

การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากแบคทีเรียของเมลอน

Selection of Rhizobacteria to Control Bacterial Fruit Blotch of Melon

สุดารัตน์ แก้วน้ำอ่าง อังสนา อัครพิศาล และ อรุมา เรืองวงษ์*

Sudarat Kaewnamarng, Angsana Akarapisan 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 antagonistic bacteria from melon rhizosphere for controlling *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch disease of melon was carried out. Total of 149 rhizobacteria isolates were isolated by soil dilution plate method, 141 isolates from Ban Ruean subdistrict, Pa Sang district, Lamphun province and 8 isolates from Mae Hia Agricultural Research, Demonstrative and Training Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Paper disc diffusion method was used to evaluate the antagonistic activity of isolated rhizobacteria against *A. citrulli*. Four isolates of rhizobacteria demonstrated an inhibitory activity including isolates S93, S97, S125 and S126 with inhibition zone of 1.44, 1.36, 1.74 and 0.86 cm, respectively. The results of screening test for controlling bacterial fruit blotch disease in greenhouse exhibited that isolates S125 and S93 could inhibit disease development with 70.00% and 63.33%, respectively. Identification of both effective antagonistic rhizobacteria, isolates S125 and S93, was conducted based on morphological characteristic and 16S rDNA sequencing. The result showed that partial gene sequencing of isolate S125 was 100% homology with *Pseudomonas monteilii* and isolate S93 was 99% homology with *Bacillus subtilis*.

Keywords: Bacterial fruit blotch, rhizobacteria, *Acidovorax citrulli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas monteilii*

บทคัดย่อ: การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏจากดินบริเวณรอบรากของเมลอน เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลท ด้วยวิธี soil dilution plate ซึ่ง 141 ไอโซเลท แยกจากแปลงเกษตรกรรมในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน และ 8 ไอโซเลท จากศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ ได้แก่ ไอโซเลท S93, S97, S125 และ S126 โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.44, 1.36, 1.74 และ 0.86 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสองลำดับแรกไปทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนทดสอบ พบว่า ไอโซเลท S125 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ร้อยละ 70.00 และไอโซเลท S93 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ร้อยละ 63.33 เมื่อจัดจำแนกไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏทั้ง 2 ไอโซเลท โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท S125 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas monteilii* ถึงร้อยละ 100 และ ไอโซเลท S93 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ถึงร้อยละ 99

คำสำคัญ: โรคผลเน่าแบคทีเรีย ไรโซแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* *Bacillus subtilis* *Pseudomonas monteilii*

คำนำ

เมลอน (melon) หรือแตงเทศ อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์แตงเช่นเดียวกับแตงกวา แตงโม และมะระ เป็นต้น มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปแอฟริกา เมลอนเจริญได้ดีในสภาพอากาศร้อนแห้ง และแสงแดดจัด ปัจจุบันมีการปลูกเมลอนในทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยมีทั้งการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และการผลิตเพื่อบริโภคผลสด (อภิชาติ และ สุทธิพงศ์, 2558) แต่การปลูกเมลอนประสบปัญหาเรื่องการระบาดของโรคสำคัญหลายโรคเข้าทำลาย เช่น โรคผลเน่า (bacterial fruit blotch) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* โดยเชื้อสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ (Frankle et al., 1993) การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าของพืชวงศ์แตง เริ่มในปี ค.ศ. 1969 โดย Crall and Schenck แต่ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ ต่อมา Schaad et al. (1978) ศึกษาลักษณะอาการของโรคที่เกิดบนต้นกล้าแตงโม และรายงานว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* ในเวลาต่อมา Willems et al. (1992) ได้จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากชื่อเดิมให้เป็น *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Acidovorax*

อย่างไรก็ตาม Schaad et al. (2008) จัดหมวดหมู่ของเชื้อใหม่ จึงเปลี่ยนมาใช้ชื่อ *Acidovorax citrulli* เป็นต้นมา จากการศึกษาของ O'Brien and Martin (1999) พบว่าสาเหตุที่ทำให้การระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในหลายพื้นที่ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดผ่านไปยังเมล็ดพันธุ์ได้ ทำให้การควบคุมการระบาดของโรคเป็นไปได้ยาก ในประเทศไทยมีการรายงานพบโรคผลเน่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในจังหวัด นครราชสีมา ร้อยเอ็ด และขอนแก่น (Pinyapong, 1994)

ไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) คือกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณดินรอบรากพืช (rhizosphere) (Kloepper et al., 1991) ซึ่งบางชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชได้ โดยการแข่งขันหรือสร้างสารปฏิชีวนะ กลุ่มของไรโซแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืช เช่น *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Vessey, 2003) การศึกษาวิจัยที่มีการใช้จุลินทรีย์ปฏิบัฏมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรค เช่น อรอุมา และเบญจวรรณ (2560) ได้นำแอคติโนมัยซีท์ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากของมะเขือเทศที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ไม่เป็นโรคมายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเหี่ยวของมะเขือเทศ นอกจากนี้ เกวลิน และชัยพร (2555) ได้ใช้แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่แยกได้

จากลำไยมาควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย เป็นต้น ในการลดการใช้สารเคมี เพื่อการควบคุมโรคพืช และเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมถึงสิ่งแวดล้อม การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมโรค แทนการใช้สารเคมี จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซแบคทีเรียเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่าง การตรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค

สำรวจโรคผลเน่าในแปลงปลูกเมลอนและแคนตาลูปของเกษตรกรในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน และตำบลหางดง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างผลเมลอนและแคนตาลูปที่แสดงอาการเน่าเป็นจุดน้ำขนาดเล็ก และเน่าขนาดใหญ่ที่เป็นปื้นขนาดใหญ่สีเขียวมะกอกหรือสีดำ ที่เกิดขึ้นบริเวณของเปลือกเมลอนและแคนตาลูป

1.2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของเมลอนและแคนตาลูป ด้วยการใช้ชุดตรวจ Aac detection kit *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สำหรับโรคผลเน่าในพืชวงศ์แตง (บริษัท พาร์เวล อินเทอร์เน็ต จำกัด, ประเทศไทย) นำผิวเปลือกผลเมลอนหรือแคนตาลูปที่แสดงอาการเน่า 5 กรัม บดในบัฟเฟอร์ 2-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสด้านบนหยดลงในตลับ test kit ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วจึงอ่านผล หากเกิดแถบสีทั้ง test line (T) และ control line (C) หมายถึงให้ผลเป็นบวกแสดงว่ามีเชื้อ *A. citrulli* หากเกิดแถบสีที่ control line เพียงอย่างเดียว หมายถึงให้ผลเป็นลบแสดงว่าไม่มีเชื้อ *A. citrulli*

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า

นำผิวเปลือกผลเมลอนหรือแคนตาลูปที่ตรวจพบเชื้อ *A. citrulli* จากการตรวจด้วย Aac detection kit (ข้อ 1.2) มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดบริเวณผิวของเปลือกโดยใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 หั่นให้ละเอียดและหยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน suspension ดังกล่าว และ streak ลงบนอาหารที่ดัดแปลงมาจากสูตร modified Tween medium (peptone 5.0 กรัม, CaCl₂ 0.25 กรัม, agar 15 กรัม, methyl violet B จาก stock 1% 1.0 มิลลิลิตร หลังจากหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม Tween 80 10.0 มิลลิลิตร และ amoxicillin trihydrate 500 มิลลิกรัม) (Popovic and Ivanovic, 2015) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างกลม (round) จนถึง รูปไข่ (oval) สีเทา (grayish) มา streak บนอาหารชนิดเดิมอีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้ มาตรวจเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *A. citrulli* ด้วย Aac detection kit โดยนำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วหยดตัวอย่างลงในตลับ kit test ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วจึงอ่านผล

การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อ อักษรลำดับแรก คือ ชนิดพืช ลำดับที่สอง และสาม คือ ระยะการเจริญของผล ลำดับที่สี่ คือ ชื่อแหล่งที่เก็บตัวอย่างโรค และลำดับที่ 5 คือ ลำดับในการแยกเชื้อ เช่น MRFP2 โดยที่ M คือ แยกเชื้อมาจากผลเมลอน RF คือ ผลแก่ P คือ อำเภอ ป่าซาง จังหวัดลำพูน และ 2 คือ เชื้อแยกได้เป็นลำดับที่ 2

2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity test) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า มาเพิ่มปริมาณโดยการ streak ลงบนอาหาร NA (nutrient agar; peptone 5.0 กรัม, beef extract 3 กรัม, agar 15 กรัม, distilled water 1 ลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาเตรียม bacterial suspension โดยการขูดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร นำไปใส่ลงในปิпетต์ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่า

เชื้อปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (O.D. = 0.1) ด้วย spectrophotometer ซึ่งได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) แล้วจึงนำ bacterial suspension ไปปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าเมลอน ที่มีอายุ 7 วัน ด้วยวิธีการพ่นทางใบ (foliar spraying) ในปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบอาการและบันทึกผลหลังจากการปลูกเชื้อทุกวัน โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็น 5 ระดับ ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Wang *et al.* (2009) ดังนี้

- 0 = ไม่แสดงอาการ
- 1 = มีอาการจุดดำน้ำขนาดเล็กบนใบเลี้ยง และเนื้อเยื่อตายเฉพาะแห่งบนใบจริง หรือสร้างความเสียหายบนใบ คิดเป็นร้อยละ 1-15
- 2 = มีอาการจุดดำน้ำขนาดใหญ่บนใบเลี้ยง และเนื้อเยื่อตายเฉพาะแห่งบนใบจริง หรือสร้างความเสียหายบนใบ คิดเป็นร้อยละ 16-50
- 3 = ใบเลี้ยงหรือใบจริงตาย หรือสร้างความเสียหายบนใบคิดเป็นร้อยละ 51-80
- 4 = เกิดการตายของพืชทั้งต้น หรือสร้างความเสียหายบนใบร้อยละ >80

3. การแยกไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากเมลอน

แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบราก (ไรโซแบคทีเรีย) ต้นเมลอนที่มีลักษณะต้นแข็งแรงสมบูรณ์ไม่เป็นโรค โดยเก็บดินจากแปลงปลูกเมลอนในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน และศูนย์วิจัยสาริตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ นำดินมาแยกเชื้อด้วยวิธีเจือจางสารละลายดิน (soil dilution plate method) โดยชั่งดินตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (flask shaped) ที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งให้ตกตะกอน คูดสารแขวนลอยดินโดยใช้ micropipette ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้สารแขวนลอยดินเข้ากันแล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม นำสาร

แขวนลอยดินที่มีความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหาร NA นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 วัน แยกไรโซแบคทีเรียที่เจริญขึ้นบนผิวหน้าอาหาร โดยนำมา streak ลงบนอาหาร NA อีกครั้งเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเป็น stock culture (กำหนดรหัสของไรโซแบคทีเรียเป็น S และตามด้วยตัวเลขที่แสดงถึงลำดับในการแยกเชื้อ) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏในหึ่งปฏิบัติกร

คัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค บนอาหาร NA และบ่มเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น 10^9 cfu/ml แล้วจึงหยดเซลล์แขวนลอยลงบนอาหาร King's B (KB; proteose peptone 20 กรัม, K_2HPO_4 1.5 กรัม, agar 15 กรัม, glycerol 10 ml, $MgSO_4$ 1.5 กรัม, distilled water 1 ลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใช้สำลีพันก้าน (cotton bud) เก็ดยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ส่วนไรโซแบคทีเรียนำมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร NA บ่มเป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 cfu/ml จากนั้นคูดเซลล์แขวนลอยของไรโซแบคทีเรียปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc (ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้สักครู่แล้วจึงย้ายมาวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคไว้ แล้วจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยการวัดบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Drew *et al.* (1972)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ในโรงเรือน

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์

นำไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในสองลำดับแรก (ชนิดที่ 1 และ 2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในห้องปฏิบัติการ (จากผลการทดสอบในข้อ 4) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าบนต้นกล้าเมลอนโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ บนอาหาร NA แล้วนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยให้ได้ความเข้มข้น 10^8 และ 10^{10} cfu/ml ตามลำดับ ตามวิธีการเตรียมในข้อ 4

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคผลเน่า บนต้นกล้าเมลอนในโรงเรือนทดลอง

นำต้นกล้าเมลอนพันธุ์อัลฟ่า (Alpha) อายุ 7 วัน ที่ปลูกในวัสดุปลูกพีทมอส มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคของไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ ด้วยวิธีการพ่นทางใบ โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ชนิดที่ 1 ป่นไว้ 2 วัน แล้วจึงพ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

กรรมวิธีที่ 2 พ่นไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ชนิดที่ 2 ป่นไว้ 2 วัน แล้วจึงพ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 พ่นไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ชนิดที่ 1 เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 5 พ่นไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ชนิดที่ 2 เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 6 ขูดควบคุม (น้ำกลั่น)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยใน 1 กรรมวิธีมีทั้งหมด 15 ซ้ำ

หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคและไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ คลุมต้นพืชด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 2 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ภายใต้โรงเรือนทดสอบ ตรวจสอบอาการและบันทึกผลตามระดับความรุนแรงของโรค (วิธีการในข้อ 2) หลังจากการปลูกเชื้อเป็น

เวลา 2, 4, 6 และ 8 วัน จากนั้นนำมาคำนวณร้อยละการเกิดโรค ร้อยละความรุนแรงของโรค และประสิทธิภาพในการควบคุม ตามวิธีการของ Wang *et al.* (2009) ได้ดังนี้

$$\% \text{ การเกิดโรค } (\% \text{ disease incidence}) = \left[\frac{\text{จำนวนต้นที่เป็นโรคทั้งหมด}}{\text{จำนวนต้นที่ไม่เป็นโรคในชุดควบคุม}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ ความรุนแรงของโรค } (\% \text{ disease severity}) = \left[\frac{\sum (\text{ระดับความรุนแรงของโรค} \times \text{จำนวนต้นที่เป็นโรคในระดับนั้น})}{\text{ระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุด} \times \text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ ประสิทธิภาพในการควบคุม } (\% \text{ control efficacy}) = \left[\frac{\text{ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม} - \text{ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคในชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม}} \right] \times 100$$

6. การจัดจำแนกของไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์

6.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (จากผลการทดสอบในข้อ 5) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การเจริญ ลักษณะโคโลนี สี และรูปร่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ตรวจสอบด้วย 3% potassium hydroxide (3% KOH) เพื่อตรวจสอบแกรมของแบคทีเรียเบื้องต้น ตามวิธีของ Suslow *et al.* (1981) และการย้อมสีแกรม (Gram's stain) (Beveridge, 2001) เพื่อตรวจสอบแกรม และดูลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย

6.2 การจัดจำแนกโดยลักษณะทางพันธุกรรม (genetic material)

จัดจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ (จากผลการทดสอบในข้อ 5) โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม (genetic material) โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5'

TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย multiscreen filter plate (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) แล้วจึงนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่าง การตรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค

การสำรวจโรคผลเน่าของเมลอนและแคนตาลูปในแปลงปลูกของเกษตรกร สามารถเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค ได้ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน มีจำนวน 16 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเมลอน 11 ตัวอย่าง และแคนตาลูป 5 ตัวอย่าง และตำบลหางดง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ มีจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมลอนทั้งหมด อาการที่พบมีลักษณะเป็นแผลฉ่ำน้ำกระจายอยู่ทั่วผล แผลฉ่ำน้ำดังกล่าวมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นแผลยุบตัว ผลที่แสดงอาการรุนแรงแผลจะมีสีดำและเน่าทั้งผล (ภาพที่ 1)

1.2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง แบ่งเป็น เมลอน 17 ตัวอย่าง

และแคนตาลูป 5 ตัวอย่าง ด้วยชุดตรวจ Aac detection kit พบว่า ผลที่อยู่ระยะใกล้เก็บเกี่ยวเป็นโรคผลเน่าจำนวน 4 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเมลอนจำนวน 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1A-C) และแคนตาลูป จำนวน 1 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1D) โดยทุกตัวอย่างเก็บมาจากแปลงเมลอนในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ซึ่งจากผลการสำรวจ และตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า มีความคล้ายคลึงกับการรายงานของ ปิยรัตน์ และคณะ (2553) ซึ่งได้สำรวจโรคผลเน่าในพื้นที่ปลูกเมลอน อำเภออรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว พบการเกิดโรคผลเน่าระบาดในระยะผลแก่ของเมลอนที่ใกล้เก็บเกี่ยว โดยพบตัวอย่างที่เป็นโรคผลเน่าคิดเป็นร้อยละ 10 จากตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด อาการโรคผลเน่าที่พบมีแผลเป็นจุดฉ่ำน้ำสีเขียวคล้ำ และมีอาการลุกลามทั่วทั้งผล

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า

นำตัวอย่างผลที่ตรวจพบเชื้อสาเหตุในข้อ 1.2 มาแยกเชื้อบนอาหารดัดแปลง modified Tween medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MRFP4 (MRFP คือ แยกเชื้อจากเมลอนในระยะผลแก่จากอำเภอป่าซาง และตามด้วยตัวเลขที่แสดงถึงลำดับในการแยกเชื้อ), CRFP4 (CRFP คือ แยกเชื้อจากแคนตาลูปในระยะผลแก่จากอำเภอป่าซาง และตามด้วยตัวเลขที่แสดงถึงลำดับในการแยกเชื้อ), MRFP1 และ MRFP2 ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลท เก็บตัวอย่างมาจากตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน โดยเชื้อที่พบบนอาหารมีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม (round) จนถึง รูปไข่ (oval) สีเทา (grayish) ผิวหน้าเรียบ (flat) และรอบโคโลนีมีบริเวณที่เกิดผลึก (crystallized zone) รอบโคโลนี (ภาพที่ 2) ซึ่งตรงกับลักษณะของเชื้อ *A. citrulli* ที่มีการรายงานโดย



Figure 1. Symptoms of bacterial fruit blotch on melon and cantaloupe under field condition, various blotch lesions on melon fruits (A-C) and on cantaloupe fruit (D)

Popovic and Ivanovic (2015) นอกจากนี้เมื่อนำโคไลนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ดังกล่าวมาเพื่อยืนยัน โดยใช้ชุดตรวจ Aac detection kit พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli*

2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าทั้ง 4 ไอโซเลท บนต้นกล้าเมลอนอายุ 7 วัน พบว่า ใบเลี้ยงเมลอนมีจุดดำน้ำขนาดเล็ก จากนั้นแผลจะลุกลามขยายวงกว้างเกิดเป็นจุดดำน้ำขนาดใหญ่ และทำให้ต้นกล้าตาย ภายใน 12 วัน หลังการปลูกเชื้อ ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับงานวิจัยของ Burdman and Walcott (2012) ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำบนใบเลี้ยงของต้นกล้าเมลอน และทำให้ต้นกล้าตายภายใน 10 วัน หลังการปลูกเชื้อ ซึ่งจากการทดสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท MRFP2 ทำให้เกิดโรคได้มากที่สุดในระดับ 4 (เกิดการตายของพืชทั้งต้น) รองลงมาคือ MRFP4 เกิดโรคในระดับ 3 (ใบเลี้ยงหรือใบจริงตาย), CRFP4 เกิดโรคในระดับ 2 (มีอาการจุดดำน้ำขนาดใหญ่บนใบเลี้ยง) และ MRFP1 เกิดโรคในระดับ 1 (อาการเป็นจุดดำน้ำขอบแผลมีสีเหลืองบนใบเลี้ยง) ภายใน 8 วัน หลังการปลูก

เชื้อ (ภาพที่ 3) จากผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคดังกล่าวนี้ เห็นได้ว่าไอโซเลท MRFP2 ทำให้เกิดโรคในระดับที่รุนแรงมากที่สุด จึงนำไอโซเลท MRFP2 ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การแยกไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากเมลอน

การแยกไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากของต้นเมลอน สามารถแยกได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลท โดย 141 ไอโซเลท แยกได้จากตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ได้แก่ ไอโซเลท S1-S141 และ 8 ไอโซเลทจากศูนย์วิจัย สาคิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้แก่ ไอโซเลท S142-S149

4. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัติในห้วงปฏิบัติการ

การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียปฏิบัติด้วยวิธี paper disc diffusion พบไรโซแบคทีเรียปฏิบัติจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S93, S97, S125 และ S126 ซึ่งแยกมาจากดินในตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ทั้ง 4 ไอโซเลท (ภาพที่ 4) โดย ไอโซเลท S125 แสดงผลการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งมี inhibition zone เท่ากับ 1.74 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท S93, S97

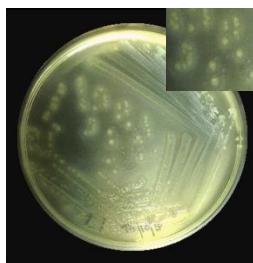


Figure 2. Colonies of pathogenic bacteria, *Acidovorax citrulli*, on modified Tween medium at 25-28 °C for 12 days

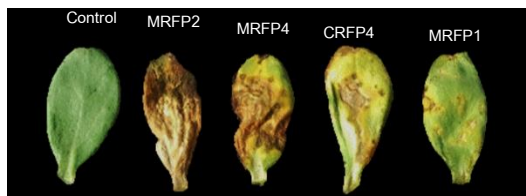


Figure 3. Pathogenicity test of *Acidovorax citrulli* 4 isolates on melon seedlings. Symptom on leaves 8 days after inoculation

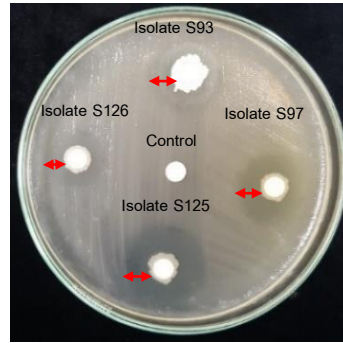


Figure 4. The efficacy of 4 isolates of rhizobacteria against *Acidovorax citrulli* on KB medium at 25-28 C° for 3 days ($\longleftrightarrow$: inhibition zone)

และ S126 สามารถยับยั้งได้ 1.44, 1.36 และ 0.86 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่ง inhibition zone ที่พบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่พบบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น (ตารางที่ 1) การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้จากดินด้วยวิธี paper disc diffusion ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช Trivedi *et al.* (2008) ได้ใช้วิธี paper disc diffusion เช่นเดียวกันในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugate* ที่แยกจากดิน และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria alternata* และ *Fusarium oxysporum* โดยทำให้เกิดลักษณะ inhibition zone บนอาหารทดสอบ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียปฏิบั้ในโรงเรือน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียปฏิบั้ไอโซเลท MRFP2 ในโรงเรือนทดสอบ โดยการพ่นลงบนต้นกล้าเมลอนอายุ 7 วัน พบว่า ในกรรมวิธีที่ 1 พบอาการจุดน้ำสีน้ำตาล ขอบแผลมีสีเหลือง และเนื้อเยื่อตายบนใบเลี้ยงของต้นกล้าเมลอนในวันที่ 8 (ภาพที่ 5A) พบอาการดังกล่าวในทุกต้นที่ทดสอบ คิดเป็นร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 100 แต่มีความรุนแรงของโรคเป็นร้อยละ 36.66 และคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับ 63.33 (ตารางที่ 2) กรรมวิธีที่ 2 พบอาการจุดน้ำสีขอบแผลมีสีเหลืองบนใบเลี้ยงในวันที่ 8 (ภาพที่ 5B) โดยคิดเป็นร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 86.67 แต่มีความรุนแรงของโรคร้อยละ 30.00 และคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับ 70.00 (ตารางที่ 2) กรรมวิธีที่ 3 พบอาการ

บนใบเลี้ยงและใบจริงมีลักษณะฉ่ำน้ำ ต่อมาเกิดเนื้อเยื่อตาย ลำต้นมีสีน้ำตาล และหักพับลง และต้นกล้าตายในที่สุด ในวันที่ 8 (ภาพที่ 5C) โดยคิดเป็นร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 100 ความรุนแรงของโรคเท่ากับร้อยละ 100 ส่วนกรรมวิธีที่ 4 และ 5 พบว่าต้นเมลอนไม่แสดงความผิดปกติ (ภาพที่ 5D และ 5E) เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 6 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น) ไม่พบความผิดปกติบนต้นกล้าเมลอน (ภาพที่ 5F) จากการทดลองพบว่า การพ่นไรโซแบคทีเรียปฏิบั้ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นเวลา 2 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อปฏิบั้หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งการใช้แบคทีเรียปฏิบั้ควบคุมโรคก่อนมีเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย กุศล และพิศาล (2556) ได้ทดลองพ่นชีวภัณฑ์ *B. subtilis* B076 ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าในแคนตาลูป พบว่า ลดการเกิดโรคได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการพ่นหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

6. การจัดจำแนกของไรโซแบคทีเรียปฏิบั้

6.1 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้น

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของไรโซแบคทีเรียปฏิบั้ไอโซเลท S125 และ S93 การเจริญของไอโซเลท S125 บนอาหาร NA พบว่า โคโลนีมีรูปร่างกลม (circular) สีครีม (cream) ขอบเรียบ (entire) ผิวหน้าเรียบ (smooth) และมันเงา (shiny) มีการยกตัวโค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร (convex) (ภาพที่ 6A) ยืนยันผลอีกครั้งด้วยการนำมาตรวจสอบแกรมเบื้องต้นด้วย 3% KOH พบว่ามีลักษณะเป็นสายเหนียวติดกับห่วงถ่ายเชื้อ แสดงว่า

Table 1. *In vitro* antagonistic activity of four rhizobacteria against *Acidovorax citrulli*

Rhizobacteria isolates	Inhibition zone (cm)
S93	1.44 ^{b1}
S97	1.36 ^b
S125	1.74 ^a
S126	0.86 ^c
Control	0.00 ^d
CV (%)	14.46

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

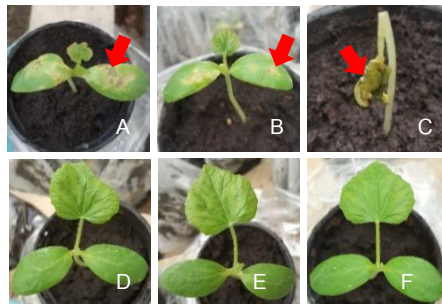


Figure 5. Effect of 2 antagonistic rhizobacteria to control *Acidovorax citrulli* on melon seedling by foliar spray method. T1: spray with isolate S93 for two days then followed by *A. citrulli* (A), T2: spray with isolate S125 for two days then followed by *A. citrulli* (B), T3: spray with *A. citrulli* (C), T4: spray with isolate S93 (D), T5: spray with isolate S125 (E) and T6: spray with distilled water (F) under greenhouse at 28-30 °C, 8 days after *A. citrulli* inoculation

Table 2. Efficacy of 2 antagonistic rhizobacteria to control *Acidovorax citrulli* under greenhouse condition

Treatments	Disease incidence (%)	Disease severity (%)	Control efficacy (%)
T1: spray isolate S93 two days before <i>A. citrulli</i> inoculation	100.00 ^{a1}	36.66 ^b	63.33 ^a
T2: spray isolate S125 two days before <i>A. citrulli</i> inoculation	86.67 ^b	30.00 ^b	70.00 ^a
T3: spray with <i>A. citrulli</i> only	100.00 ^a	100.00 ^a	0.00 ^b
T4: spray with isolate S93 only	0.00 ^c	0.00 ^c	-
T5: spray with isolate S125 only	0.00 ^c	0.00 ^c	-
T6: spray with distilled water (control)	0.00 ^c	0.00 ^c	-
CV (%)	30.07	36.92	32.63

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

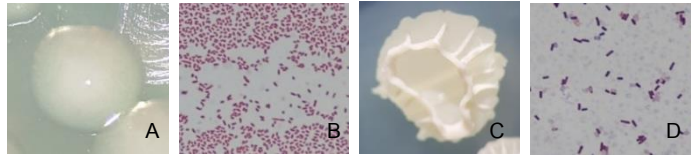


Figure 6. Morphological characteristics of 2 rhizobacteria. Colony of isolate S125 on NA at 5 days (A), gram negative of isolate S125 (B), colony of isolate S93 on NA at 5 days (C) and gram positive of isolate S93 (D)

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเมื่อนำมาย้อมแกรมเพื่อ ยืนยันผล พบว่าเซลล์ติดสีแดง (แบคทีเรียแกรมลบ) และมี รูปร่างเป็นแท่ง (rod) (ภาพที่ 6B) และลักษณะของ ไอโซเลท S93 บนอาหาร NA พบว่า โคโลนีมีรูปร่างไม่ แน่นนอน (irregular) สีครีม (cream) ทึบแสง (opaque) ขอบหยัก (undulate) ผิวหน้าย่น (wrinkled) มีการยกตัว สูงขึ้นจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (raised) (ภาพที่ 6C) เมื่อนำมาทดสอบแกรมเบื้องต้นด้วย 3% KOH พบว่าไม่มี ลักษณะเป็นสายเหนียวติดกับห่วงถ่ายเชื้อ แสดงว่าเป็น แบคทีเรียแกรมบวก และยืนยันผลอีกครั้งด้วยการนำมา ย้อมแกรม พบว่าเซลล์ติดสีม่วง (แบคทีเรียแกรมบวก) และมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) (ภาพที่ 6D) ซึ่งวิธีจัดจำแนกไรโซแบคทีเรียปฏิบัติ โดยตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา เบื้องต้นดังกล่าวนี้ Pandey *et al.* (2006) ได้นำมาใช้จัด จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ *Pseudomonas putida* (B0) ที่แยกมาจากดินเช่นเดียวกัน

6.2 การจัดจำแนกโดยลักษณะทาง พันธุกรรม (genetic material)

การตรวจสอบดีเอ็นเอของไรโซแบคทีเรีย ปฏิบัติไอโซเลท S125 และ S93 ในบริเวณ 16S rDNA gene เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ความเหมือน (sequence alignment) ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไอโซเลท S125 มีขนาด 910 bp ซึ่งมีความเหมือนกับเชื้อ แบคทีเรีย *Pseudomonas montellii* มากถึงร้อยละ 100 ส่วนไอโซเลท S93 มีขนาด 707 bp และมีความเหมือนกับ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มากถึงร้อยละ 99 มีรายงานการศึกษาที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้ เช่น Kejela *et al.* (2017) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *P. montellii* ที่แยกได้ จากดินบริเวณรอบรากของต้นกาแฟ เพื่อใช้ในการควบคุม

การเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ที่เข้าทำลายกาแฟได้ และ Rakh *et al.* (2011) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *P. montellii* ที่ แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของพืชวงศ์ถั่ว และพบว่ามี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุของโรคกล้าต้นเน่าของถั่วลิสง นอกจากนี้ กุศล และพิศาล (2556) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการเป็น ปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B076 ที่แยกจาก รากของต้นถั่วเขียว และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าของแคนตาลูปได้ และ Medeiros *et al.* (2009) ทดสอบการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* พบว่า สามารถลดการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดแตงโม ทำให้ระยะ พักตัวของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้อยลง จึงทำให้อาการ ของโรคเกิดได้ช้าลง

สรุป

การสำรวจโรคผลเน่าในแปลงเมลอนและแคนตา ลูปสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง พบว่ามี เพียง ตัวอย่างเมลอน 4 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli* สาเหตุโรค เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิด โรคบนต้นกล้าเมลอน พบว่าเชื้อสาเหตุทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดโรคได้ โดยไอโซเลท MRFP2 มีความสามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงมากที่สุด การแยก เชื้อไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากของต้นเมลอนที่ แข็งแรงสมบูรณ์ไม่เป็นโรค สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลท และพบว่า มีจำนวน 2 ไอโซเลท ที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้สูงที่สุดได้แก่ ไอโซเลท S125 และไอโซเลท S93 เมื่อนำทั้งสองไอโซเลท มา ทดสอบการควบคุมโรคภายในโรงเรือนทดลอง พบว่า

ไอโซเลท S125 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ร้อยละ 70.00 และไอโซเลท S93 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ร้อยละ 63.33 เมื่อจัดจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene พบว่า ไอโซเลท S125 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *P. monteilii* และไอโซเลท S93 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ในการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนในการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กุศล ถมมา และ พิศาล ศิริธร. 2556. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B076 เพื่อการเคลือบเมล็ดและพ่นทางใบ เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. แก่นเกษตร 41(ฉบับพิเศษ 1): 339-345.
- เกวลิน คุณาศักดากุล และ ชัยพร ชัดสงคราม. 2555. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร 28(3): 285-294.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล ญัฐริมา ไม้จิต-เจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2553. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์พืชสกุลแตงบางชนิดเพื่อการส่งออก. หน้า 1377-1389. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่มที่ 1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- อภิชาติ ศรีสะอาด และ สุพิงศ์ ถิ่นเขาน้อย. 2558. เมล่อน & แคนตาลูป เงินล้าน. นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ. 136 หน้า.
- อรอุมา เรืองวงษ์ และ เบญจวรรณ ใจจันทร์. 2560. การใช้แอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ. วารสารเกษตร 33(1): 49-59.
- Burdman, S. and R. Walcott. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Molecular Plant Pathology 13(8): 805-815.
- Beveridge, T. J. 2001. Use of the gram stain in microbiology. Biotechnic and Histochemistry 76(3): 111-118.
- Crall, J.M. and N.C. Schenck. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. Plant Disease Reporter 53: 74-75.
- Drew, W.L., A.L. Barry, R. O'Toole and J.C. Sherris. 1972. Reliability of the Kirby-Bauer disc diffusion method for detecting methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology 24(2): 240-247.
- Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Disease 77(11): 1090-1092.
- Kejela, T., V.R. Thakkar and R.R. Patel. 2017. A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of coffee. Rhizosphere 4: 9-15.
- Kloepper, J.W., R.M. Zablotowick, E.M. Tipping and R. Lifshitz. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. pp. 315-326. In: D.L. Keister and P.B. Cregan (eds.). The Rhizosphere and Plant Growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Medeiros, F.H.V., I.S.F. Moraes, E.B.S. Neto, E.B. Silveira and R. L. R. Maria. 2009. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. *Phytoparasitica* 37(5): 453-460.
- O'Brien, R.G. and H.L. Martin. 1999. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39(4): 479-485.
- Pandey, A., P. Trivedi, B. Kumar and L.M.S. Palni. 2006. Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology* 53(2): 102-107.
- Pinyapong, P.S. 1994. Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai) in Northeastern Thailand. M. S. Thesis. University of the Philippines, Los Baños. 99 p.
- Popovic, T. and Ž. Ivanovic. 2015. Occurrence of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon in Serbia. *Plant Disease* 99(6): 886.
- Rakh, R.R., L.S. Raut, S.M. Dalvi and A.V. Manwar. 2011. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. *Recent Research in Science and Technology* 3(3): 26-34.
- Schaad, N.W., G. Sowell Jr., R.W. Goth, R.R. Colwell and R. E. Webb. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28(1): 117-125.
- Schaad, N.W., E. Postnikova, A. Sechler, L.E. Clafin, A.K. Vidaver, J.B. Jones, I. Agarkova, A. Ignatov, E. Dickstein and B.A. Ramundo. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad *et al.*, 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 31(6-8): 434-446.
- Suslow, T.V., M.N. Schroth and M. Isaka. 1981. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72(7): 917-918.
- Trivedi, P., A. Pandey and L.M.S. Palni. 2008. *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiological Research* 163(3): 329-336.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586.
- Wang, X., G. Li, D. Jiang and H.C. Huang. 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biological Control* 50(2): 164-171.
- Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters and J. De Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1): 107-119.