวหน้าเรียบ (smooth) (ภาพที่ 7C) เมื่อนำมาทดสอบแกรมเบื้องต้นด้วย 3% KOH พบว่า มีลักษณะเป็นสายเหนียวติดกับห่วงถ่ายเชื้อ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นนำมาย้อมแกรมพบว่า เซลล์ติดสีแดงแสดงว่าเป็นแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งเล็ก ๆ (ภาพที่ 7D)

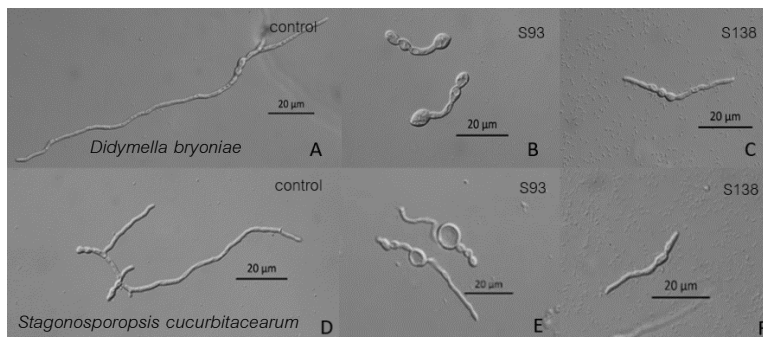


Figure 6. The efficacy of isolates S93 and S138 to inhibit spore germination of *Didymella bryoniae* and *Stagonosporopsis cucurbitacearum* on WA, 15 hours after incubation, control (A, D), isolate S93 (B, E) and isolate S138 (C, F)

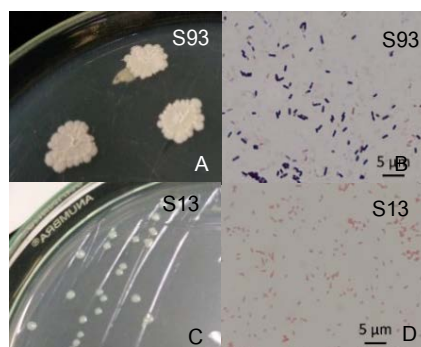


Figure 7. Morphological characteristics of rhizobacteria isolate S93 and S138; colony of isolate S93 on NA for 7 days (A), gram positive of isolate S93 (B), colony of isolate S138 on NA for 3 days (C) and gram negative of isolate S138 (D)

6.2 การจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม (genetic material)

การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ไอโซเลท S93 และ S138 ในบริเวณ 16S rDNA gene พบว่า ไอโซเลท S93 มีบริเวณ 16S rDNA gene ขนาด 707 bp และไอโซเลท S138 มีขนาด 1,506 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (sequence alignment) ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท S93 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อ *Bacillus subtilis* strain BAB-2742 และ *B. subtilis* strain YS15 โดยมีความเหมือนกันถึง 99% ซึ่งจากผลการวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Ahmed Idris et al. (2007) ที่พบว่าเชื้อ *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* ที่แยกจากดินบริเวณ rhizosphere ของข้าวฟ่างสามารถลดการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ นอกจากนี้ Yu et al. (2011) รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินบริเวณ rhizosphere ของต้นพริกไทยสามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ได้เช่นเดียวกัน

ไอโซเลท S138 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* strain ATCC 35953 และ uncultured bacterium clone S42_071 โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 99% ซึ่งจากผลการวิจัยครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Jetiyanon and Plianbangchang (2013) ที่แยกเชื้อ *E. asburiae* จากดินบริเวณ rhizosphere ของผักกาดหอมสามารถป้องกันโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Pectobacterium catovorum* subsp. *catovorum* ได้ อย่างไรก็ตามมีผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *E. asburiae* เป็นสาเหตุที่ก่อโรคในมนุษย์ (Zhu et al., 2017) ซึ่งทำให้เกิดโรคปอดอักเสบ (community-acquired pneumonia) การติดเชื้อของเนื้อเยื่อ (soft tissue infections) การติดเชื้อของบาดแผล (wound infection) และการติดเชื้ออื่น ๆ (Mardaneh and Soltan-Dallal, 2014) ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการนำเชื้อไอโซเลท

S138 มาใช้ในการทดลองหรือควรมีการตรวจสอบคุณสมบัติในการก่อโรคในมนุษย์

สรุป

การแยกเชื้อ rhizobacteria จากดินรอบ ๆ รากของต้นเมลอนที่ไม่เป็นโรค เพื่อใช้ทดสอบการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคต้นแตงยางไหลของเมลอนในห้องปฏิบัติการสามารถแยกเชื้อ แบคทีเรียรอบราก ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S93 และ S138 และจากการจำแนกชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA gene พบว่าไอโซเลท S93 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA gene ที่เหมือนกับเชื้อ *B. subtilis* strain BAB-2742 และ *B. subtilis* strain YS15 และ ไอโซเลท S138 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA gene ที่เหมือนกับเชื้อ *E. asburiae* strain ATCC 35953 และ uncultured bacterium clone S42_071 ซึ่งเชื้อ *E. asburiae* มีความเสี่ยงที่จะเป็นเชื้อสาเหตุของโรคในมนุษย์ จึงหลีกเลี่ยงนำไปศึกษาต่อ อย่างไรก็ตามควรนำเชื้อไอโซเลท S93 ไปศึกษาต่อในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ แล้วนำไปทดสอบในสภาพเรือนทดลอง หรือแปลงปลูกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ในการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน คุณาศักดากุล และ ชัยพร ชัดสงคราม. 2555. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร 28(3): 285-294.

- จุมพล สารนาค และ อรพรรณ วิเศษสังข์. 2532. โรคของผักที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์. วารสารเคหการเกษตร 13: 141-144.
- ทัศนพร ทศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. จดหมายข่าวผลไม้ 12(3): 2-3.
- สุดาพร ปุกแก้ว อังสนา อัครพิศาล อรอุมา เรืองวงษ์ เกวลิณ คุณาศักดากุล และ จิราพร ตยติวุตติกุล. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียบนผิวใบเพื่อควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของเสาวรส. วารสารเกษตร 23(2): 147-153.
- อภิชาติ ศรีสอาด และ สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย. 2558. เมล่อน & แคนตาลูป เงินล้าน. นาคา อินเทอร์เน็ตเดีย, กรุงเทพฯ. 136 หน้า.
- อรอุมา เรืองวงษ์ และ เบญจวรรณ ใจจันทร์. 2560. การใช้แอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ. วารสารเกษตร 33(1): 49-59.
- Abd-El-Moity, T.H., M.L. Abed El-Moneim, M.M.M. Tia, A.Z. Aly and M.R.A. Tohamy. 2003. Biological control of some cucumber diseases under organic agriculture. Acta Horticulturae 608: 227-236.
- Ahmed Idris, H., N. Labuschagne and L. Korsten. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. Biological Control 40(1): 97-106.
- Beneduzi, A., A. Ambrosini and L.M.P. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35(4): 1044-1051.
- Filippi, M.C.C., G.B. da Silva, V.L. Silva-Lobo, M.V.C.B. Cortes, A.J.G. Moraes and A.S. Prabhu. 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. Biological Control 58(2): 160-166.
- Georgakopoulos, D.G., P. Fiddaman, C. Leifert and N.E. Malathrakis. 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. Journal of Applied Microbiology 92(6): 1078-1086.
- Hammami, I., A. Rhouma, B. Jaouadi, A. Rebai and X. Nesme. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. Strains. Letters in Applied Microbiology 48(2): 253-260.
- Jetiyanon, K. and P. Plianbangchang. 2013. Lipopolysaccharide of *Enterobacter asburiae* strain RS83: A bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. Biological Control 67(3): 301-307.
- Keinath, A.P. 2012. Differential sensitivity to boscalid in conidia and ascospores of *Didymella bryoniae* and frequency of boscalid-insensitive isolates in South Carolina. Plant Disease 96(2): 228-234.
- Kumar, A.S., N.P.E. Reddy, K.H. Reddy and M.C. Devi. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. Plant Pathology Bulletin 16: 157-160.
- Li, Z., B. Guob, K. Wanb, M. Conga, H. Huanga and Y. Ge. 2015. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*. Biotechnology &

- Biotechnological Equipment 29(6): 1062-1068.
- Lucas, J.A., R.E. Kendrick and C.V. Given. 1975. Photocontrol of fungal spore germination. Plant Physiology 56(6): 847-849.
- Mardaneh, J. and M.M. Soltan-Dallal. 2014. Isolation and identification *Enterobacter asburiae* from consumed powdered infant formula milk (PIF) in the neonatal intensive care unit (NICU). Acta Medica Iranica 54(1): 39-43.
- Newark, M., M.L. Paret, N.S. Dufault and J.H. Freeman. 2014. Management of gummy stem blight (black rot) on cucurbits in Florida. UF/IFAS Extension, University of Florida, Gainesville. 8 p.
- Nga, N.T.T., N.T. Giau, N.T. Long, M. Lubeck, N.P. Shetty, E.de Neergaard, T.T.T. Thuy, P.V. Kim and H.J.L. Jorgensen. 2010. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. Journal of Applied Microbiology 109(2): 567-582.
- Phuakjaiphaeo, C., C.I. Chang, O. Ruangwong and K. Kunasakdakul. 2016. Isolation and identification of an antifungal compound from endophytic *Streptomyces* sp. CEN26 active against *Alternaria brassicicola*. Letters in Applied Microbiology 63(1): 38-44.
- Pane, C. and M. Zaccardelli. 2015. Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. Biological Control 84: 11-18.
- Skidmore, A.M. and C.H. Dickinson. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society 66(1): 57-64.
- Sudisha, J., S.R. Niranjana, S. Umesha, H.S. Prakash and H. S. Shetty. 2006. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. Biological Control 37(2): 196-205.
- Suslow, T.V., M.N. Schroth and M. Isaka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72(2): 917-918.
- Tsutsumi, C. Y. and N. da Silva. 2004. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology 47(2): 171-177.
- Yu, X., C. Ai, L. Xin and G. Zhou. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology 47: 138-145.
- Zhang, J.X. and A.G. Xue. 2010. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. Plant Pathology 59(2): 382-391.
- Zhu, B., S. Wang, O. Li, A. Hussain, A. Hussain, J. Shen and M. Ibrahim. 2017. High-quality genome sequence of human pathogen *Enterobacter asburiae* type strain 1497-78^T. Journal of Global Antimicrobial Resistance 8: 104-105.