

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรค  
ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
เมษายน 2562

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรค  
ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง



สุภาพร ไฟเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโรคพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เมษายน 2562

การคัดเลือกแบบที่เรียบัญชีเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรค  
ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง


สุภาพร ฟ้าเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาโรคพืช


คณะกรรมการสอบ


คณะกรรมการที่ปรึกษา

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ ชาลีพรหม)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยวาลักษณ์ จันทร์บาง)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยวาลักษณ์ จันทร์บาง)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

18 เมษายน 2562

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางในการทำงานต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวรรณ ชาลีพรหม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขวลักษณ์ จันทรบาง กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาภูมิวิทยา และ โรคพืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืชทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเก็บอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ด้านธุรการภาควิชาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืองานด้านเอกสารต่าง ๆ รวมทั้งเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์ ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยสนับสนุนส่งเสริมทุกอย่าง สนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์ และคอยให้กำลังใจเป็นอย่างดีมาตลอด

สุดท้ายนี้หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ และประโยชน์ที่พึงมีขอบแต่คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณแก่ข้าพเจ้าทุกท่าน

สุภาพร ฟ้าเลิศ

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง
ผู้เขียน	นางสาวสุภาพร ฟ้าเลิศ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

#### บทคัดย่อ

เชื้อสาเหตุที่แยกได้จากตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่ง และต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการ ประกอบด้วยเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 และ *Fusarium solani* ไอโซเลท PP03 ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการโรคน้ำแข็งจากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอพบพระ จังหวัดตาก ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ internal transcribed spacer (ITS) ส่วนเชื้อรา *Sclerotium* sp. สาเหตุโรคหัวเน่าจากตัวอย่างหัวพันธุ์อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยการทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ SCR-F/SCR-R พบขนาดของแถบ DNA ที่ 540 bp จึงจัดเป็น *Sclerotium rolfsii* สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท MJ21 แยกได้จากตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการ โรคขี้กลากจากอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces tendea* นอกจากนี้พบเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium* sp. จากตัวอย่างต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการแห้งดำจากอำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สามารถแยกจากตัวอย่างหัวมันฝรั่งได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CD01 และ MK01 จากอำเภอเชียงดาว ไอโซเลท CK01 จากอำเภอไชยปราการ และไอโซเลท MA01 จากอำเภอแม่เมาะ จังหวัดเชียงใหม่ โดยจัดอยู่ในกลุ่มไบโอวารี่ 2T และเมื่อจัดจำแนกโดยใช้ phylogroup ด้วย phylogroup-specific multiplex PCR และ sequevar โดยอาศัยลำดับของยีนในตำแหน่ง endoglucanase (*egl*) sequence พบว่าจัดอยู่ใน phylogroup II และ sequevar 1

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบต้นกล้วย และดินรอบต้นไผ่  
อำเภอสุคีริน จังหวัดนราธิวาส รวมถึงดินบริเวณรากมันฝรั่ง ดินปลูกลูกมันฝรั่ง และดินรอบรากมันฝรั่ง  
อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลท และได้  
แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้สูงสุด 4 ไอโซเลท ได้แก่  
SB02, SD03, SD08 และ SPP07 โดย SB02 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการเจริญของ  
เชื้อราสาเหตุ *F. graminearum* ไอโซเลท CP01 และเชื้อราสาเหตุ *S. rolfsii* ไอโซเลท SC01 โดยมี  
เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงสุดที่ 57.02 และ 47.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรีย  
สาเหตุโรคน้ำและ *P. carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03 โดยมีรัศมีของวงกว้างบริเวณ  
การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ 7.50 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลท SPP07 มีประสิทธิภาพยับยั้งการ  
เจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 และ *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01 ได้  
สูงสุด โดยมีรัศมีของวงกว้างบริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ 13.63 และ 8.25 มิลลิเมตร  
ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มของ  
*Bacillus velezensis* และพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถย่อยธาตุฟอสเฟต สร้างสาร  
IAA และ siderophore ได้ อีกทั้งยังมีตำแหน่งของยีนที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ iturin A และ  
bacillomycin D ได้ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคของมันฝรั่งใน  
สภาพโรงเรือนพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ไอโซเลท SD03 มีประสิทธิภาพในการควบคุม  
และลดความรุนแรงในการเกิดโรค น้ำแห้ง หัวเน่า ซึ่กลาก แข็งดำหรือเน่าและ และเหี่ยวเฉาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

<b>Thesis Title</b>	Selection of Antagonistic Bacteria to Control Seed – borne Pathogens in Seed Potatoes	
<b>Author</b>	Miss Supaporn Falert	
<b>Degree</b>	Master of Science (Plant Pathology)	
<b>Advisory Committee</b>	Assistant Professor Dr. Angsana Akarapisan	Advisor
	Assistant Professor Dr. Yaowaluk Chanbang	Co–advisor

### Abstract

The pathogens were isolated from potato seed and potato plant diseases in potato crop. *Fusarium graminearum* isolate CP01 and *Fusarium solani* isolate PP03 were isolated from Fusarium dry rot symptoms on seed potatoes in Chai Prakan District, Chiang Mai Province and Phop Phra District, Tak Province, respectively. *Fusarium* isolates were identified, based on morphology and the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (rDNA). The tuber rot pathogen, *Sclerotium* sp. was isolated from infected seed potatoes from San Sai District, Chiang Mai Province. Identification of *Sclerotium* sp. isolates was by PCR methods using species-specific primers. The primer pair SCR-F/SCR-R amplified a 540-bp product of *S. rolfsii* DNA. *Streptomyces* sp. isolate MJ21 was isolated from necrotic lesions of diseased potato tubers in Jom Thong District, Chiang Mai Province. Then *Streptomyces* sp. isolate MJ21 was identified as *S. tendea* based on morphology and molecular characteristics with PCR analysis using sequencing of 16S rRNA gene. *Pectobacterium* sp. isolate SR03 was obtained from plants with typical blackleg symptoms in Chiang Kham District, Phayao Province. Then the bacterium was identified by PCR analysis using the partial 16S rRNA gene sequences with 16S rRNA universal primers. The results identified the bacterium as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense*. Four isolates of *Ralstonia solanacearum* including CD01 and MK01 (Chiang Dao), CK01 (Chai Prakan) and MA01 (Mae Ai) were identified as 2T biovars of the bacterium. Phylotype-specific multiplex PCR showed that the four isolates belonged to phylotype II. Then, phylogenetic analysis of endoglucanase (*egl*) sequence found that all four isolates were clustered into sequence 1.

Also in this study, a total of 83 bacterial isolates were isolated from the rhizosphere of banana and bamboo plants in the Sukhirin District, Narathiwat Province and the rhizosphere and soil of potato crops in Chai Prakan District, Chiang Mai Province. They were tested for their antagonistic activity against the collected pathogens causing potato diseases using the paper disc test. Four isolates including SB02, SD03, SD08 and SPP07 were able to form inhibition zones. The results showed that the antagonistic bacterium isolate SB02, which was isolated from the rhizosphere of a banana plant in Sukhirin District, Narathiwat Province, showed the ability to suppress the growth of *F. graminearum* CP01 and *S. rolfii* SC01 as indicated by inhibition zones of 57.02 and 47.81 %, respectively, and *P. carotovorum* subsp. *basilense* SR03 by an inhibition zone of 7.50 mm. The antagonistic bacterial isolate SPP07 which was isolated from the soil of potato crops in Chai Prakan District, Chiang Mai Province, showed the ability to suppress the growth of *S. tendea* MJ21 and *R. solanacearum* CK01 by inhibition zones of 13.63 and 8.25 mm., respectively. Moreover, four isolates of antagonistic bacteria were identified as *Bacillus velezensis* according to their morphology, biochemical characteristics and 16S rRNA gene. These four isolates were indole-3-acetic acid (IAA) producer strains. PCR products from these isolates corresponded to the iturin A and bacillomycin D biosynthesis gene clusters. Greenhouse experiments, showed that dry rot, tuber rot, black leg disease, scab and wilt disease incidences were reduced when seed potatoes were treated with a cell suspension of *B. velezensis* isolate SD03.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการ	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	86
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	102
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบ	103
ภาคผนวก ข การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	106
ภาคผนวก ค การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	109
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์สถิติ	113
ประวัติผู้เขียน	119

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตาราง 1	ชนิดของ specific primers ที่ใช้ในการศึกษาคำแหน่งของยีนที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ	24
ตาราง 2	จำนวนเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งจากแหล่งต่างๆ	30
ตาราง 3	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และความรุนแรงของโรคในพืชอาศัยอื่น	38
ตาราง 4	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03	41
ตาราง 5	การจำแนกใบโอวาร์ของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สาเหตุโรคเหี่ยวหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง และพืชอาศัยอื่น	44
ตาราง 6	<i>Fusarium</i> sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	46
ตาราง 7	<i>Streptomyces</i> sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ <i>Fusarium</i> sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	50
ตาราง 8	<i>Pectobacterium</i> sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	52
ตาราง 9	<i>Ralstonia solanacearum</i> ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	56
ตาราง 10	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินมันฝรั่ง รากมันฝรั่ง ดินไผ่ ดินกล้วย และดินปลูกมันฝรั่ง	61
ตาราง 11	ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium graminearum</i> ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง	62
ตาราง 12	ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง	63

## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า	
ตาราง 13	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptomyces tendea</i> ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคร็อกกลางของมันฝรั่ง	64
ตาราง 14	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>basilense</i> สาเหตุโรครากเน่าของมันฝรั่ง	66
ตาราง 15	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i> สาเหตุโรคร่อนหรือโรคน้ำตาลของมันฝรั่ง	67
ตาราง 16	ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิชีวนะ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	70
ตาราง 17	<i>Bacillus</i> species ที่ใช้ในการศึกษานี้ และไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	74
ตาราง 18	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ	78
ตาราง 19	ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักราก และจำนวนรากของมันฝรั่งหลังจากทดสอบกับเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ที่เวลา 90 วัน	80
ตาราง 20	ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเจริญของหัวพันธุ์มันฝรั่งหลังจากปลูกเชื้อทดสอบ ที่เวลา 25 วัน	81
ตาราง 21	ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครอกของมันฝรั่งที่เวลา 45 วัน หลังจากปลูกเชื้อทดสอบ	82

## สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพ 1	การวัดผลการการคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี dual culture	19
ภาพ 2	การวัดผลการการคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยวิธี paper disc	20
ภาพ 3	ลักษณะอาการของโรค dry rot บนหัวมันฝรั่งสายพันธุ์แอตแลนติก	30
ภาพ 4	ลักษณะอาการของโรคหัวเน่า (soft rot) ของหัวมันฝรั่ง จาก อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	30
ภาพ 5	หัวมันฝรั่งที่มีลักษณะอาการโรคขี้กลาก (scab) จาก อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่	31
ภาพ 6	ลักษณะอาการโรคเหี่ยว หรือโรคเน่าสีน้ำตาลในหัวมันฝรั่ง จากอำเภอในจังหวัดเชียงใหม่	31
ภาพ 7	ลักษณะอาการของต้นมันฝรั่งที่ถูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอาการเน่าเข้าทำลายบริเวณลำต้น จาก อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา	32
ภาพ 8	ผลการปลูกเชื้อ <i>Fusarium</i> sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03 บนหัวมันฝรั่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน	33
ภาพ 9	ผลการทดสอบระดับความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนหัวมันฝรั่ง	34
ภาพ 10	ผลการปลูกเชื้อรา <i>Sclerotium</i> sp. บนหัวมันฝรั่ง พันธุ์สปันตา ณ อุณหภูมิห้อง ที่ 30 วัน	35
ภาพ 11	ผลการปลูกเชื้อ ไอโซเลท MJ21 ที่เวลา 50 วัน เทียบกับชุดควบคุม	36
ภาพ 12	ผลการปลูกเชื้อกลุ่มอาการเน่าและ (soft rot) ทั้ง 5 ไอโซเลทเทียบกับชุดควบคุม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	37
ภาพ 13	การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองเฉียบพลัน (hypersensitivity response: HR) ของต้นยาสูบใบใหญ่ ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) อายุประมาณ 1 เดือน	37

## สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
ภาพ 14	การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> ภายใต้สภาพโรงเรือน หลังปลูกเชื้อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน	39
ภาพ 15	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. isolate CP01 และ <i>Fusarium</i> sp. isolate PP03 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน	42
ภาพ 16	ลักษณะของเชื้อรา <i>Sclerotium</i> sp. สาเหตุโรคหัวเน่า ของมันฝรั่ง	43
ภาพ 17	การจำแนกไปโอวาร์ของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สาเหตุโรคเหี่ยว หรือเน่าสีน้ำตาลของมัน ของมันฝรั่ง และพืชอาศัยอื่น	45
ภาพ 18	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03 ด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ internal transcribed spacer gene	48
ภาพ 19	การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ specific primers SCR-R /SCR-F จากเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> แสดงแถบของ DNA ที่ปริมาณขนาด 540 bp ใน 1.25% agarose gel ด้วยวิธี gel electrophoresis	49
ภาพ 20	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขี้กลากไอโซเลท MJ21	51
ภาพ 21	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขี้กลากไอโซเลท SR01 และ SR03	53
ภาพ 22	การจัดกลุ่ม phylotype โดยเทคนิค PCR	54
ภาพ 23	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ยีน <i>egl</i> ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i>	59
ภาพ 24	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ยีน <i>hrpB</i> ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i>	60
ภาพ 25	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ต่อเชื้อรา <i>Fusarium graminearum</i> ไอโซเลท CP01 บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	62

## สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
ภาพ 26	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ ต่อเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	63
ภาพ 27	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptomyces tendea</i> ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคขี้กลากของม้นฝรั่ง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	65
ภาพ 28	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ 4 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Pectoaeteirum carotovorum</i> subsp. <i>basilense</i> สาเหตุโรคแฉ่งคำหรือเน่าและของม้นฝรั่ง	66
ภาพ 29	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanasearum</i> สาเหตุโรคเหี่ยวหรือหัวเน่าสีน้ำตาล	68
ภาพ 30	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท	71
ภาพ 31	การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์บนอาหารจำเพาะ	73
ภาพ 32	การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07	75
ภาพ 33	คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค	76
ภาพ 34	ค่าความเข้มข้น indole-3-acetic; IAA ที่ผลิตได้ของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ <i>Bacillus velezensis</i> ทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA	77
ภาพ 35	ผลการตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ <i>Bacillus velezensis</i> ทั้ง 4 ไอโซเลท	79
ภาพ 36	ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (%) ในสภาพโรงเรือนของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์	83
ภาพ 37	ลักษณะอาการของต้นม้นฝรั่งเมื่อทำการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือนเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 4 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ	85

# บทที่ 1

## บทนำ

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) อยู่ใน Family Solanaceae เป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นพืชอุตสาหกรรมที่ปลูกในเขตอบอุ่น-หนาว โดยจัดมีความสำคัญอยู่ในอันดับที่สี่ของโลก รองจากข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด และมันฝรั่งนั้นมีคุณค่าทางโภชนาการ โดยมีแป้ง วิตามินซี วิตามินบี 6 และกรดอะมิโนที่จำเป็น ประเทศไทยถือเป็นประเทศผู้ผลิตมันฝรั่งทอดกรอบอันดับหนึ่งในภูมิภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี พ.ศ. 2562 เกษตรกรไทยสามารถผลิตได้ประมาณ 114,123 ตัน ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนกว่า 10,000 ล้านบาท โดยมีเงินหมุนเวียนในระบบเกษตรกรไทยมากกว่า 1,270 ล้านบาทต่อปี เนื้อที่เพาะปลูกมันฝรั่งในปี 2562 คาดว่ามีเนื้อที่ 38,099 ไร่ แยกเป็นมันฝรั่งพันธุ์เพื่อส่งโรงงาน 35,996 ไร่ พันธุ์เพื่อการบริโภค 2,103 ไร่ ซึ่งได้ผลผลิต 114,123 ตัน แยกเป็นพันธุ์เพื่อส่งโรงงาน 108,350 ตัน พันธุ์เพื่อการบริโภค 5,773 ตัน มันฝรั่งมีการเพาะปลูกในพื้นที่ภาคเหนือร้อยละ 94.91 ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง ลำพูน ตาก เพชรบูรณ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือร้อยละ 5.09 ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมด ได้แก่ จังหวัดสกลนคร เลย นครพนม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) ในการเพาะปลูกมันฝรั่งประสบปัญหาในด้านการผลิตอย่างมาก โดยเฉพาะโรคที่เกิดจาก เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย ทำให้เกิดการสูญเสียแก่ผลผลิต ทั้งในสภาพแปลงปลูก และสภาพการเก็บรักษา โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมันฝรั่งที่สำคัญ เช่น *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวหรือเน่าสีน้ำตาล *Pectobacterium carotovora* สาเหตุโรคเน่าและและสาเหตุโรคเข็งดำ ส่วน *Streptomyces* sp. สาเหตุโรคจี้กลาก เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคมันฝรั่งที่สำคัญ ได้แก่ *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ *Alternaria solani* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคสะเก็ดดำ *Fusarium* species สาเหตุโรคเหี่ยวหรือโรคเน่าแห้ง (Abbas *et al.*, 2013) ดังนั้นโรคพืชจึงเป็นหนึ่งในข้อจำกัดหลักที่มีผลต่อการผลิตและผลผลิตของมันฝรั่งทั้งในด้านคุณภาพ และปริมาณ ทำให้การใช้สารเคมีเป็นวิธีการป้องกันกำจัดที่สำคัญในการลดการคุกคามของโรคพืช อย่างไรก็ตามเนื่องจากความกังวลด้านสิ่งแวดล้อมเกี่ยวกับสารเคมีที่จะตกค้าง ทศนคติที่ใส่ใจต่อสุขภาพของมนุษย์ที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ทำให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต เป็นปัญหาต่อการส่งออก และส่งผลเสียต่อสุขภาพเกษตรกร รวมทั้งผู้บริโภค ทำให้ปัจจุบันได้ค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ

สูงมาใช้ควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีดังนั้นตัวผู้วิจัยจึงเห็นว่า การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการควบคุมโรคของมันฝรั่ง สามารถลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชได้

#### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาและจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่งที่พบในหัวพันธุ์มันฝรั่ง
2. เพื่อคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในหัวพันธุ์มันฝรั่ง
3. เพื่อศึกษาและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## บทที่ 2

### ตรวจเอกสาร

#### ความสำคัญของมันฝรั่ง

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) เป็นพืชอาหารที่ปลูกได้ทั้งเขตอบอุ่นและหนาว แม้ว่ามันฝรั่งไม่ใช่พืชอาหารหลักของประเทศไทย แต่มีความสำคัญในด้านพืชอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท จัดเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนสูงแก่เกษตรกรผู้ปลูกมันฝรั่งเมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากมันฝรั่งเป็นพืชที่ให้ผลผลิตสูง มีช่วงอายุการปลูกสั้น และมีราคาจำหน่ายสูง ตลอดจนมีอุตสาหกรรมการแปรรูปมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบรองรับ ปัจจุบันการผลิตหัวมันฝรั่งในประเทศไทยต้องใช้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเป็นหลักซึ่งมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและมีการติดโรคมากับหัวพันธุ์ที่เก็บรักษา นอกจากนี้หัวพันธุ์ที่เกษตรกรเก็บไว้ใช้เองไม่มีคุณภาพ การผลิตหัวมันฝรั่งใช้ภายในประเทศยังมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร นอกจากนี้การผลิตก็ยังมีปัญหา เช่น เกษตรกรขาดความรู้ด้านการจัดการดิน-ปุ๋ย และการป้องกันจัดการศัตรูพืช (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 2558)

#### ลักษณะประจำพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์

ต้นมีลักษณะกิ่งตั้งตรง ทรงพุ่มแบบชามคว่ำ ลำต้นมีเหลี่ยมมุม ต้นอ่อนสีเขียว ต้นแก่สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลแก่ ความสูงของต้นที่มีอายุ 30 และ 60 วัน เท่ากับ 10.60 และ 72.60 เซนติเมตร ตามลำดับ ขนาดทรงพุ่ม 75.4-96.2 เซนติเมตร ความยาวระหว่างข้อที่ 4 และ 5 อยู่ที่ 4.3 และ 5.0 เซนติเมตร ตามลำดับ มุมของข้อที่ 4 และ 5 เท่ากับ 57 และ 72 องศา ตามลำดับ ส่วนใบ มีลักษณะเป็นรูปรี กว้าง 16.45 เซนติเมตร ยาว 26.1 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ปลายใบเชื่อมติดกัน ขอบใบเรียบ ผิวใบด้านบนเรียบ ใบอ่อนสีเขียวอ่อน ใบแก่สีเขียวเข้ม ลักษณะการทำมุมของใบพบกิ่งชะลูด 35-75 องศา ขนาดของก้านใบยาว 6.2 เซนติเมตร โดยการออกดอก จะออกเป็นช่อ ออกบริเวณยอด จำนวนดอกย่อยต่อช่อดอก อยู่ระหว่าง 2-5 ดอก ดอกสีขาว-สีครีม มีอายุการออกดอกอยู่ในช่วง 25-30 วัน รูปร่างของผลจะมีลักษณะกลม กว้าง 18.37 เซนติเมตร ยาว 18.21 เซนติเมตร ปลายผลโค้งมน ผิวเรียบเป็นมัน สีเขียวลักษณะของหัว มีลักษณะรูปร่างเป็นแบบกลมรีผิวสีเหลือง เนื้อสีขาวในฤดูแล้งมีอายุ

การเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 90-100 วัน และในฤดูฝนมีอายุการเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 80-90 (กรมวิชาการ เกษตร, 2558)

### โรคที่สำคัญของมันฝรั่ง

เนื่องจากปี 2561-2563 บริษัทผู้รับซื้อมันฝรั่งมีแผนความต้องการและส่งเสริมให้ขยายการผลิต มีการขอเพิ่มอัตราการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์โรงงานเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการขยายพื้นที่เพาะปลูกเพิ่มขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการด้านการผลิตของโรงงานแปรรูป เกษตรกรปลูกเพิ่มในพื้นที่ปล่องว่าง และปลูกแทนพืชผัก (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561) ส่งผลให้ปัญหาโรคของมันฝรั่งทวีความสำคัญมากขึ้น ยกตัวอย่าง เช่น โรคใบไหม้ (late blight) โรคเหี่ยวและหัวเน่า (wilt and tuber rot) โรคลำต้นเน่า (stem rot) โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) โรคเน่าดำและเน่าละ (black leg and soft rot) โรคขี้กลากหรือแผลสะเก็ด (common scab) โรคใบม้วนงอ (leaf roll) โรคใบด่าง (mosaics) และโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย (root-knot nematode)

โรคใบไหม้ (late blight) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* โดยทั่วไปจะทำให้เกิดแผลบนใบบริเวณส่วนล่างของต้นมันฝรั่งก่อน เริ่มแรกแผลมักปรากฏที่ปลายใบ และขอบใบ เป็นจุดดำ น้ำน้ำ แผลมีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม จากนั้นแผลจะลุกลามขยายบริเวณออกไปจนเป็นแผลใหญ่ภายใน 2 - 3 วัน บริเวณตรงกลางแผลมีลักษณะแห้งเป็นสีน้ำตาล ขอบแผลมีลักษณะเปียกชื้นเป็นสีดำ เนื้อเยื่อใบรอบ ๆ ขอบแผลมีสีเหลืองซีดและมีลักษณะน้ำน้ำ ในสภาพอากาศชื้นหรือมีหมอกลงจัด พริกดูด้านท้องใบ จะเห็นเส้นใยและสปอร์สีขาวหรือเทาขึ้นที่วงรอบนอกของแผลอย่างชัดเจน ถ้าสภาพอากาศแห้ง หมอกหายไป แผลจะเริ่มเป็นสีน้ำตาลและแห้งไป

โรคเหี่ยวและเน่าแห้ง (wilt and dry rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium spp.* เชื้อเข้าทำลายที่รากก่อนหรือส่วนของต้นที่ระดับพื้นดินหรือใต้ดิน เนื้อเยื่อที่เป็นโรคเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากนั้นใบที่อยู่ส่วนล่างๆ ของลำต้นจะเหลือง และใบที่อยู่สูงขึ้นไปจะเหลืองเป็นดวงๆ ต่อมาต้นจะเหี่ยวแห้ง โดยลักษณะอาการบนหัวจะมีสีเข้มและยุบตัวลงเล็กน้อย ทำให้เกิดเป็นโพรง สีที่เกิดขึ้นในโพรงไม่แน่นอนขึ้นกับชนิดของเชื้อ ส่วนขอบแผลบริเวณผิวนอกจะมีเส้นใยของเชื้อและจุดสีขาวเล็กๆ เกิดเป็นวงกลมเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ หัวที่เป็นโรคจะแห้งและแข็ง เมื่ออากาศชื้นและ หัวมันฝรั่งจะเน่า และเมื่อใช้มีดตัดขวางที่หัว ท่อน้ำท่ออาหารจะเป็นสีน้ำตาล

โรคหัวเน่า (tuber rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เชื้อราจะเข้าทำลายบริเวณลำต้นเหนือดิน โดยทำให้เกิดแผลเป็นสีน้ำตาลเทาเป็นจุดเล็กๆ แล้วขยายขนาดของแผลล้อมรอบบริเวณลำต้น ทำให้ลำต้นล้มพับ หลังจากเชื้อราเข้าทำลายบริเวณโคนต้นแล้ว เส้นใยจะเจริญแผ่กระจายขึ้นมายังลำต้นข้างบนและลึกลงไปในดิน ทำลายส่วนรากทั้งหมด มีผลทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยวและแห้งตาย

สำหรับหัวมันฝรั่งที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย อาจเน่าในแปลงปลูกก่อนเก็บเกี่ยว หรือระหว่างการเก็บรักษา หรือระหว่างขนส่ง และบริเวณพื้นดิน โดยรอบพบเม็ด sclerotium ลักษณะคล้ายเม็ดผักกาด เมื่อเริ่มเกิดจะเป็นสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำเมื่อแก่ เม็ด sclerotium จะมีจำนวนมากและมองเห็นได้ชัดเจน (Rubayet and Bhuiyan, 2016)

โรคเหี่ยวเหี่ยว (bacterial wilt) สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ลักษณะอาการต้นมันฝรั่งจะแสดงอาการเหี่ยวที่กิ่งหนึ่งกิ่งใดก่อน หรือซีกใดซีกหนึ่งของต้นก่อน ลักษณะใบเหลืองซีด ใบห่อเหี่ยว ยอดชบตงลงสู่ดิน จากนั้นอาการเหี่ยวจะปรากฏทั้งต้นภายใน 2 – 4 สัปดาห์ และพุ่มตายในที่สุด ลำต้นและหัวที่เป็นโรครบบท่อน้ำท่ออาหารจะเป็นสีน้ำตาลหรือดำ และมีของเหลวข้นสีขาวไหลออกมา

โรคเน่าดำและเน่าละ (black leg and soft rot) สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovora* โดยสามารถพบได้ทุกระยะของต้นมันฝรั่ง ในแปลงที่มีความชื้นสูงหรือดินที่ชื้นและระบายน้ำไม่ดี อาการเน่าดำจะปรากฏที่ต้น ส่วนหัวมันฝรั่งในดินมีอาการเน่าและส่วนมากจะเกิดที่หัว ส่วนที่ติดกับไหล ต้นอ่อนที่เป็นโรคจะแคระแกร็น เหลืองซีด ม้วนงอราบกับพื้นดินและตายในที่สุด และหัวที่เป็นโรคเน่าและระบาดอย่างรวดเร็วในโรงเก็บ โดยเฉพาะหัวที่มีแผลซ้ำจากการเก็บเกี่ยว หรือบาดแผลที่เกิดจากแมลงศัตรูกัดกินหัวมันฝรั่ง หัวมันฝรั่งที่เป็นโรค ผิวจะนิ่มสีดำ มีอาการเน่าและอยู่ข้างในหัว

โรคจี้กลากหรือแผลสะเก็ด (common scab) สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Streptomyces spp.* ทำให้เกิดลักษณะอาการเป็นรอยแผลตกลสะเก็ดเป็นรอยแตกที่ผิว และเป็นร่องลึกลงไปบนหัวมันฝรั่ง โดยมากแผลมีลักษณะกลมขนาด 10 มิลลิเมตร แผลลึกประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ถ้าผ่าหัวดูเนื้อเยื่อจะมีสีน้ำตาลและแข็งเป็นไต

โรคใบม้วนงอ (leaf roll) สาเหตุเกิดจากไวรัส *Potato leafroll virus Y (PLRV)* โดยลักษณะอาการในระยะแรกใบยอดจะมีอาการม้วนงอ ตั้งขึ้นตรง ใบสีเหลืองซีด แต่บางพันธุ์อาจมีสีม่วง ชมพู หรือแดง ต่อมาบริเวณฐานใบจะม้วนมากขึ้นต้นแคระแกร็น ใบที่ม้วนจะย่น ได้ใบเปลี่ยนเป็นสีม่วง ในพันธุ์ที่อ่อนแอจะเกิดแผลสีน้ำตาลที่ระบบท่อน้ำ ท่ออาหาร แต่ในบางพันธุ์ที่มีความต้านทาน แม้เชื้อจะเข้าทำลายก็ไม่แสดงอาการให้เห็นชัดเจน นอกจากนี้หัวพันธุ์ที่ใช้ปลูกจะไม่เน่าและยังคงติดอยู่กับต้น ในธรรมชาติเชื้อนี้ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) และทางหัวพันธุ์ที่ติดเชื้อ

โรคใบด่าง (mosaics) สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสที่สำคัญ 3 ชนิด คือ *Potato virus X*, *Potato virus Y* และ *Potato virus S* ซึ่งในแปลงปลูกของเกษตรกร โดยทั่วไปมักพบเชื้อไวรัสเหล่านี้ปนรวมกันมากกว่า 1 ชนิด บนต้นมันฝรั่งต้นเดียว ลักษณะอาการของโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Potato*

*virus X* จะแสดงอาการใบด่างไม่ชัดเจนบนต้นเป็นโรค ขนาดใบเล็กลง ต้นแคระแกร็น ในพันธุ์ที่อ่อนแอ อาจทำให้เกิดอาการยอดแห้งตาย โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Potato virus Y* จะมีอาการใบบิดเบี้ยว ปลายใบม้วนลง ใบด่างเห็นได้ชัด ต้นแคระแกร็น เส้นใ้ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ สาเหตุโรค พันธุ์มันฝรั่ง และสภาพแวดล้อม ส่วนโรคใบด่างที่เกิดจาก *Potato virus S* มักไม่ปรากฏอาการให้เห็นชัดเจนบนต้นมันฝรั่งที่ปลูกเพื่อการค้า แต่ในบางพันธุ์ที่เป็นโรคจะพบอาการด่าง ใบย่น และต้นแคระแกร็น บางสายพันธุ์ของเชื้อนี้อาจทำให้เกิดจุดแผลแห้งที่ใบมันฝรั่ง

โรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย (root-knot nematode) สาเหตุเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ลำต้นเหนือดินจะมีลักษณะต้นแคระแกร็น ใบเหลืองแก่เร็ว บางครั้งอาจพบอาการต้นเหี่ยวตอนกลางวัน และกลับฟื้นตัวตอนเย็น ส่วนบริเวณรากเกิดปมเมื่อมันฝรั่งเริ่มลงหัว ไส้เดือนฝอยจะเข้าทำลายหัวอีก ทำให้การติดหัวน้อยลง และผิวไม่เรียบเกิดปุ่มปมเหมือนหูด (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 2558 ; Peter, 1996)

#### การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช

เนื่องจากสารที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชทุกชนิดผลิตจากสารอนินทรีย์เคมี บางชนิดมีโลหะหนักเป็นส่วนประกอบ จึงเป็นพิษต่อสัตว์ทุกชนิดรวมทั้งมนุษย์ บางชนิดมีพิษมาก บางชนิดมีพิษน้อย แต่ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารเคมีที่ใช้ และวิธีใช้สารเคมีป้องกันกำจัด โรคพืช ซึ่งสารเคมีที่ใช้กำจัดโรคบางชนิด จึงทำให้พืชมีอาการผิดปกติ เช่น ทำให้ใบแห้ง ใบบิดม้วน หรือส่วนยอดแตกเป็นฝอย ซึ่งเป็นอาการเป็นพิษต่อพืช (phytotoxic) โดยตรง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมีที่ใช้ และชนิดของพืช โดยส่วนใหญ่สารเคมีทุกชนิดมีการสลายตัวในธรรมชาติ อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากับแสงแดด ความร้อน หรือกับสารต่าง ๆ ในดิน หรือย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และเปลี่ยนรูปแบบ หรือ โครงสร้างทางเคมีไปบางส่วนก็จะสะสมอยู่ในธรรมชาติ เช่น ในดิน ในน้ำ หรือในร่างกายนของสัตว์รวมถึงการเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในดิน หรือสิ่งมีชีวิตในดินเหล่านั้น โดยตรง หรืออาจกลายเป็นแหล่งสะสมสารพิษเพิ่มได้ถ้ามีปริมาณมากพอ ซึ่งโดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตอย่างหนึ่งที่เมื่อได้รับสารเคมีอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลานาน สิ่งมีชีวิตนั้นย่อมสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อสารเคมีนั้นได้ก็จะทำให้เกิดการต่อต้าน หรือการดื้อยาทำให้เกษตรกรต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากขึ้นทำให้พืชย่อมมีมากตามไปด้วย จึงทำให้เกิดการเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ เมื่อสารเคมีมากเกินไปอาจทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งรวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในธรรมชาติในดินได้ การทำลายสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นการทำให้สมดุลของสิ่งมีชีวิตในดินเสียไป จัดเป็นการทำลายระบบนิเวศน์อีกทางหนึ่ง โดยที่สารเคมีเกือบทุกชนิดเป็นสินค้าที่ไม่สามารถผลิตขึ้นเองได้ในประเทศจึงมี

การนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ต้องเสียดุลทางการค้าไปเป็นจำนวนเงินมหาศาลในแต่ละปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี (สืบศักดิ์, 2540)

### การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีหรือชีวภาพ (biocontrol)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อโรค อันก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตซึ่งรวมถึงพืชชั้นสูงและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) พันธุกรรมหรือผลผลิตจากพันธุกรรม (gene or gene product) ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโดยตรงจากมนุษย์ (เกษม, 2532) ปัจจุบันจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และจุลินทรีย์ สำหรับเชื้อรา ได้แก่ *Trichoderma* spp., *Penicilium* spp., และ *Chaetomium* spp. และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นต้น ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และบางชนิดมีการผลิตออกจำหน่ายเป็นสารชีวภัณฑ์

### กลไกการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ในธรรมชาติทั่วไปจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มักนิยมเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) หรือเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ 4 ลักษณะ ดังนี้ (สมคิด และคณะ, 2548)

1. การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคส่วนใหญ่และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่นำมาใช้ โดยเชื้อปฏิปักษ์จะมีความสามารถในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิตของเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งมีผลในการกำจัดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

2. การแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย (competition) การที่สิ่งมีชีวิต 2 ชนิดหรือมากกว่าเจริญอยู่ด้วยกันและมีความต้องการอาหารและที่อยู่อาศัย เมื่ออาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะเกิดการแก่งแย่งกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ธาตุอาหารและปัจจัยอื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัยของจุลินทรีย์สามารถแย่งอาหารจากเชื้อสาเหตุโรค ทำให้ปริมาณของสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคลดลง มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้ มากชนิด และใช้ธาตุอาหารและปัจจัยอื่น ๆ สำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแย่งอาหารจากเชื้อสาเหตุโรค ทำให้ปริมาณของสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มี

ความสามารถในการแก่งแย่งอาหารหรือพื้นที่อาศัยได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุของโรคและมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้มากขึ้น และใช้ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้พืชแข็งแรง มีผลผลิตที่สูงขึ้น (เกษม, 2532)

3. การเป็นปรสิต และตัวห้ำ (parasitism and predation) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ และใช้ส่วนประกอบภายในเซลล์มาเป็นอาหารโดยตรง บางกรณีอาจมีกลไก antibiosis ร่วมด้วย หรือการที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เส้นใยเหี่ยวแฟบลงหรือการที่เส้นใยเชื้อราสามารถพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วปล่อยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ส่งผลให้เส้นใยเหี่ยวแฟบและตายในที่สุด

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันกำลังให้ความสนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เคยเป็นเชื้อก่อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้

#### เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

เชื้อแบคทีเรียมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ อาจอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ทั้งเชื้อรา สาหร่าย โปรโตซัว พบทั่วไปในสภาพแวดล้อม ทั้งในน้ำ ดิน ผิวหน้าของพืช หรือแม้แต่ในร่างกายของคน และสัตว์ การที่เชื้อแบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิต ประเภทใดนั้น จะขึ้นอยู่กับ การปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เช่น อาจต้องปรับตัวให้สามารถอยู่รอดในสภาพที่ขาดแคลนอาหาร หรืออากาศ บางทีอาจมีการแก่งแย่ง ที่อยู่ โดยสิ่งมีชีวิตหนึ่งอาจสร้างสารพิษขึ้นเพื่อทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อให้อยู่รอด ปรัชญาการนี้เรียกว่า antagonism เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งจะสร้างขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมเกิดขาดแคลนอาหาร ดังนั้น การฆ่าสิ่งมีชีวิตจะส่งผลประโยชน์ให้แก่ผู้มาได้ คือลดคู่แข่งที่จะแย่งอาหาร ที่อยู่อาศัย และอาจเป็นแหล่งอาหารแก่ผู้ฆ่าอีกด้วย (เสาวนีย์, 2547)

#### เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสกุล *Bacillus*

*Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ชนิด aerobic หรือ facultative anaerobic ที่สร้าง endospore มีรูปร่างเป็นทรงแท่ง (rod-shaped) ดิคสี่แบบแกรมบวก อยู่ในตระกูล Bacillaceae ซึ่งมีอยู่หลายชนิด และหลากหลายสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับการใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้หลายชนิด โดยมีกลไกการทำงานคือ การเจริญแข่งขันแย่งชิงพื้นที่ และอาหาร (competition) และการสร้างสารต่าง ๆ ออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อหยุดการเจริญ หรือย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราโรคพืชได้แก่ สารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ ตลอดจนผลิตสารคีเลต เช่น siderophore ที่มีความสามารถในการ

จับธาตุเหล็กในรูปของ  $Fe^{3+}$  และธาตุอาหารอื่น ๆ ทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้รับแร่ธาตุต่าง ๆ ไปใช้เป็นแหล่งอาหารในกระบวนการเจริญไม่เพียงพอ (สุวิณา, 2538)

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ถึง 65-70 ชนิด (Lee *et al.*, 1985) โดยสารที่ผลิตขึ้น และสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ได้แก่ iturin A, surfactin (Asaka and Shoda, 1996) bacilysin, fengymycin A และ B (Loeffler *et al.*, 1986) bacillomycin (Chevanet *et al.*, 1986) albolutin, bacillin, fungistatin (Katz and Demain, 1977) รวมทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucanase (Fergus and Richard, 1990) chitinase และ  $\beta$ -1,3 glucanase (Marten *et al.*, 2000) และพบสาร zwittermicin A ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (He *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ก็สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ได้เช่นกัน (Reyes-Ramirez *et al.*, 2004)

### การใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการควบคุมโรคพืช

Mejda *et al.* (2006) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถควบคุมเชื้อ *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi*, *Fusarium graminearum* และ *Fusarium sambucinum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual culture ในห้องปฏิบัติการ และทดสอบโดยการใส่หัวพันธุ์มันฝรั่งสายพันธุ์สปุนต้า (spunta) นีดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มีความเข้มข้น  $10^7$  cfu ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อ จากการทดลองพบว่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมสามารถลดการเกิดโรค dry rot ได้ 21 วัน หากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 -27 องศาเซลเซียส

Gholam and Khodakaramian (2013) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริเวณดินรอบรากของมันฝรั่ง จำนวน 150 strain โดยมี 92 strain ที่มีประสิทธิภาพเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิบักษ์ ได้แก่ *Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas putida* ผลการทดลองในสภาพโรงเรือนสามารถช่วยลดความรุนแรงของโรค common scab ของมันฝรั่ง ที่เกิดจากเชื้อ *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces turgidiscabies* และ *Streptomyces* sp. ได้ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาใช้เคลือบหัวมันฝรั่ง และรดลงดิน

Dinesh *et al.* (2016) แยกเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากของต้นมะเขือเทศที่มีอาการเหี่ยวได้ 507 ไอโซเลท โดยพบว่ามี 2 strain ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* DSBA-11 และ DSBA-12 มีศักยภาพในการควบคุมสูงสุด และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ *B. amyloliquefaciens* DSBA-11 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สูงสุดที่ 4.91 ตารางมิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. amyloliquefaciens* strains DSBA-12 ยับยั้งได้ที่ 3.31 ตารางมิลลิเมตร และ *Bacillus subtilis* ยับยั้งได้ที่ 3.07 ตารางมิลลิเมตร

Zahoor *et al.* (2017) พบว่า *Bacillus subtilis* strain 330-2 มีการสร้างสารกรดอินโดลอะซีติก (indole-3-acetic acid: IAA), siderophores และ lytic enzymes และสามารถควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* strain AG1-IA, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Cochliobolus heterostrophus*, และ *Nigrospora oryzae* และมียีนที่สามารถผลิต antibiotic ได้ เช่น *srfAA*, *bae*, *fen*, *mln*, และ *dfnI*

Fravel and Spurr (1971) แยก *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* จากใบยาสูบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria alternata* โดยยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ถึง 88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และจากการศึกษาของ Korsten and Jager (1995) รายงานการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 33 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากส่วนของใบ และบริเวณผิวของผล avocado สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thyronectria pseudotrichia*, *Phomopsis perseae*, *Pestalotiopsis versicolor* และ *Fusarium solani* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพยับยั้งสูงที่สุด นอกจากนั้น Mahadtanapuk *et al.* (2007) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจาก 2 แหล่ง คือ จากบริเวณผิวใบของปทุมมา และเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อนจากบ่อน้ำพุร้อน เพื่อควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของปทุมมา โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค dual culture พบเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* โดยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์

Prapagdee *et al.* (2012) ทดสอบการใช้สารสกัดจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SSE4 ควบคุมการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum gloeosporioides* เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยไม้ พบสารสกัด *Bacillus subtilis* จาก ethyl acetate และ hexane มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคสูงที่สุด และจากการศึกษาของ Meng *et al.* (2016) รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ BAC03 ที่มีความเข้มข้นประมาณ  $10^7$  cfu ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 9 ชนิด ได้แก่ บีท แครอท แตงกวา พริกไทย มันฝรั่ง หัวไชเท้า สควอช มะเขือเทศ และหัวผักกาด พบว่ามีบทบาทในการเพิ่มน้ำหนักของหัวไชเท้าและใบหัวไชเท้าสูงขึ้น และสามารถผลิต IAA และแอมโมเนีย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 1. การแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่าง

##### 1.1. การแยกเชื้อสาเหตุจากหัวพันธุ์มันฝรั่ง

ทำการแยกเชื้อราจากหัวพันธุ์ที่แสดงอาการเน่าแห้ง และจี้กลาก หรือสะเก็ดด้วยวิธีแยกเชื้อจากชิ้นพืชโดยตรง (tissue transplanting method) เริ่มจากตัดชิ้นพืชแช่ใน 10% sodium hypochlorite (NaOCl) 1 นาที แช่น้ำกลั่น 30 วินาที แช่เอทานอล 70 % 1 นาที แช่น้ำกลั่น 30 วินาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง โดยวางชิ้นพืชลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และ Water Agar (WA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 - 5 วัน ตัดปลายเส้นใยของเชื้อวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วเก็บไว้ศึกษาขั้นต่อไป ส่วนชิ้นพืชของหัวพันธุ์ที่แสดงอาการจี้กลากวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA, WA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ต่ออาหาร WA ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และ Nutrient Agar (NA) ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 14 วัน คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายคลึงกลุ่มของ *Streptomyces* sp. เก็บไว้ศึกษาขั้นต่อไป ส่วนการแยกตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการหัวเน่าทำการแยกเชื้อโดยนำเอาส่วนเม็ด sclerotium ล้างด้วย 10% NaOCl 30 วินาที และ แช่น้ำกลั่น 1 นาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง วางเม็ด sclerotium ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จึงตัดปลายเส้นใยของเชื้อวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วเก็บไว้ศึกษาขั้นต่อไป

##### 1.2. การแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างในแปลงปลูกมันฝรั่ง

เก็บตัวอย่างต้นมันฝรั่งและหัวมันฝรั่ง จากแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร ได้แก่ ต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการแห้งดำ จากพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่ง อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา ต้นมันฝรั่งและหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการเหี่ยวเฉา จากพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่ง อำเภอเชียงดาว อำเภอไชยปราการ และอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงใหม่ แยกเชื้อสาเหตุให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak plate บนอาหาร NA และ Kelman's Triphenyl Tetrazolium Chloride (TZC) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว จึงคัดเลือกโคโลนีที่คล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุเก็บไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

## 2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุ

### 2.1. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Sclerotium* sp.

ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Sclerotium* sp. ด้วยการใช้น้ำมันฝรั่งทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ โดยนำน้ำมันฝรั่งล้างน้ำไหลจำนวน 1 ครั้ง เพื่อล้างเอาเศษดินออกแล้วแช่ด้วยเอทานอล 70% ตากให้แห้งภายในกล่องพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทำแผ่นบนน้ำมันฝรั่งด้วยเข็มเย็บเชื้อ จำนวน 5 จุด ต่อ 1 แผ่น โดยทำ 3 ซ้ำ ต่อ 1 หัว จากนั้นจึงวางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน และทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 แบบ คือ 1) ไม่ทำแผ่นบนน้ำมันฝรั่ง 2) ทำให้เกิดการซ้าบนน้ำมันฝรั่งโดยใช้ของแข็งทูป ด้วยน้ำหนักมือเท่ากับ 300 กรัม 3) ทำให้เกิดแผลด้วยการใช้แผ่นใยขัดขนาด 1x1 เซนติเมตร ขัดที่ผิวให้เกิดแผลขนาด 1x1 เซนติเมตร และ 4) ทำให้เกิดแผลด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะให้ลึก 0.5 เซนติเมตร จากนั้นประเมินระดับความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อราด้วยสูตรคำนวณคือ

$$\text{ขนาดของแผล (มิลลิเมตร)} = \frac{(\text{กว้าง}/2 + (\text{ลึก} - 5))}{2}$$

กำหนด

มีความรุนแรงต่ำ (LA): แผลมีขนาด  $\leq 11$  มิลลิเมตร

มีความรุนแรงปานกลาง (MA): แผลมีขนาด  $< 14$  มิลลิเมตร

มีความรุนแรงมาก (HA): แผลมีขนาด  $\geq 14$  มิลลิเมตร

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Sclerotium* sp. ทดสอบโดยการใช้เชื้อรา *Sclerotium* sp. ที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน วางลงบริเวณที่ทำแผล และไม่ทำแผล โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นชุดควบคุม เก็บผลการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

### 2.2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp., *Pectobacterium* sp. และ *Ralstonia* sp.

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Streptomyces* sp. ทำโดยใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่บ่มไว้ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ทำให้มีความเข้มข้นสปอร์ของแบคทีเรียอยู่ที่  $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำมันฝรั่งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไหลและเอทานอล 70 % ที่ให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใน

กล่องพลาสติกที่เช็ดทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำหัวมันที่แห้งแล้วมาทำแผลด้วยเข็มเย็บ เชื้อแทงลง 5 ครั้ง ต่อ 1 แผล โดยทำ 4 ซ้ำ ต่อหัวมันฝรั่ง 1 หัว แล้วทำการจุ่มหัวมันฝรั่งลงในเซลล์ แขนวลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำปลูกลงในกล่อง พลาสติกที่ผสมดินและทรายในอัตราส่วน 1:1 ให้น้ำอย่างสม่ำเสมอและเก็บผลที่ 50 วัน

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Pectobacterium* sp. ทำโดยนำแบคทีเรีย ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาแต่ละตรงกลาง ของชิ้นมันฝรั่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บผลการทดลอง ส่วนการทดสอบ ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Ralstonia* sp. ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบปฏิกิริยาการ ตอบสนองเฉียบพลัน (hypersensitivity reaction; HR) ของเชื้อแบคทีเรีย โดยเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเตรียม เซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มี ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ในช่วงความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร จากนั้นใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูด เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแล้วฉีดเข้าสู่ใบยาสูบอย่างซ้ำๆ ด้านใต้ใบยาสูบ ตรวจสอบผล เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากฉีด และจากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. มาทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรภายใต้สภาพโรงเรือน โดยการใช้ เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมลงในดินของต้นกล้ามะเขือเทศ ต้นมะเขือม่วง ต้นพริก ที่ผ่านการตัดรากและต้นมันฝรั่งที่ผ่านการผ่าหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนการปลูก เก็บผลการทดลองที่เวลา 30 วัน หลังการปลูกเชื้อ

### 3. จัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุล

#### 3.1 การจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรา *Fusarium* sp. จะทำการศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของ macroconidia, microconidia, conidiophores, chlamydospores และ pigment ของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยง เชื้อ PDA, Acid Potato Dextrose Agar (APDA), Yeast Mannitol Agar (YMA) และ Synthetic Nutrient Deficient Agar (SNA) (Booth, 1971; Leslie and Summerell, 2006) ส่วนเชื้อรา *Sclerotium* sp. จะ ทำการศึกษาลักษณะเส้นใย และ clamp connection

### 3.2. การทดสอบไบโอวาร์ (Biovar) ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

การทดสอบไบโอวาร์ เป็นการแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยอาศัยความสามารถในการใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ และน้ำตาลแอลกอฮอล์ ซึ่งทดสอบการใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ 3 ชนิด ได้แก่ มอลโทส, ทรีฮาโลส และเซลโลไบโอส น้ำตาลแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ได้แก่ แมนนิทอล, ซอร์บิทอล และ คัลซิทอล โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วขูดเชื้อด้วยหวัดเย็บเชื้อ ละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อ โดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ  $10^8$  cfu ต่อมิลลิตร จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสาเหตุโรครมา 200 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารปริมาตร 2 มิลลิตร ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromothymol blue ในอาหารทดสอบที่มีน้ำตาลในแต่ละชนิด ตรวจสอบผลหลังจากทำการทดลอง 5 วัน (Huang *et al.*, 2012)

### 3.3. การจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

#### 3.3.1. การสกัด genomic DNA ของเชื้อราและแบคทีเรีย

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราจะทำโดยเลี้ยงเชื้อราลงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำเฉพาะส่วนของเส้นใยเชื้อรา 0.50 กรัม ใส่ในโกร่งแช่เย็นแล้วเติม DNA extraction buffer ปริมาตร 2400 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 12 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด ใช้ปิเปตดูดเอาส่วนของสารละลาย DNA ลงในหลอดไมโครทิวป์ 500 ไมโครลิตร แล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆด้วยการพลิกกลับหัวหลอดไมโครทิวป์ เป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ 600 ไมโครลิตร เติม isopropanol 0.7 เท่าของปริมาตรน้ำใส แล้วพลิกกลับหัวท้ายหลอด เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วน isopropanol ทิ้ง แล้วคว่ำหลอดไมโครทิวป์ไว้บนกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยปล่อยให้ตะกอนแห้ง เป็นเวลา 30 นาที จึงเติม TE buffer 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยมา 1 มิลลิตร

ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนตะกอนแล้วล้างตะกอนด้วย sodium chloride-Tris-EDTA buffer (STE buffer) 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นเติม Tris-EDTA buffer (TE buffer) 200 ไมโครลิตร และ Tris-saturated phenol 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 60 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วน aqueous ออกจาก organic phase จากนั้นดูดส่วนใสข้างบนมา 160 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 200 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนข้างบนปริมาตร 160 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกไปมาให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนข้างบนปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป (Cheng and Jiang, 2006)

### 3.3.2. การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS1-ITS4

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ ซึ่งดัดแปลงจากเทคนิคของ Gardes and Bruns (1993) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGA GGAAGTAA-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1 X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทั้งหมด 35 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบ DNA ที่ปรากฏ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวัดค่าความเข้มข้นของ nucleic acid ด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer แล้วนำ PCR product ไป sequence ด้วยเครื่อง Fluorescent dye-terminator sequencing โดยใช้ ABI Prism™ 3730xl DNA Sequencer (Bio Basic Inc.) เมื่อได้ลำดับเบส ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย โดย BLAST ลำดับเบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบส โดยใช้รูปแบบ Tree แบบ neighbor-joining method (NJ) ของโปรแกรม MEGA 7

### 3.3.3. การจัดจำแนกเชื้อรา *Sclerotium* sp. สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับชนิดของเชื้อราสาเหตุ

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ ซึ่งดัดแปลงจากเทคนิคของ Gardes and Bruns (1993) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ SCR-F (5'-CGTAGGTGAACCTG CGGA-3') และ SCR-R (5'-CATACAAGCTAGAATCCC-3') ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทั้งหมด 35 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบ DNA ที่ปรากฏ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตแถบ DNA ที่ปรากฏ

### 3.3.4. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ โดยดัดแปลงจากเทคนิคของ Borshchevskaya *et al.* (2013) ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ 16S rDNA universal primer คือ ไพรเมอร์ ชื่อ 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ไพรเมอร์ ชื่อ 16SR (5'-AAGGAGGTGATCC AGCCGCA-3') (Liu *et al.*, 2009) จะแสดงขนาดของแถบ DNA ประมาณ 1500 bp ในการทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) และ genomic DNA 2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง A200 Gradient thermal cycler (LongGene®) โดยโปรแกรมการทำปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คือ initial denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้น denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของ DNA โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ใช้ 1.25% agarose gel ผสม

RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตแถบ DNA ที่ปรากฏ และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค Fluorescent dye-terminator sequencing โดยเครื่อง ABI Prism™ 3730xl DNA sequencers (Bio Basic Inc) เมื่อได้ลำดับเบส ทำการศึกษความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย โดย BLAST ลำดับเบสเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบส โดยใช้ Tree แบบ neighbor-joining method (NJ) ของโปรแกรม MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2011)

### 3.3.5. การจำแนก Phylotype ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค Phylotype-specific multiplex PCR (Pmx-PCR)

เป็นการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 759R 5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3' และ 760F 5'-GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG-3' ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยจะปรากฏแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 280 bp และไพรเมอร์ที่จำเพาะ phylotype ที่มีไพรเมอร์ reverse 1 เส้นคือ Nmult21:RR คือ 5'-TCGCTTGACCCTATAACGAGTA-3' และไพรเมอร์ forward 4 เส้น ได้แก่ Nmult21:1F คือ 5'-CGTTGATGAGGCGCGCAATTT-3' ปรากฏแถบ DNA ขนาด 144 bp, Nmult21:2F คือ 5'-AAGTTATGGACGGTGAAGTC-3' ปรากฏแถบ DNA ขนาด 370 bp, Nmult23:AF คือ 5'-ATTACGAGAGCAATCGAAAGATT-3' ปรากฏแถบ DNA ขนาด 91 bp และ Nmult22:InF คือ 5'-ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA-3' ปรากฏแถบ DNA ขนาด 213 bp หากปรากฏแถบ DNA ขนาดดังกล่าว คือ phylotype I, II, III และ IV ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 759R/760F ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่จำเพาะ forward phylotype ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรต่อเส้น (6 pmolต่อไพรเมอร์) ไพรเมอร์ที่จำเพาะ reverse ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร (18 pmol) และปริมาตรสุดท้ายคือ 25 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ในขั้น initial denaturation แล้วตามด้วย 30 รอบ ของขั้น denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที annealing ที่ 59 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลจากการทำ Pmx-PCR ด้วย เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) แล้วสังเกตแถบ DNA ที่ปรากฏ

### 3.3.6. การจัดจำแนก *sequevar* ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

การจัดจำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งยีน *egl* และ *hrpB* โดยยีน *egl* จะใช้ไพรเมอร์ EndoF คือ 5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3' และไพรเมอร์ EndoR คือ 5'-GCGTTGCCCCGGCACGAACACC-3' โดยจะปรากฏแถบ DNA ขนาด 750 bp ส่วนยีน *hrpB* จะใช้ไพรเมอร์ RShrpBf คือ 5'-TGCCATGCTGGGAAACATCT-3' และ RShrpBr คือ 5'-GGGGGCTTCGTTG AACTGC-3' ซึ่งจะปรากฏแถบ DNA ขนาด 1434 bp ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) และ genomic DNA 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน initial denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทั้งหมด 30 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบ DNA ที่ปรากฏด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวัดค่าความเข้มข้นของ nucleic acid ด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer แล้วนำ PCR product ไป sequence ด้วยเครื่อง Fluorescent dye-terminator sequencing โดยใช้ ABI Prism™ 3730xl DNA Sequencer (Bio Basic Inc.) เมื่อได้ลำดับเบส ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย โดย BLAST ลำดับเบสเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบส โดยใช้ Tree แบบ neighbor-joining method (NJ) ของโปรแกรม MEGA 7

#### 4. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบรากต้นไผ่ และ ดินรอบรากต้นกล้วย ที่เก็บมาจากอำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส ดินบริเวณฝักรากมันฝรั่งดินบริเวณ ดินรอบรากต้นมันฝรั่ง และดินปลูกมันฝรั่ง จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ Kings Medium B (King's B) เริ่มจากนำดิน 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิตร เพื่อทำการเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  จากนั้นนำสารแขวนลอยของดินที่ความเข้มข้นที่  $10^{-5}$  มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ King's B ด้วยวิธีการ spread plate บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรีย

ปรากฏบนผิวน้ำอาหาร ทดสอบการเรืองแสงของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร King's B ภายใต้หลอด UV จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่มีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ King's B มา streak ลงบนอาหาร NA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อบนอาหาร NA เพื่อเก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

## 5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของม้านฝรั่ง

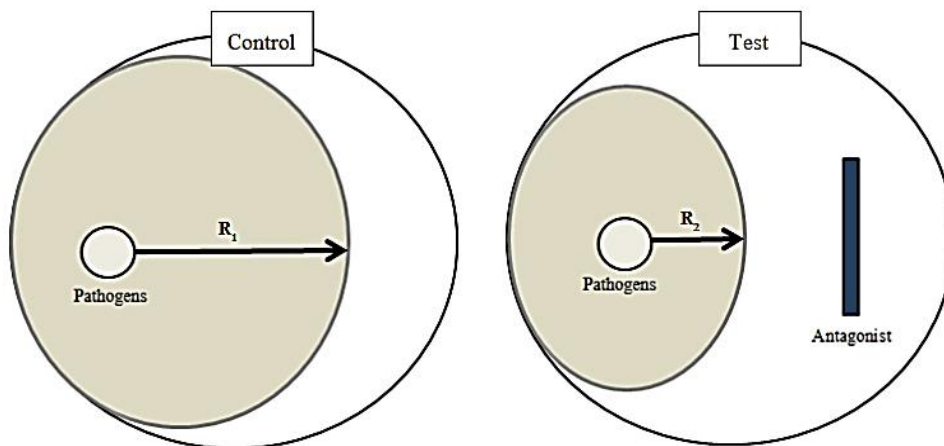
### 5.1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ

นำแบคทีเรียปฏิบัติการที่แยกได้ มาทดสอบความสามารถการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของม้านฝรั่ง โดยวิธี dual culture โดยใช้กระดาษกรองตัดเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ากว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร ชุบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการ วางบนจานอาหาร (ภาพที่ 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ จึงวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อสาเหตุและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) ดังนี้

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ (percent inhibition) =  $\frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$

กำหนดให้ R 1 = รัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุในชุดควบคุม

R 2 = รัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุในชุดทดสอบ



ภาพที่ 1 การวัดผลการคัดเลือกการเป็นปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture

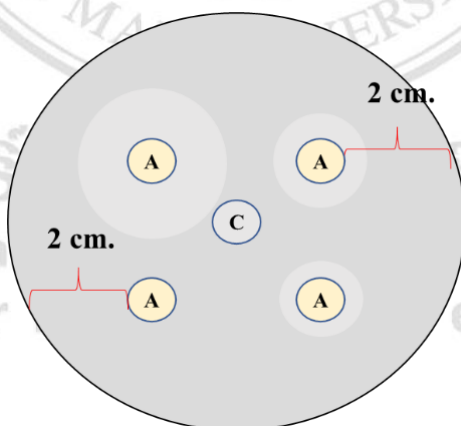
## 5.2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียเหตุ

นำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร NA ด้วยวิธี paper disc โดยเทอาหาร NA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นฐาน (basal layer) จากนั้นใช้อาหาร NA ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตรผสมกับเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น  $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เททับลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ตัดแปลงจาก Yang *et al.* (2012) แล้วนำกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่ตัดเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และลงบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ อายุ 48 ชั่วโมง มาวางบนผิวหน้าอาหาร โดยวางเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 1 ไอโซเลท และอีก 1 ตำแหน่งตรงกลางเป็นชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เว้นระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ (ภาพที่ 2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลโดยการวัดรัศมีความกว้างบริเวณที่เกิดวงใส (inhibition zone) แล้วนำค่าความกว้างของรัศมีวงใสที่ได้มาคำนวณทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistic Linear Models โดยการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนี้

$$\text{รัศมีของความกว้างบริเวณใส} = \frac{(\text{เส้นผ่าศูนย์กลางรวมบริเวณวงใส} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของกระดาษกรอง})}{2}$$

กำหนดให้ A = Antagonist (เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ)

C = Control (ชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น)



ภาพที่ 2 การวัดผลการการคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวิธี paper disc

## 6. การศึกษา และการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

### 6.1. การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง ของเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่เจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และการสร้างเอนโดสปอร์ ขนาด รูปร่าง ตำแหน่ง ของเชื้อปฏิปักษ์ที่เจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

### 6.2. การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านสัณฐานวิทยา จึงนำมาทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี โดยมีการทดสอบทั้งหมด 5 คุณสมบัติ คือ ศึกษาการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร motility test โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อและเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง stab ลงในอาหาร motility medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test) โดยการใช้กระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่นั่งมาเชื้อแล้วและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง มาวางบนอาหาร starch agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย Lugol's iodine ลงบนอาหารแล้วอ่านผลทันที ทดสอบ VP (Voges-Proskauer) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเขี่ยเชื้อและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มา 1 loop เลี้ยงในอาหาร VP บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยด Reagent A จำนวน 6 หยดแล้วตามด้วย Reagent B จำนวน 2 หยด อ่านผลภายในเวลา 15-30 นาที ทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมทาบอลิซึม (citrate utilization) โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง จีด (streak) ลงบนอาหาร Simmon's citrate agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72-120 ชั่วโมง และทดสอบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่ผสม 6.5% NaCl โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง จีดลงในอาหารดังกล่าว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามแผนภูมิการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

### 6.3. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยอาศัยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และใช้ไพรเมอร์ 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 16SR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') ที่ออกแบบจากยีนส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรีย ตาม Liu *et al.* (2009) ซึ่งประกอบไปด้วย 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) และ genomic DNA 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Gradient Thermal Cycler (A200) โดยใช้อุณหภูมิ ในขั้นตอน initial denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 64 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นตรวจสอบแถบ DNA ที่ปรากฏ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวัดค่าความเข้มข้นของ nucleic acid ด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer แล้วนำ PCR product ไป sequence ด้วยเครื่อง Fluorescent dye-terminator sequencing โดยใช้ ABI Prims™ 3730x1 DNA Sequencer (Bio Basic Inc.) เมื่อได้ลำดับเบส ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย โดย BLAST ลำดับเบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบส โดยใช้ Tree แบบ neighbor-joining method (NJ) ของโปรแกรม MEGA 7

## 7. ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค

### 7.1. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทดสอบโดยการเตรียมอาหาร Pikovskaya's agar จากนั้นใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 ตัดเป็นกระดาษวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบ เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 24-48 ชั่วโมง แล้ววางลงบนอาหาร Pikovskaya's agar บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบผล และบันทึกการเกิดบริเวณใสของการละลายฟอสเฟต (Jasim *et al.*, 2013) ซึ่งความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์ ส่งผล

ให้พืชสามารถนำธาตุอาหารฟอสฟอรัสจากดินในรูปของฟอสเฟตที่ผ่านการย่อยสลายมาแล้วมาใช้ในการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างเพียงพอ (อาการ์ตัน, 2549)

ทดสอบการสร้างสารกรดอินโดลอะซีติก (indole-3-acetic acid: IAA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี tryptophan 0.5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน นำอาหารเหลว LB ที่มีสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์มาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6000 rpm นาน 30 นาที จากนั้น ใส่น้ำไปปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติม orthophosphoric acid จำนวน 3 หยด และ Salkowski's reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer 3 ซ้ำ (Lwin *et al.* 2012) :ซึ่ง IAA นั้นเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulating chemicals : PGRC) ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยึดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก (พันทวี, 2532 ; พีรเดช, 2529)

ทดสอบการสร้าง siderophore ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร Chrome Azurol S agar (CAS) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารรอบๆ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญ โดยหากเชื้อสามารถสร้าง siderophore ได้จะเกิดวงสีส้มขึ้น (Yu *et al.*, 2011) ซึ่งการที่จุลินทรีย์มีการสร้าง siderophore ขึ้นมาเพื่อเป็นตัวช่วยนำเหล็กเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณเหล็กที่จำกัด หรืออยู่ในรูปที่นำไปใช้ไม่ได้ (มานิตา และวสุ, 2557)

## 7.2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศจำนวน 100 เมล็ด แช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความเข้มข้น  $10^8$  cfu ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผึ่งให้ในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษชั่ง (blotter method) โดยนำเมล็ดมะเขือเทศวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น ด้านบน และกระดาษฟาง 2 แผ่น ที่หยคน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ความชื้นด้านล่าง วางเมล็ดมะเขือเทศจำนวน 25 เมล็ดต่อจาน ตรวจสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศแล้ววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์

## 8. การศึกษาหาของยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียปฏิบัณท์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง

ศึกษาหาของยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง (ตารางที่ 1) โดยนำ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ มาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR จะประกอบไปด้วย 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Japan) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตรต่อเส้น (1.6 pmol) และ genomic DNA 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายคือ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คือ initial denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 25 วินาที จากนั้น denature ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และต่อด้วยขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบขนาดของแถบ DNA ที่ปรากฏ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.25% agarose gel ที่ผสม RedSafe™ (iNtRON biotechnology) ในอัตรา 0.05 เปอร์เซ็นต์ และใช้ DNA marker 1 KB plus (50 µg/ 500 µl) 250-10000 bp เพื่อใช้เป็น molecular weight marker ตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วยเครื่อง Ultra Slim LED Illuminator และบันทึกภาพ

ตารางที่ 1 ชนิดของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการศึกษาหาของยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะ

Antibiotic	primer	Sequences (5'-3')	PCR product size (bp)	References
Bacillomycin D	BACD-F1	TTGAAAYGTCAGYGCSCCTTT	482	Chung <i>et al.</i> (2008)
	BACD-R1	TGCGMAAATAATGSGTCTCGT		
Bacillomycin A	BACA-F	TGAAACAAAGGCATATGCTC	875	(2008)
	BACA-R	AAAAATGCATCTGCCGTTCC		
Surfactin	SFP-F	ATGAAGATTTACGGAATTTA	675	Venkatesan <i>et al.</i> (2015)
	SEP-R	TTATAAAAGCTCTTCGTACG		
Fengycin D	FEN D-F	CCTGCAGAAGGAGGAGAAGTGAAG	964	(2015)
	FEN D-R	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC		
Iturin A	ITUA-F1	GATGCGATCTCCTTGGATGT	647	
	ITUD-R1	ATCGTCATGTGCTGCTTGA		
Iturin D	ITUD-F1	CCCCTGTTCTAGATGATCGGAGGAATCTC	1203	
	ITUD-R1	TGCATCGATTCTGTCCATCTAACC GG CATC		

## 9. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือน

### 9.1. การเตรียมแบคทีเรียปฏิชีวนะ

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำเป็นเซลล์แขวนลอยให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่  $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเทลงในกล่องพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำหัวพันธุมันฝรั่งที่ผ่านการล้างดินออก ผึ่งให้แห้ง แล้วผ่าครึ่งจากนั้นนำไปแช่ลงในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะภายในกล่องพลาสติก เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

### 9.2. การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อรา *Sclerotium* sp. ลงในเมล็ดข้าวฟ่างแดง 200 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน แล้วนำไปคลุกกับวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินและทรายที่มีอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 3500 กรัม

เลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ราดลงวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินและทรายที่มีอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 3500 กรัม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่มีความเข้มข้น  $10^{7-8}$  cfu ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ราดลงวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินและทรายที่มีอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 3500 กรัม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น  $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ราดลงวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินและทรายที่มีอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 3500 กรัม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น  $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ราดลงวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินและทรายที่มีอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 3500 กรัม

### 9.3. การทดสอบภายในสภาพโรงเรือน

ในการทดลองจะทำการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวนทั้งหมด 22 ซ้ำ อยู่ 20 กรรมวิธี มีรายละเอียด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 = ชุดควบคุมต้นปกติ

กรรมวิธีที่ 2 = ชุดควบคุมปลูกโรคอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 = ชุดควบคุมที่หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02

กรรมวิธีที่ 4 = ชุดควบคุมที่หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03

กรรมวิธีที่ 5 = ชุดควบคุมที่หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPP07

กรรมวิธีที่ 6 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02 ร่วมกับดินที่มีการคลุกเชื้อรา *Sclerotium* sp.

กรรมวิธีที่ 7 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 ร่วมกับดินที่มีการคลุกเชื้อรา *Sclerotium* sp.

กรรมวิธีที่ 8 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPP07 ร่วมกับดินที่มีการคลุกเชื้อรา *Sclerotium* sp.

กรรมวิธีที่ 9 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Fusarium* sp.

กรรมวิธีที่ 10 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Fusarium* sp.

กรรมวิธีที่ 11 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPP07 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Fusarium* sp.

กรรมวิธีที่ 12 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp.

กรรมวิธีที่ 13 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp.

กรรมวิธีที่ 14 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPP07 ร่วมกับราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp.

กรรมวิธีที่ 15 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium* sp.

กรรมวิธีที่ 16 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium* sp.

กรรมวิธีที่ 17 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SPP07 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium* sp.

กรรมวิธีที่ 18 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SB02 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp.

กรรมวิธีที่ 19 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SD03 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp.

กรรมวิธีที่ 20 = หัวพันธุ์ผ่านการแช่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SPP07 ร่วมกับราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp.

#### 9.4. การเก็บผล และวิเคราะห์ผลการทดลอง

ประเมินการเกิดโรคจากกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *Sclerotium* sp. สาเหตุโรคเน่าหรือหัวเน่า ที่เวลา 45 วัน คัดแปลงการประเมินจากการทดลองของ Fery and Dukes (2002) โดยกำหนดระดับของการเกิดโรคเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = ผอมสูง

ระดับที่ 2 = ลำต้นมีแผลเล็กน้อย

ระดับที่ 3 = ลำต้นมีแผล และล้ม

ระดับที่ 4 = ต้นล้มตาย

ประเมินการเกิดโรคจากกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *Fusarium* sp. สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง หรือเหี่ยวที่เวลา 45 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยคัดแปลงจาก Thanassouloupoulos and Kitsos (1985) ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = แคระ หรือผอมสูง

ระดับที่ 2 = มีใบสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง หรือเหี่ยวเล็กน้อย

ระดับที่ 3 = ใบล่างร่วง ใบบนเหี่ยวมาก

ระดับที่ 4 = ต้นตาย

ประเมินการเกิดโรคจากกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *Streptomyces* sp. สาเหตุโรคซีกกลากที่เวลา 45 วัน หลังจากการปลูกเชื้อทดสอบ ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยคัดแปลงจาก Chih *et al.* (2018) โดยแบ่งระดับลักษณะของแผลเป็น 4 ระดับ ดังนี้

- ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ
- ระดับที่ 1 = ผอมสูง
- ระดับที่ 2 = มีใบสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง
- ระดับที่ 3 = แคระแกรน
- ระดับที่ 4 = ตันตาย หรือไม่งอก

ประเมินการเกิดโรคจากกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *Pectobacterium* sp. สาเหตุโรคแห้งดำหรือเน่าและ ที่เวลา 45 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยดัดแปลงจาก Fery and Dukes (2002) โดยมี 4 ระดับ ได้แก่

- ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ
- ระดับที่ 1 = แคระหรือผอมสูง
- ระดับที่ 2 = โคนลำต้นมีแผลน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์
- ระดับที่ 3 = โคนลำต้นมีแผลมากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์
- ระดับที่ 4 = ตันล้มตาย

ประเมินการเกิดโรคจากกรรมวิธีที่ทดสอบกับ *Ralstonia* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวหรือเน่าสีน้ำตาล ที่เวลา 45 วัน หลังจากการปลูกเชื้อทดสอบ ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยดัดแปลงจาก Horita and Tsuchiya (2001) โดยแบ่งระดับอาการ 4 ระดับ ได้แก่

- ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ
- ระดับที่ 1 = ตันแคระ หรือผอมสูง
- ระดับที่ 2 = ใบอ่อนร่วงร้วย หรือมีอาการเหี่ยว
- ระดับที่ 3 = 4 ใบหรือมากกว่ามีอาการเหี่ยว
- ระดับที่ 4 = ตันเหี่ยวตาย

ประเมินเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ระดับความรุนแรงของโรค และประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตาม Yang, et al. (2012) คือ

$$\text{ความรุนแรงของโรค (\%)} = \frac{\sum(\text{จำนวนต้นพืชที่เป็นโรคในแต่ละระดับ} \times \text{ระดับการเกิดโรค})}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมดที่ทำการทดสอบ} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \times 100$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (\%)} = \frac{\text{ความรุนแรงของโรคชุดควบคุม} - \text{ความรุนแรงของโรคแต่ละกรรมวิธี}}{\text{ความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่าง

##### 1.1. การแยกเชื้อสาเหตุจากหัวพันธุ์มันฝรั่ง

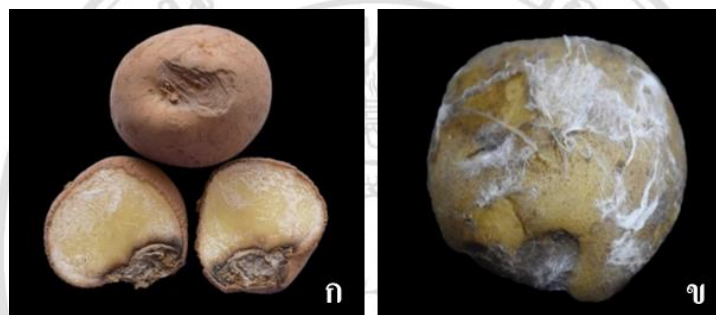
การแยกเชื้อราบนหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการ dry rot จาก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีลักษณะอาการเป็นแผลยุบตัวแห้ง ไม่ละ เมื่อผ่าหัวมันฝรั่งดูตรงบริเวณแผลจะสังเกตเห็นว่าเนื้อเยื่อด้านในเสียหายและเป็นสีน้ำตาลแห้ง รอบแผลเป็นสีน้ำตาลเข้มล้อมรอบ แยกเชื้อโดยวิธีแยกจากแผลโดยตรง (infected tissue) พบว่า สามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ 2 ไอโซเลท ได้แก่ CP01 และ CP02 (ตารางที่ 2, ภาพที่ 3ก) และจากการแยกเชื้อราบนหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการ dry rot ตัวอย่างจาก อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ที่มีลักษณะอาการเชื้อราสีขาวปกคลุมแผลเป็นจุดๆ เมื่อผ่าดูบริเวณแผลที่มีลักษณะยุบ กลางแผลเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 3ข) สามารถแยกเชื้อราได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ PP01, PP02 และ PP03

การแยกเชื้อรา *Sclerotium* sp. จากเมล็ด sclerotium บนหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการหัวเน่า (tuber rot) ของหัวมันฝรั่ง ตัวอย่างจากอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีลักษณะอาการบนหัวมันฝรั่งคือยุบตัวมีรอยช้ำเป็นวง แผลขยายและมีเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุมจนพัฒนาเป็นเมล็ดฝักกาดปรากฏ (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถแยกได้ 1 ไอโซเลท คือ SC01

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการเป็นสะเก็ดแห้งๆ สีน้ำตาล โดยมีขอบแผลนูนเป็นสีน้ำตาล กลางแผลยุบลงไปเล็กน้อย แผลอยู่ติดต่อกันเป็นแผ่น ทำให้หัวมันมีลักษณะเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลบนผิวเป็นบริเวณกว้าง (ภาพที่ 5) ตัวอย่างจาก อำเภอไชยปราการ อำเภอเมือง และ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ แยกเชื้อโดยวิธีการแยกจากแผลโดยตรง พบว่า สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ PE04, MJ11, MJ21, MJ27 และ MM30 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหัวมันฝรั่งจากแหล่งต่างๆ

ไอโซเลท	แสดงอาการ	แหล่งที่มา
CP01 และ CP02	dry rot	อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่
PP01, PP02 และ PP03	dry rot	อำเภอบพพระ จังหวัดตาก
SC01	หัวเน่า	อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
PE04	จี้กลาก	อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่
MJ11, MJ21 และ MJ27	จี้กลาก	อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
MM30	จี้กลาก	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของโรค dry rot บนหัวมันฝรั่งสายพันธุ์แอตแลนติก  
 ก. หัวมันฝรั่งจาก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่  
 ข. หัวมันฝรั่งจาก อำเภอบพพระ จังหวัดตาก



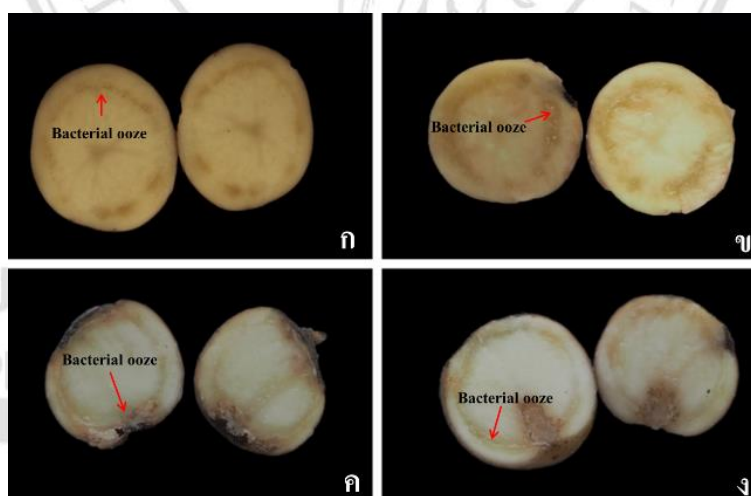
ภาพที่ 4 ลักษณะอาการของโรคหัวเน่า (tuber rot) ของหัวมันฝรั่ง  
 จาก อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 5 หัวมันฝรั่งที่มีลักษณะอาการ โรคขี้กลาก (scab) จาก อำเภोजอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

### 1.2. การแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างในแปลงปลูกมันฝรั่ง

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุจากหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการบริเวณข้อปลั่งเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าหัวมันฝรั่งพบของเหลวข้นสีขาวไหลออกมา (ภาพที่ 6) พบว่าสามารถแยกได้ 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MA01, CK01, MK01 และ CD01 ตัวอย่างจาก อำเภอแม่อาว อำเภอไชยปราการ และ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ตามลำดับ ส่วนจากการแยกเชื้อจากตัวอย่างต้นมันฝรั่ง อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา ที่แสดงอาการลำต้นดำ กลวง และเหี่ยว (ภาพที่ 7) พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SR01, SR02, SR03, SR04, SR05, SR06 และ SR07



ภาพที่ 6 ลักษณะอาการ โรคเหี่ยว (bacterial wilt) หรือ โรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ในหัวมันฝรั่ง จากพื้นที่อำเภอแม่อาว อำเภอไชยปราการ และ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

- ก. อำเภอไชยปราการ
- ข. - ค. อำเภอเชียงดาว
- ง. อำเภอแม่อาว



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการของต้นมันฝรั่งที่ถูกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอาการเน่าเข้าทำลายบริเวณลำต้น จาก อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา

## 2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุ

### 2.1. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Fusarium* sp. และเชื้อรา *Sclerotium* sp.

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium* sp. ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CP01 และ CP02 จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และไอโซเลท PP01, PP02 และ PP03 จากอำเภอบพพระ จังหวัดตาก พบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลทที่แสดงอาการผิดปกติบนหัวมันฝรั่ง ได้แก่ ไอโซเลท CP01 และ PP03 โดยเริ่มแสดงอาการบนหัวมันฝรั่งที่ 5 วัน และขยายผลลูกตามหัวมันฝรั่ง เมื่อนำหัวมันฝรั่งผ่าตามขวาง ไอโซเลท CP01 แสดงลักษณะอาการแผลที่กว้างชัดเจนกว่าไอโซเลท PP03 (ภาพที่ 8) เมื่อทดสอบระดับความสามารถในการเกิดโรคบนหัวมันฝรั่ง พบว่า ไอโซเลท CP01 มีความรุนแรงในการทำให้เกิดอาการผิดปกติบนหัวมันฝรั่ง เมื่อทำให้เกิดบาดแผลโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ให้แผลลึก 5 มิลลิเมตร ทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายหรือเกิดบาดแผลบนหัวมันฝรั่งได้กว้างที่สุด มีขนาดแผลที่ 15.0 มิลลิเมตร จัดเป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงมาก (HA) ส่วนไอโซเลท PP03 ทำให้เกิดบาดแผลที่ขนาด 5.4 มิลลิเมตร จัดเป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงต่ำ (LA) จากการทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายและระดับความรุนแรงในการเกิดโรคจะเห็นได้ว่าเชื้อราสาเหตุจะสามารถเข้าทำลายมันฝรั่งได้ เมื่อหัวมันฝรั่งเกิดบาดแผลเท่านั้น (ภาพที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Khalil and Mghrabia (2010) ที่เชื้อรากลุ่ม *Fusarium* sp. สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง จะเข้าทำลายหรือทำให้เกิดอาการของโรคได้ก็ต่อเมื่อเกิดบาดแผลบนหัวมันฝรั่ง จากนั้นทำการเก็บเชื้อราไอโซเลท CP01 ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ไอโซเลต CP01 อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่

ไอโซเลต PP03 อ.พบพระ จ.ตาก



ภาพที่ 8 ผลการปลูกเชื้อ *Fusarium* sp. ไอโซเลต CP01 และ PP03 บนหัวมันฝรั่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ก-1. อาการบนหัวมันฝรั่งปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต CP01 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ก-2. อาการบนหัวมันฝรั่งปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต CP01 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

ก-3. อาการบนหัวมันฝรั่ง ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต CP01 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ข-1. อาการบนหัวมันฝรั่ง ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต PP03 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

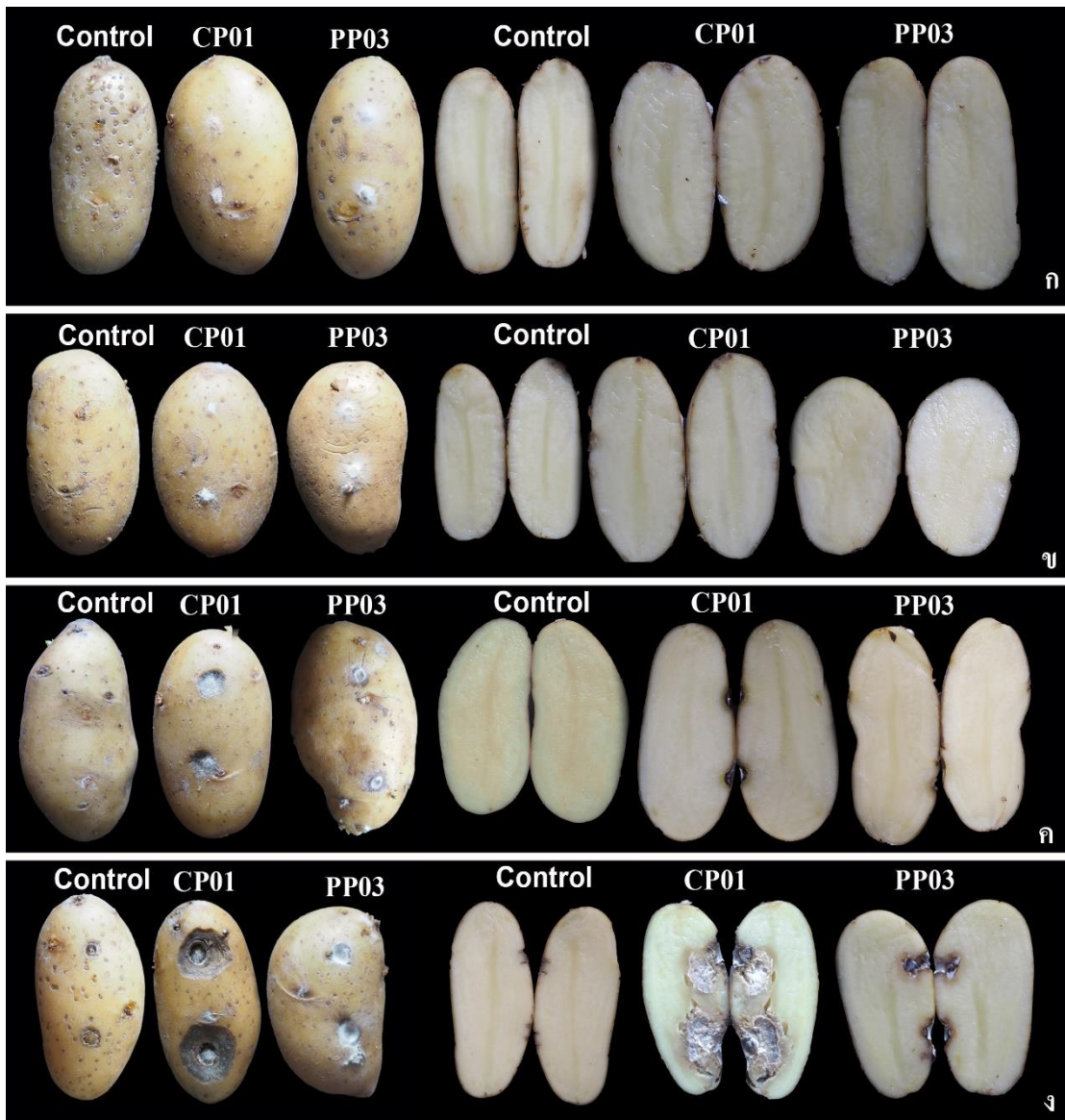
ข-2. อาการบนหัวมันฝรั่ง ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต PP03 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

ข-3. อาการบนหัวมันฝรั่งปลูกเชื้อด้วยไอโซเลต PP03 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

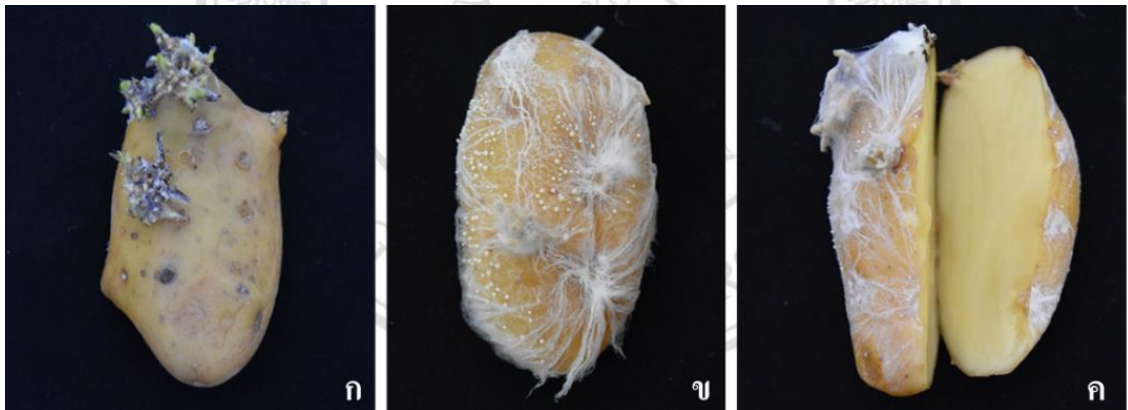


ภาพที่ 9 ผลการทดสอบระดับความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนหัวมันฝรั่งในการทำแผลแบบต่างๆ

ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

- ก. ชุดการทดสอบไม่ทำแผล
- ข. ชุดการทดสอบทำให้หัวมันฝรั่งเกิดอาการช้ำ
- ค. ชุดทดสอบที่ทำแผลจากการขีดถู
- ง. ชุดการทดสอบที่ทำแผลด้วยการใช้ cork borer

การปลูกเชื้อรา *Sclerotium* sp. ลงบนหัวมันฝรั่ง เพื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคโดยใช้ส่วนชิ้นวุ้น วางลงบนหัวมันฝรั่งบริเวณที่ทำแผล และไม่ทำแผล เทียบกับชุดควบคุมที่วางเฉพาะชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ชุดทดสอบที่ทำแผลแล้ววางวุ้นเชื้อราลงบนแผลนั้น มีลักษณะอาการซ้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลง และพบการเจริญของเส้นใยสีขาว จากนั้นกลายเป็นเม็ด sclerotium ปกคลุมหัวมันฝรั่ง (ภาพที่ 10ข-ค) ในขณะที่ชุดควบคุมไม่มีลักษณะอาการซ้ำ ยุบตัว หรือผิดปกติ (ภาพที่ 10ก) ซึ่งลักษณะอาการสอดคล้องกับการรายงานของ Rubayet *et al.* (2016) ที่เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรค stem rot ของมันฝรั่ง สามารถทำให้เกิดลักษณะอาการเน่าที่ลำต้น และบริเวณหัวมันฝรั่งได้ โดยบริเวณแผลที่ลำต้นจะเป็นสีดำและเกิดอาการล้มหักของลำต้น ส่วนบริเวณหัวมันฝรั่งจะเกิดลักษณะอาการเนื้อเยื่อยุบ มีเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญปกคลุมบริเวณแผลหรือทั้งหัวมันฝรั่ง และจะพบเม็ด sclerotium สีขาว หรือสีน้ำตาลเข้มเจริญขึ้นปกคลุมหัวมันฝรั่ง และจากการรายงานของ Billah *et al.* (2017) และ Díaz Nájera *et al.* (2018) พบว่าเชื้อรา *S. rolfsii* เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการลำต้นเน่าและหัวเน่าในมะเขือเทศ และ พักทองญี่ปุ่นได้



ภาพที่ 10 ผลการปลูกเชื้อรา *Sclerotium* sp. บนหัวมันฝรั่ง พันธุ์สปุนต้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน

ก. ชุดควบคุม

ข. หัวพันธุ์ที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Sclerotium* sp.

ค. หัวพันธุ์ที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Sclerotium* sp. ผ่าตามยาว

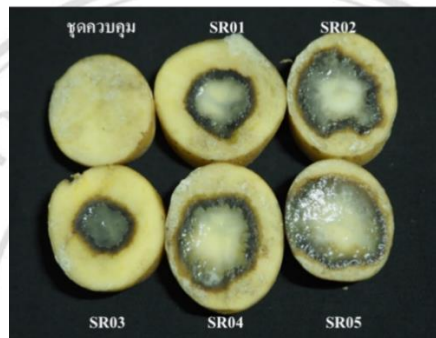
## 2.2. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *Streptomyces* sp., *Pectobacterium* sp. และ *Ralstonia* sp.

จากการทดสอบความสามารถของการเกิดโรคของเชื้อ *Streptomyces* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามี 2 ไอโซเลทมีลักษณะคล้ายคลึงกับอาการสะเก็ดจึงทดสอบซ้ำใน กล่องขึ้น ภายใต้ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วัน พบว่า ไอโซเลท MJ21 มีความสามารถในการทำให้หัวมันฝรั่งแสดงอาการของโรคได้ โดยทำให้หัวมันฝรั่ง แสดงอาการแห้งแตกเป็นสะเก็ด (ภาพที่ 11ค.) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมจะเห็นได้ว่าหัวมันฝรั่งแสดง อาการปกติไม่มีอาการแตกเป็นสะเก็ดปรากฏขึ้นทั้งชุดควบคุมที่ไม่ทำแผล (ภาพที่ 11ก.) และ ชุดควบคุมที่ทำแผล (ภาพที่ 11ข.)



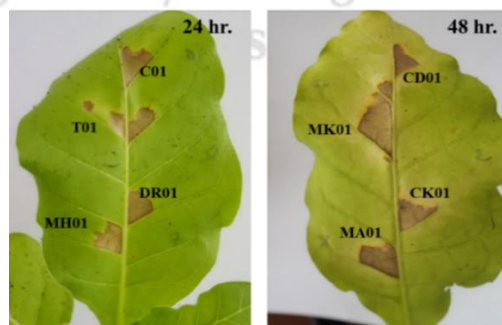
ภาพที่ 11 ผลการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท MJ21 บนหัวมันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 50 วัน เทียบกับชุดควบคุม  
ก. ชุดควบคุมไม่ทำแผล  
ข. ชุดควบคุมทำแผล  
ค. ชุดทดสอบปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคไอโซเลท MJ21

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างต้นมันฝรั่ง อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา จำนวน 7 ไอโซเลท พบว่า มี 5 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดอาการผิปกดืบบนชิ้นมันฝรั่ง ซึ่งแสดงลักษณะอาการขอบแผลดำซ้ำ ตรงกลางแผลเป็นเมือกเยิ้ม สีขาว มีกลิ่น หลังปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นลักษณะที่สอดคล้องกับการรายงานของ Bonde (1952) พบว่าเมื่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่มีความรุนแรงเข้าทำลาย stolon และหัวมันฝรั่ง จะแสดงอาการเน่าและภายในหัวมันฝรั่ง จากนั้นทำการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ ทำให้สามารถคัดเลือกเหลือเพียง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SR01 และ SR03



ภาพที่ 12 ผลการปลูกเชื้อกลุ่มอาการเน่าและ (soft rot) ทั้ง 5 ไอโซเลทเทียบกับชุดควบคุม ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองเฉียบพลัน (hypersensitivity response: HR) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่งทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ MA01, CK01, MK01 และ CD01 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในปทุมมา (MH01) ดาวเรือง (DR01) มะเขือเทศ (T01) และพริก (CP01) พบว่า ไอโซเลท MA01, CK01, MK01 และ CD01 จะเริ่มแสดงอาการไหม้ที่ 24 ชั่วโมง และเป็นแผลไหม้ชัดเจนที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับ ไอโซเลท CP01, T01, DR01 และ MH01 เกิดอาการไหม้ชัดเจนที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองเฉียบพลัน (hypersensitivity response: HR) ของต้นยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum*) อายุประมาณ 1 เดือน

ส่วนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *R. solanacearum* ในต้นมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) มะเขือยาว (*Solanum melongena*) และพริกหนุ่มเขียว (*Capsicum annuum*) ทั้ง 8 ไอโซเลท พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถเข้าทำลายต้นมะเขือเทศได้ ยกเว้น ไอโซเลท MH01 ที่แยกได้จากปทุมมา และทุกไอโซเลทไม่สามารถเข้าทำลายต้นมะเขือยาว และพริกหนุ่มเขียวได้ ยกเว้น ไอโซเลท T01 ที่แยกได้จากมะเขือเทศ ส่วนการทดสอบในต้นมันฝรั่งนั้น มีเพียงไอโซเลท DR01 ที่แยกได้จากดาวเรืองเท่านั้นที่ไม่สามารถเข้าทำลายได้ (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cho *et al.* (2018) ที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ในประเทศเกาหลี พบว่า เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุทั้งหมด 93 ไอโซเลท พบ 4 ไอโซเลท ที่สามารถเข้าทำลายต้นมันฝรั่งและต้นมะเขือเทศได้ 11 ไอโซเลท ที่สามารถเข้าทำลายได้เฉพาะมันฝรั่ง 12 ไอโซเลทที่สามารถเข้าทำลายมันฝรั่ง มะเขือเทศ และมะเขือยาว และ 66 ไอโซเลท ที่สามารถเข้าทำลายมันฝรั่ง มะเขือเทศ มะเขือยาว และพริก และจากการรายงานของ Gutarra *et al.* (2017) จากการนำเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ในประเทศเปรู ทั้งหมด 25 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถการเกิดโรคในต้นพริก มันฝรั่ง มะเขือเทศ และยาสูบ พบว่า เชื้อสาเหตุทั้ง 25 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดอาการเหี่ยวในต้นมันฝรั่ง ได้ที่ 50 – 100 เปอร์เซ็นต์ 22 ไอโซเลท ที่สามารถทำให้เกิดอาการเหี่ยวในต้นมะเขือเทศและมะเขือยาว และ 9 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดอาการเหี่ยวในต้นยาสูบได้

ตารางที่ 3 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และความรุนแรงของโรคในพืชอาศัยอื่น

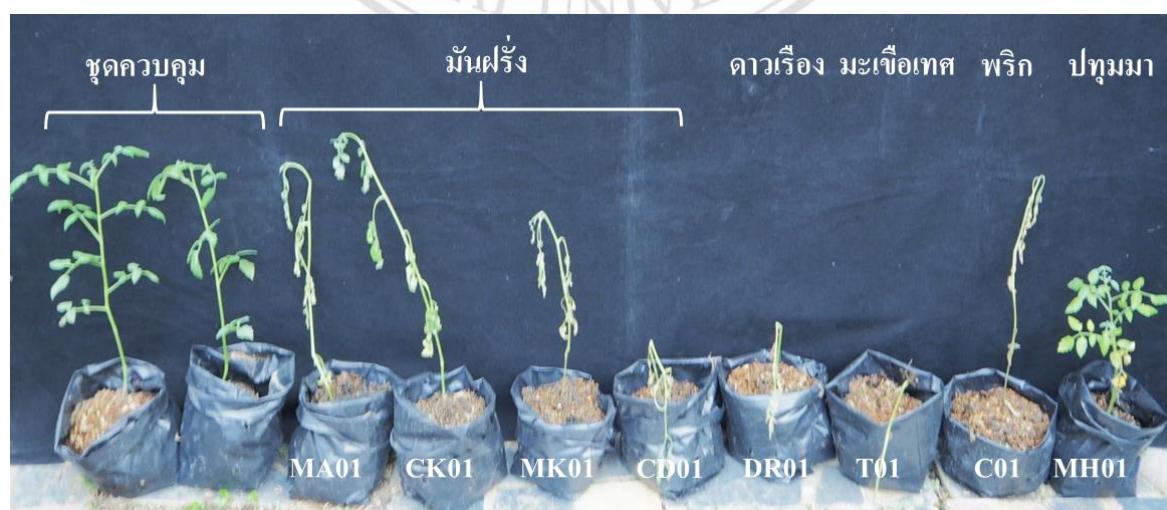
ไอโซเลท	แหล่งที่มา	พืช (host)			
		มันฝรั่ง <i>Solanum tuberosum</i>	มะเขือเทศ <i>Lycopersicon esculentum</i>	มะเขือยาว <i>Solanum melongena</i>	พริกหนุ่มเขียว <i>Capsicum annuum</i>
พริก CP01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	-	-
ดาวเรือง DR01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	-	+	-	-
มะเขือเทศ T01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	-	-

\*หมายเหตุ -; ไม่เกิดโรค, +; เกิดโรค

ตารางที่ 3 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และความรุนแรงของโรคในพืชอาศัยอื่น (ต่อ 1)

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	พืช (host)			
		มันฝรั่ง <i>Solanum tuberosum</i>	มะเขือเทศ <i>Lycopersicon esculentum</i>	มะเขือยาว <i>Solanum melongena</i>	พริกหนุ่ม เจียว <i>Capsicum annuum</i>
ปทุมมา MH01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	-	-	-	-
มันฝรั่ง CK01	อ. ไชยปราการ จ. เชียงใหม่	+	+	-	-
มันฝรั่ง MK01	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	+	+	-	-
มันฝรั่ง CD01	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	+	+	-	-
มันฝรั่ง MA01	อ. แม่อาลัย จ. เชียงใหม่	+	+	-	-

\*หมายเหตุ -; ไม่เกิดโรค, +; เกิดโรค



ภาพที่ 14 การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในต้นมะเขือเทศ ภายใต้สภาพโรงเรือน หลังปลูกเชื้อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน

### 3. จัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุล

#### 3.1. การจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เมื่อนำเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03 มาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท CP01 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีขนาดของ macroconidia ที่  $23.5-30.7 \mu\text{m} \times 5.6-14.5 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-7 และ โคลโคนีเป็นสีขาวอมส้ม บนอาหาร APDA มีขนาดของ macroconidia ที่  $21.0-29.2 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-6 และ โคลโคนีเป็นสีขาวเหลือง และฟู ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Robertson (2005) รายงานว่าเชื้อรา *F. graminearum* มีลักษณะฟู และ โคลโคนีเป็นสีเหลือง ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA มีขนาดของ macroconidia ที่  $18.6-30.6 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-5 และ โคลโคนีเป็นสีเหลืองอมขาว และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SNA มีขนาดของ macroconidia ที่  $19.0-28.2 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-7 และ โคลโคนีเป็นสีเหลืองอมขาว (ตารางที่ 4, ภาพที่ 15) ส่วนลักษณะของไอโซเลท PP03 พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดของ macroconidia ที่  $12.5-25.6 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-5 และ โคลโคนีเป็นสีม่วง ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับการรายงานของ Chandran and Reddi (2012) ส่วน PP03 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ APDA มีขนาดของ macroconidia ที่  $12.4-24.5 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-5 และ โคลโคนีเป็นสีม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA มีขนาดของ macroconidia ที่  $15.3-20.7 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-4 และ โคลโคนีเป็นสีขาว และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SNA มีขนาดของ macroconidia ที่  $19.7-31.9 \mu\text{m}$  โดยมีผนังกัน 3-5 และ โคลโคนีเป็นสีขาว (ตารางที่ 4, ภาพที่ 15) ส่วนการตรวจสอบลักษณะของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง ตัวอย่างจากอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า เป็นเชื้อราในกลุ่ม *Sclerotium* sp. โดยมีเม็ด sclerotium และเมื่อส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ clamp connection (ภาพที่ 16) จากการศึกษาของ Watanabe (2002) พบว่า เชื้อรา *Sclerotium rolfii* Sacc มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีขาวฟูคล้ายสำลี มีผนังกันและบาง โดยมีการสร้าง clamp connection ขึ้นมายึดเกาะเชื่อมโยงเพื่อขยายเส้นใย เส้นใยเชื้อรามีการพัฒนาเส้นใยกลายเป็นเม็ด sclerotium สีน้ำตาล ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03

ไอโซเลท	อาหารเลี้ยงเชื้อ <sup>a</sup>	Macroconidia			ลักษณะของโคโลนี	
		ยาว (µm)	กว้าง (µm)	จำนวนผนังกัน	โคโลนี	เส้นใยผิวหน้า
CP01	PDA	23.5 – 30.9	5.6 – 14.5	3 - 7	สีเหลืองอ่อน	สีส้มอ่อน
	APDA	21.0 – 29.2	6.1 – 11.8	3 - 6	สีเหลืองอ่อน	สีขาว
	YMA	18.6 – 30.6	5.4 – 12.8	3 - 5	สีเหลืองอ่อน	สีส้มอ่อน
	SNA	19.0 – 28.2	5.1 – 12.7	3 - 7	สีเหลืองอ่อน	สีขาว
PP03	PDA	12.5 – 25.6	2.6 – 6.6	3 - 5	สีม่วง	สีเหลืองอมม่วง
	APDA	12.4 – 24.5	3.5 – 4.2	3 - 5	สีม่วง	สีเหลืองอมม่วง
	YMA	15.3 – 20.7	3.8 – 6.7	3 - 4	สีขาว	สีขาว
	SNA	19.7 – 31.9	3.3 – 4.7	3 - 5	สีขาว	สีขาว

<sup>a</sup> อาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด ได้แก่

Potato Dextrose Agar (PDA)

Acidified Potato Dextrose Agar (APDA)

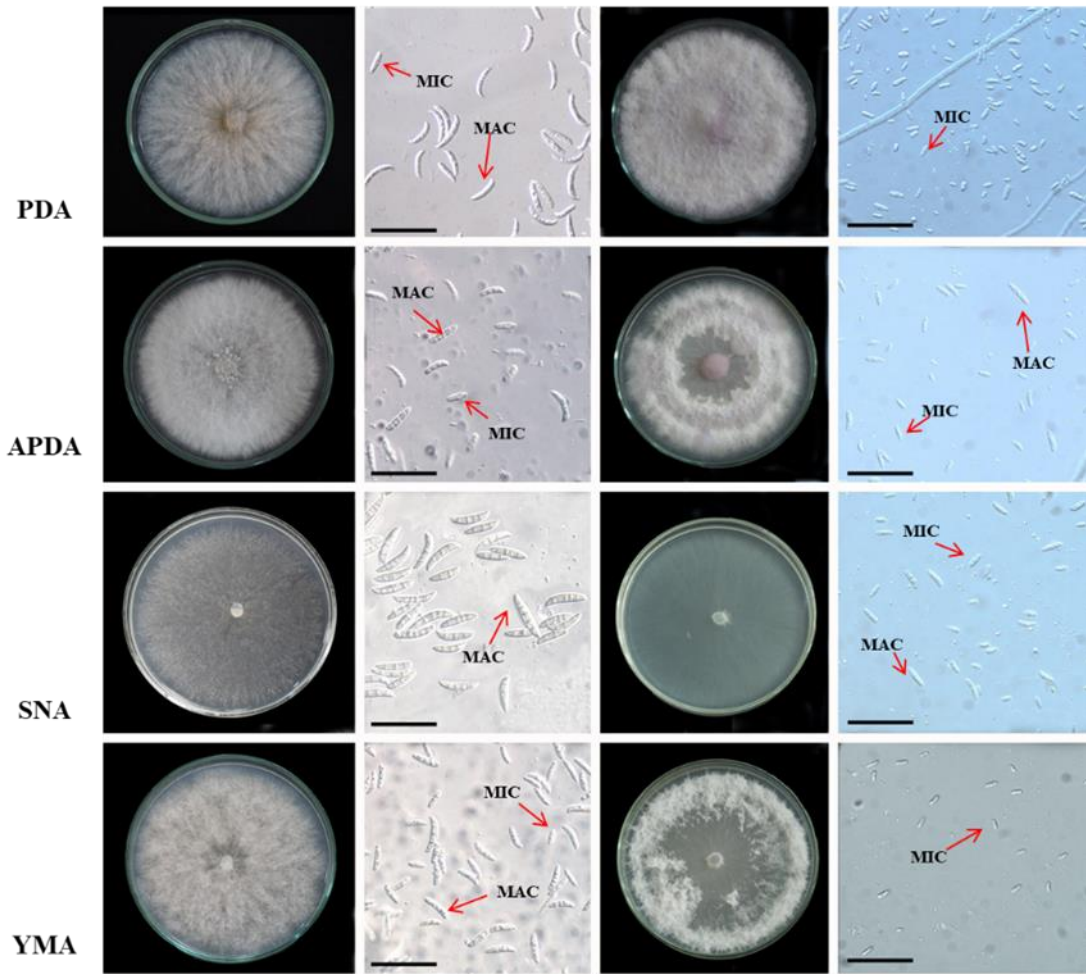
Yeast Malt Agar (YMA)

Synthetic Nutrient Deficient Agar (SNA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

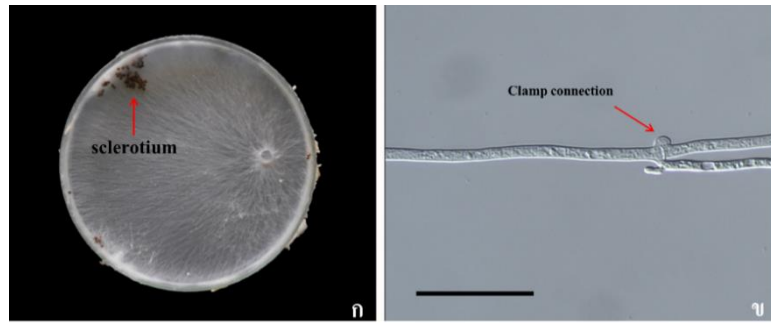
ไอโซเลต CP01

ไอโซเลต PP03



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลต CP01 และ *Fusarium* sp. ไอโซเลต PP03 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน (bar = 20  $\mu$ m) (MIC = microconidia, MAC = macroconidia)

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



ภาพที่ 16 ลักษณะของเชื้อรา *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่า (tuber rot) ของมันฝรั่ง ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา

ข. ลักษณะ clamp connection ของเชื้อรา (bar = 20 µm)

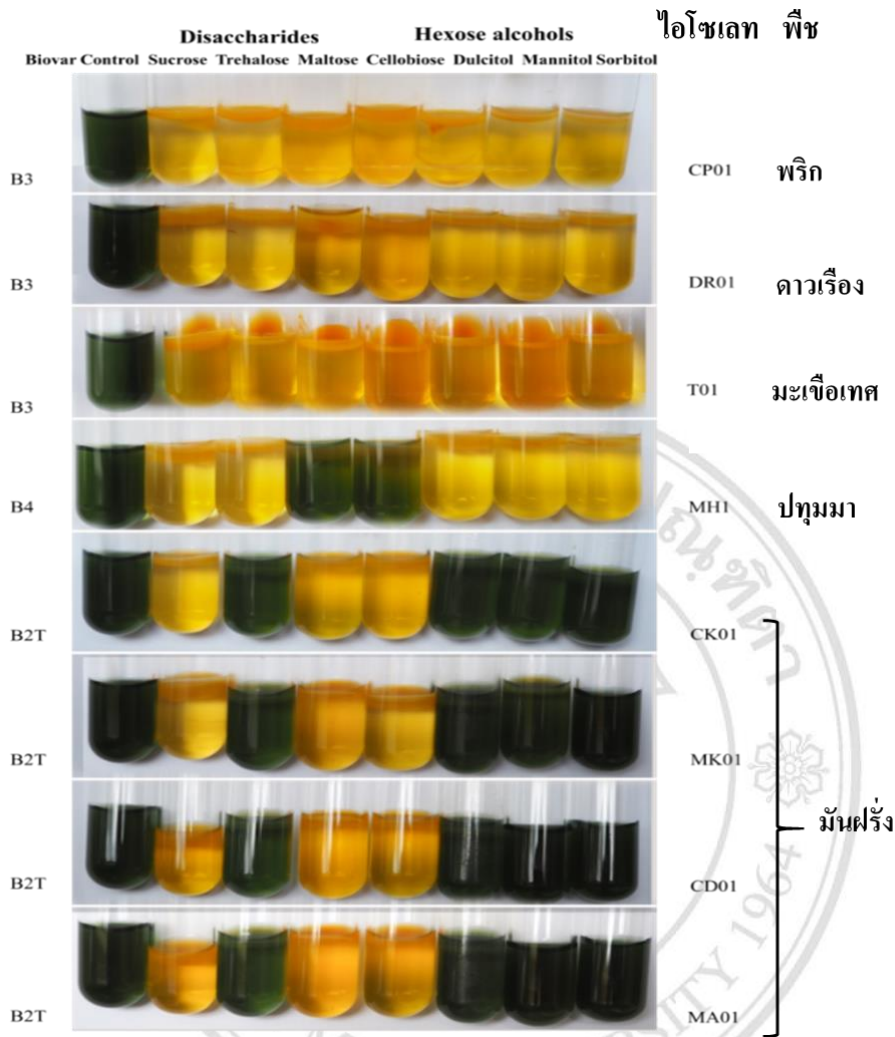
### 3.2. การทดสอบไบโอวาร (biovar) ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

จากการจำแนกไบโอวาร โดยอาศัยความสามารถในการใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ และ น้ำตาลแอลกอฮอล์ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 4 ไอโซเลทที่แยกจากมันฝรั่งนั้นไม่สามารถ ใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ คือ คัลซิทอล แมนนิทอล และ ซอร์บิทอล และน้ำตาลไคแซคคาไรด์ คือ ทรีฮาโลส ได้ แต่สามารถใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ที่เป็น มอลโทส และ เซลโลไบโอส จึงจัดอยู่ใน ไบโอวาร 2T ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Xu *et al.* (2009) พบว่า เชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง 12 ไอโซเลท ที่แยกจากมันฝรั่งในพื้นที่ประเทศจีน ถูกจัดอยู่ใน ไบโอวาร 2 และอีก 5 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในไบโอวาร 3 และยังคงสอดคล้องกับการรายงานของ Thano and Akarapisan (2018) ที่พบว่า เชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากมันฝรั่งในอำเภอ ผาง จังหวัดเชียงใหม่ จัดอยู่ในไบโอวาร 2T โดยไม่สามารถใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ คือ คัลซิทอล แมนนิทอล และ ซอร์บิทอล และน้ำตาลไคแซคคาไรด์ คือ ทรีฮาโลส ได้ แต่สามารถใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ที่เป็น มอลโทส และ เซลโลไบโอส นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกจากปทุมมา จัดอยู่ในไบโอวาร 4 ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ ได้แก่ คัลซิทอล แมนนิทอล และ ซอร์บิทอลได้ โดยเมื่อเลี้ยงลงไปในอาหารที่ใช้ทดสอบ เมื่อเชื้อเจริญทำให้อาหารเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเขียว เป็นสี เหลือง เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวจากพริก ไอโซเลท C01 มะเขือเทศ ไอโซเลท T01 และดาวเรือง ไอโซเลท DR01 สามารถใช้ได้ทั้ง น้ำตาลแอลกอฮอล์ คือ คัลซิทอล แมนนิทอล และ ซอร์บิทอล และน้ำตาลไคแซคคาไรด์ คือ ทรีฮาโลส มอลโทส และ เซลโลไบโอส จึงจัดอยู่ในไบโอวาร 3 (ตารางที่ 5, ภาพที่ 17)

ตารางที่ 5 การจำแนกไบโอวารของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง และพืชอาศัยอื่น

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	น้ำตาล						
		ซูโครส	ทรีฮาโลส	มอลโทส	เซลโลไบโอส	คัลซิทอล	แมนนิทอล	ซอร์บิทอล
พริก C01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	+	+	+	+	+
ดาวเรือง DR01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	+	+	+	+	+
มะเขือเทศ T01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	+	+	+	+	+
ปทุมมา MH01	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	+	+	-	-	+	+	+
มันฝรั่ง CK01	อ. ไชยปราการ จ. เชียงใหม่	+	-	+	+	-	-	-
มันฝรั่ง MK01	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	+	-	+	+	-	-	-
มันฝรั่ง CD01	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	+	-	+	+	-	-	-
มันฝรั่ง MA01	อ. แม่อาฮ จ. เชียงใหม่	+	-	+	+	-	-	-

\* หมายถึง -; ไม่เกิดปฏิกิริยา, +; เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 17 การจำแนกไบโอวาร์ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวหรือเน่าสีน้ำตาลของ มันฝรั่ง และพืชอาศัยอื่น  
 B2T = ไบโอวาร์ 2T ไม่ใช่ทั้งน้ำตาลไคแซคคาไรด์ ชนิด ทรีฮาโลส และน้ำตาลแอลกอฮอล์ แต่ใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ชนิด มอลโทส และ เซลโลไบโอส  
 B3 = ไบโอวาร์ 3 ใช้ทั้งน้ำตาลไคแซคคาไรด์ และน้ำตาลแอลกอฮอล์  
 B4 = ไบโอวาร์ 4 ไม่ใช่ทั้งน้ำตาลไคแซคคาไรด์ชนิด มอลโทส และ เซลโลไบโอส แต่ใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ทุกชนิด และใช้น้ำตาลไคแซคคาไรด์ชนิด ทรีฮาโลส

### 3.3. การจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

#### 3.3.1. การจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS1 และ ITS4

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Fusarium* sp. ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท CP01 และ PP03 โดยเทียบกับ ribosomal ITS region sequence ของ AJ491292, LC384879, AJ491293, MH865875, MH854778, MH864013, EU326202, AJ853769, X94173, KC709665, KR052812, JF817294, JF817283, MH864972, MH858189, MH855482, KP265344, KP295503, LN864520, AY043469, DQ164843, AY043477 และ KU933356 จาก National center for Biotechnology Information (NCBI) database โดยใช้ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ตารางที่ 6) พบว่า ไอโซเลท CP01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Fusarium graminearum* (AJ491292, LC384879, AJ491293 และ MH865875) และ ไอโซเลท PP03 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Fusarium solani* (LN864520, AY043469, DQ164843 และ AY043477) (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 6 *Fusarium* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

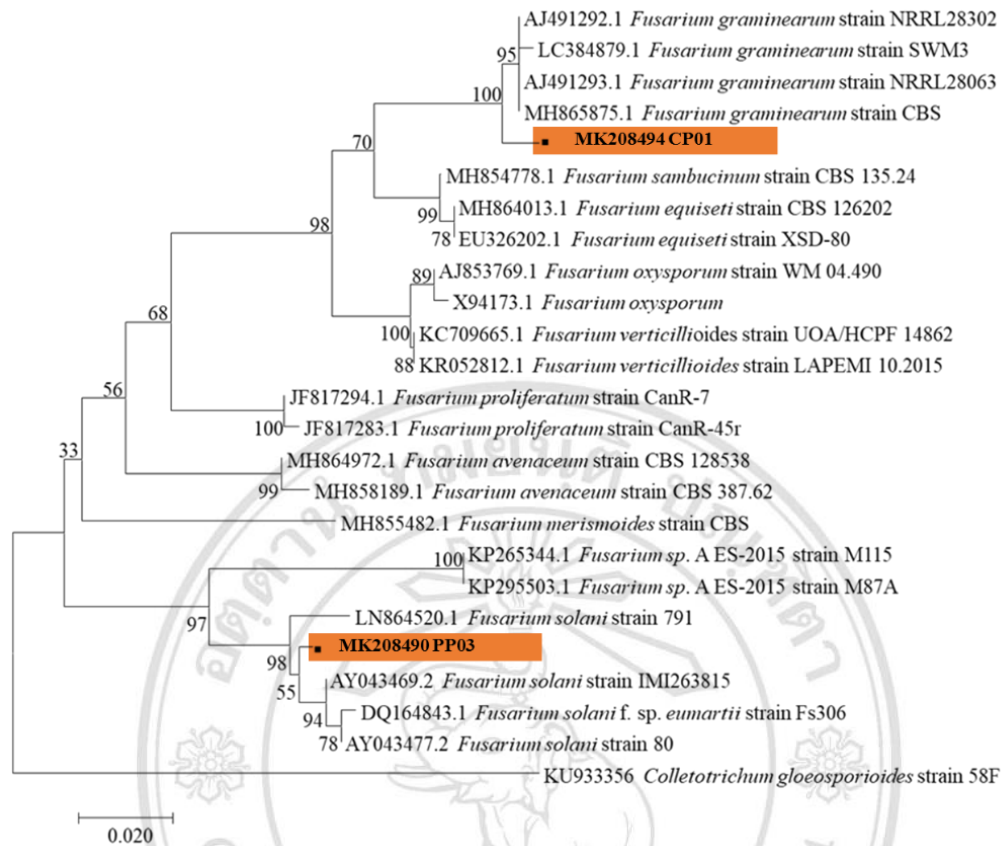
ลำดับ	ITS identification	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	Strain	Accession No. <sup>a</sup>
1	<i>F. graminearum</i>	Potato	Thailand	CP01	MK208494
2	<i>F. graminearum</i>	Potato	Thailand	PP03	MK208490
3	<i>F. graminearum</i>	Wheat head	Japan	NRRL28302	AJ491292
4	<i>F. graminearum</i>	no data	no data	SWM3	LC384879
5	<i>F. graminearum</i>	Maize	USA	NRRL28063	AJ491293
6	<i>F. graminearum</i>	no data	no data	CBS	MH865875
7	<i>F. sambucinum</i>	no data	no data	CBS135	MH854778
8	<i>F. equiseti</i>	no data	no data	CBS126202	MH864013
9	<i>F. equiseti</i>	no data	China	XSD-80	EU326202
10	<i>F. oxysporum</i>	no data	Australia	WM04	AJ853769
11	<i>F. oxysporum</i>	no data	no data		X94173
12	<i>F. verticillioides</i>	no data	Greece	UAO/HCPF14862	KC709665

ตารางที่ 6 *Fusarium* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (ต่อ 1)

ลำดับ	ITS identification	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	Strain	Accession No. <sup>a</sup>
13	<i>F. verticillioides</i>	no data	Brazil	LAPEMI10.2015	KR052812
14	<i>F. proliferatum</i>	Oilseed rape	China	CanR-7	JF817294
15	<i>F. proliferatum</i>	Oilseed rape	China	CanR-45r	JF817283
16	<i>F. avenaceum</i>	no data	no data	CBS128538	MH864972
17	<i>F. avenaceum</i>	no data	no data	CBS387.62	MH858189
18	<i>F. merismoides</i>	no data	no data	CBS	MH855482
19	<i>Fusarium</i> sp.	Potato	Poland	M115	KP265344
20	<i>Fusarium</i> sp.	Potato	Poland	M87A	KP295503
21	<i>F. solani</i>	no data	Pakistan	791	LN864520
22	<i>F. solani</i>	Potato	Brazil	IMI263815	AY043469
23	<i>F. solani</i> f.sp. <i>eumartii</i>	Potato	California	Fs306	DQ164843
24	<i>F. solani</i>	Potato	Brazil	80	AY043477
25	<i>C. gloeosporioides</i>	Carambola	India	58F	KU933356

<sup>a</sup>reference ของ sequence จาก Tan and Niessen (2003); Vu *et al.* (2019); Waalwijk *et al.* (1996); Zhang *et al.* (2014); Stefanczyk *et al.* (2016); Romberg and Davis (2007)

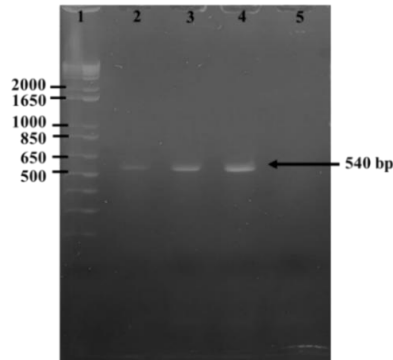
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



ภาพที่ 18 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท CP01 และ PP03 ด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ internal transcribed spacer gene ค่า Bootstrap 1000 ด้วย โปรแกรม MEGA 7

### 3.3.2. การจัดจำแนกเชื้อรา *Sclerotium* sp. สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับชนิดของเชื้อราสาเหตุ

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC01 ที่แยกได้จากตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ เทียบกับ *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC02 จากหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการหัวเน่าภายในแปลงปลูกของอำเภอ ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และ *Sclerotium rofsii* ไอโซเลท SCL1 จากตัวอย่างของกล้วยไม้นางอ้ว ที่ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ไพรเมอร์ SCR-F และ SCR-R พบแถบ DNA ขนาด 540 bp ที่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อรา *S. rofsii* (ภาพที่ 19) สอดคล้องกับการรายงานของ Jeeva *et al.* (2010) ว่าหากคือ เชื้อรา *S. rofsii* จะพบแถบขนาดของ DNA ปรากฏที่ 540 bp แต่หากใช้ ITS1 และ ITS4 จะปรากฏขนาดของแถบ DNA ที่ 643 bp



ภาพที่ 19 การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ specific primers SCR-R /SCR-F จากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* แสดงแถบของ DNA ที่ปริมาณขนาด 540 bp ใน 1.25% agarose gel ด้วยวิธี gel electrophoresis

Lane 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA ladder

Lane 2: *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC01 แยกจากหัวพืชมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคหัวเน่า อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

Lane 3: *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC02 แยกจากหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการหัวเน่าภายในแปลงปลูกของอำเภอ ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

Lane 4: *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SCL1 จากตัวอย่างของกล้วยไม้นางอ้ว ที่ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการ โรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Lane 5: น้ำกลั่น (blank control)

### 3.3.3. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S

#### rRNA

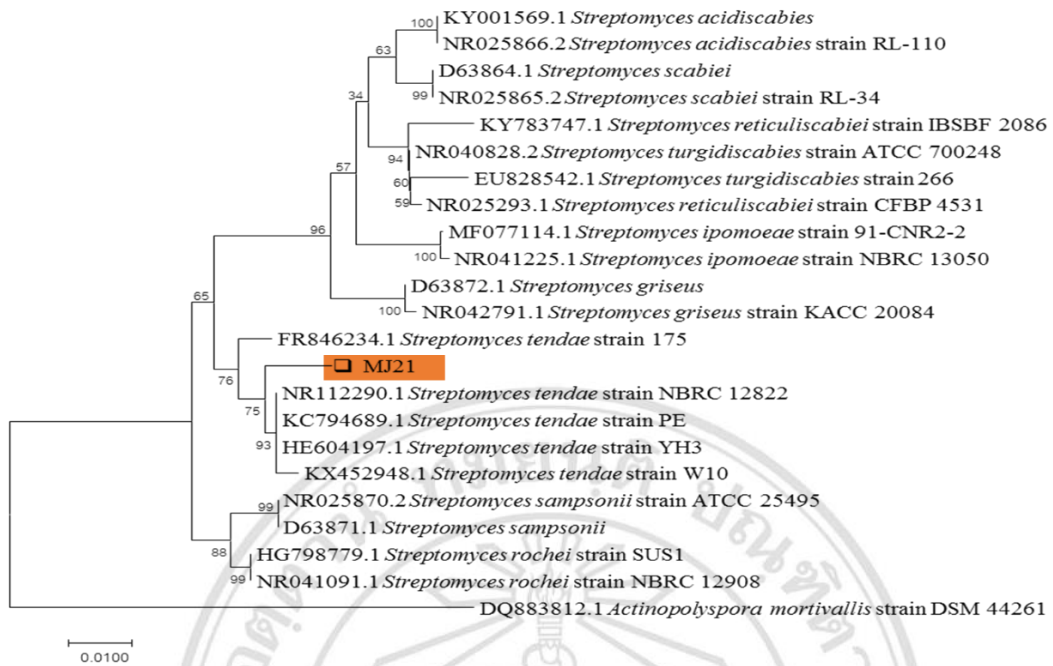
จากการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท MJ21 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีน 16S rRNA ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 7 แบบ neighbor-joining tree เทียบกับ *Streptomyces* sp. (KY001569.1, NR025866.2, D63864.1, NR025865.2, KY783747.1, NR040828.2, EU828542.1, NR025293.1, MF077114.1, NR041225.1, D63872.1, NR042791.1, NR112290.1, KC794689.1, HE604197.1, D63873, KX452948.1, NR025870.2, D63871.1, HG798779.1, DQ883812.1 และ NR041091.1) (ตารางที่ 7) พบว่า แบคทีเรียสาเหตุ ไอโซเลท MJ21 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendae* สายพันธุ์ W10, PE และ NBRC 12822 ตามลำดับ (ภาพที่ 20) ซึ่งจากรายงานของ Takeuchi et al. (1996) ว่าเชื้อ *Streptomyces* species สาเหตุโรคจี้กลาก (scab) มีเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces scabies* และ *Streptomyces acidiscabies* เป็นกลุ่มเชื้อสาเหตุที่รุนแรง ในขณะที่

*Streptomyces setonii*, *Streptomyces grikeus*, *Streptomyces tendae* และ *Streptomyces aureofaciens* เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่มีความรุนแรงน้อยกว่า *S. scabiei* และ *S. acidiscabies*

ตารางที่ 7 *Streptomyces* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ลำดับ	<i>Streptomyces</i> species	Strain	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	Accession No. <sup>a</sup>
1.	<i>S. acidiscabies</i>		potato tuber	Mexico	KY001569.1
2.	<i>S. acidiscabies</i>	RL-110	potato scab	no data	NR025866.2
3.	<i>S. scabiei</i>		potato scab	no data	D63864.1
4.	<i>S. scabiei</i>	RL-34	potato scab	no data	NR025865.2
5.	<i>S. reticuliscabiei</i>	IBSBF 2086	Potato tuber	France	KY783747.1
6.	<i>S. turgidiscabies</i>	ATCC 700248	potato scab	no data	NR040828.2
7.	<i>S. turgidiscabies</i>	266	potato scab lesion	no data	EU828542.1
8.	<i>S. reticuliscabiei</i>	CFBP 4531	no data	no data	NR025293.1
9.	<i>S. ipomoeae</i>	91-CNR2-2	no data	no data	MF077114.1
10.	<i>S. ipomoeae</i>	NBRC 13050	no data	no data	NR041225.1
11.	<i>S. griseus</i>		potato scab	no data	D63872.1
12.	<i>S. griseus</i>	KACC 20084	no data	no data	NR042791.1
13.	<i>S. tendae</i>	NBRC 12822	no data	no data	NR112290.1
14.	<i>S. tendae</i>	PE	no data	no data	KC794689.1
15.	<i>S. tendae</i>	YH3	soil	no data	HE604197.1
16.	<i>S. tendae</i>		potato scab	no data	D63873
17.	<i>S. tendae</i>	W10	soil	Tunisia	KX452948.1
18.	<i>S. sampsonii</i>	ATCC 25495	no data	no data	NR025870.2
19.	<i>S. sampsonii</i>		no data	no data	D63871.1
20.	<i>S. rochei</i>	SUS1	no data	no data	HG798779.1
21.	<i>S. rochei</i>	NBRC 12908	no data	no data	NR041091.1

<sup>a</sup> reference จาก Takeuchi *et al.* (1996); Lambert and Loria (1989); Lee *et al.* (1985); Lehtonen *et al.* (2004); Bouček-Mechiche *et al.* (2000); Li (2017); Gherbawy *et al.* (2012)



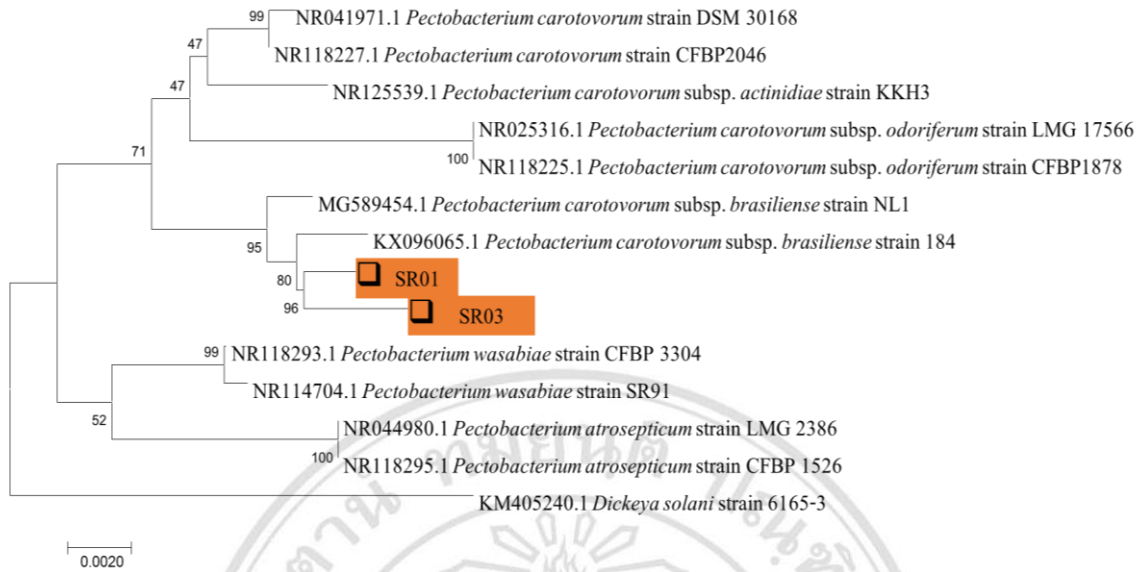
ภาพที่ 20 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจักกลาก (scab) ไอโซเลท MJ21 ค่า Bootstrap 1000 ด้วย โปรแกรม MEGA 7

ส่วนการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *Pectobacterium* sp. ไอโซเลท SR01 และ SR03 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีน 16S rRNA ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 7 แบบ neighbor-joining tree เทียบกับ NR118227, NR041971, NR125539, NR118225, NR025316, MG589454, KX096065, NR118295, NR044980, NR114704, NR118293 และ NM405240 (ตารางที่ 8) พบว่าไอโซเลท SR01 และ SR03 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* (ภาพที่ 21) ซึ่งจากการรายงานของ Van der Wolf *et al.* (2016) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basiliense* เป็นเชื้อสาเหตุโรคแฉ่งดำที่รุนแรงของมันฝรั่ง เมื่อเทียบกับเชื้อ *Dikeya dianthicola*, *D. solani*, *P. atrosepticum* และ *P. wasabiae* โดยเชื้อ *P. carotovorum* subsp. *basiliense* มีการระบาดของโรคในแปลงสูงถึง 75–95 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานของ Nunes *et al.* (2015) พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basiliense* เป็นเชื้อสาเหตุโรคแฉ่งดำของมันฝรั่งที่พบแพร่ระบาดครั้งแรกในปี 2012 ในประเทศเบลเยียม และเนเธอร์แลนด์

ตารางที่ 8 *Pectobacterium* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ และไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ลำดับ	<i>Pectobacterium</i> species	Strain	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	Accession No.
1.	<i>P. carotovorum</i>	CFBP2046	no data	no data	NR118227.1
2.	<i>P. carotovorum</i>	DSM 30168	no data	no data	NR041971
3.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>actinidiae</i>	KKH3	kiwifruit	no data	NR125539
4.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	CFBP1878	no data	no data	NR118225
5.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	LMG 17566	no data	no data	NR025316
6.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	NL1	no data	no data	MG589454.1
7.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	184	no data	no data	KX096065.1
8.	<i>P. atrosepticum</i>	CFBP 1526	no data	no data	NR118295.1
9.	<i>P. atrosepticum</i>	LMG 2386	no data	no data	NR044980.1
10.	<i>P. wasabiae</i>	SR91	no data	no data	NR114704.1
11.	<i>P. wasabiae</i>	CFBP 3304	no data	no data	NR118293.1
12.	<i>D. solani</i>	6165-3	hyacinthus	Netherlands	KM405240.1

<sup>a</sup>reference จาก Nabhan *et al.* (2012); Sproer *et al.* (1999); Koh *et al.* (2012); Hauben *et al.* (1998); Chen *et al.* (2015)

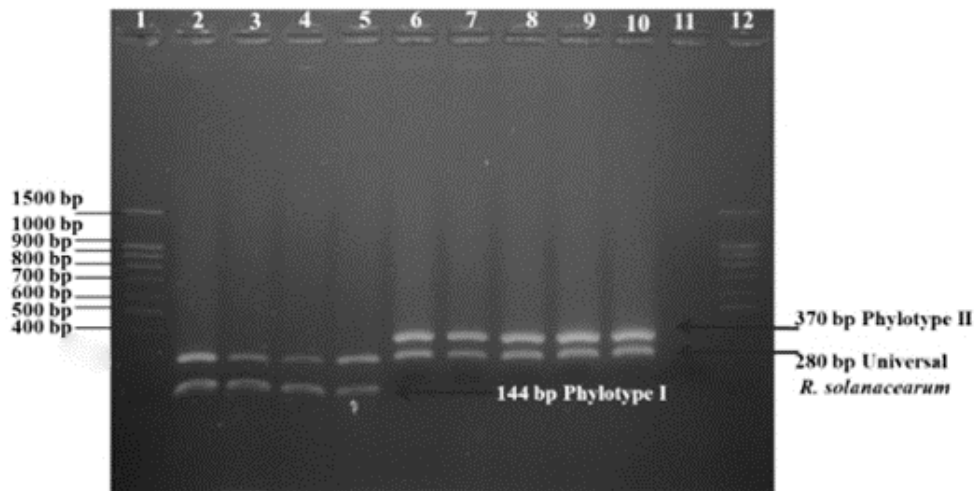


ภาพที่ 21 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและ (soft rot) ไอโซเลท SR01 และ SR03 ค่า Bootstrap 1000 ด้วย โปรแกรม MEGA 7

### 3.3.4. การจัดจำแนก Phylotype ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค Phylotype-specific multiplex PCR (Pmx-PCR)

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและของมันฝรั่งทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ MK01, CD01, CK01 และ MA01 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและของพืชชนิดอื่น ได้แก่ MH01, DR01, T01 และ C01 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (759R/760F) กับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ร่วมกับ ไพรเมอร์อีก 5 เส้น พบว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทุกไอโซเลทปรากฏแถบ DNA ที่ขนาด 280 bp และเมื่อจำแนก phylotype ของเชื้อด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท MK01, CD01, CK01 และ MA01 ที่แยกจากมันฝรั่ง จัดอยู่ใน phylotype II ซึ่งปรากฏแถบ DNA ที่ขนาด 372 bp ส่วนไอโซเลท MH01 ที่แยกจากปทุมมา DR01 ที่แยกจากดาวเรือง T01 ที่แยกจากมะเขือเทศ และ C01 ที่แยกจากพริก จัดอยู่ใน phylotype I ซึ่งปรากฏแถบ DNA ที่ขนาด 144 bp (ภาพที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sagar *et al.* (2013) ที่ศึกษาเกี่ยวกับโรคน้ำและของมันฝรั่งในอินเดียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* phylotype I, II และ IV พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 759R/760F พบแถบ DNA ขนาด 280 bp ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* และสอดคล้องกับการรายงานของ Cellier and Prior (2010) ที่ทำการสำรวจ phylotype ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคน้ำและในพืช

อื่นๆ พบว่า strain ที่แยกได้จากมันฝรั่ง ในประเทศเคนยา บราซิล อียิปต์ เปรู เนเธอร์แลนด์ แอฟริกาใต้ และโปรตุเกส จัดอยู่ใน phylotype II



ภาพที่ 22 การจัดกลุ่ม phylotype โดยเทคนิค PCR

Phylotype I ของ *R. solanacearum* amplified ~144 bp และ ~280 bp ตามลำดับ

Phylotype II ของ *R. solanacearum* amplified ~370 bp และ ~280 bp ตามลำดับ

Phylotype III ของ *R. solanacearum* amplified ~91 bp และ ~280 bp ตามลำดับ

Phylotype IV ของ *R. solanacearum* amplified ~213 bp และ ~280 bp ตามลำดับ

Lane 1: 1 Kb Plus DNA Ladder

Lane 2: *R. solanacearum* ไอโซเลทจากปทุมมา (MH01)

Lane 3: *R. solanacearum* ไอโซเลทจากดาวเรือง (DR01)

Lane 4: *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมะเขือเทศ (T01)

Lane 5: *R. solanacearum* ไอโซเลทจากพริก (C01)

Lane 6 - 10: *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง (P01, CD01, MK1, MA01 และ CK01)

Lane 11: น้ำกลั่น (blank control)

Lane 12: 1 Kb Plus DNA Ladder

### 3.3.5. การจัดจำแนก sequevar ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

การจัดจำแนก sequevar ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาหรือโรคน้ำตาลของมันฝรั่งทั้ง 4 ไอโซเลท จัดอยู่ใน sequevar I ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ CIP117 และ CFBP3858 โดย Fegan and Prior (2005) ได้จัดจำแนกแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ CFBP3858 และ CIP117 อยู่ใน sequevar I ที่เข้าทำลายมันฝรั่ง และสอดคล้องกับการรายงานของ Santiago *et al.* (2017) พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศบราซิลนั้นมีถึง 8 sequevar ได้แก่ 1, 7, 28, 50, 54, 55, 56 และ 57 และ 2 ไบโอมาร์ ได้แก่ ไบโอมาร์ 1 และ 2 โดยพบว่าส่วนใหญ่เชื้อ *R. solanacearum* จะอยู่ในกลุ่มของไบโอมาร์ 2 และจากการรายงานของ Cellier *et al.* (2012) พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง strain CFBP4787 และ CFBP3785 ที่เข้าทำลายในประเทศโปรตุเกส และ strain JT516, LNPV28.23 และ JQ1006 ที่เข้าทำลายในเกาะ La Réunion จัดอยู่ใน sequevar 1 และ phylotype IIB ส่วนเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง strain CFBP3879 ที่เข้าทำลายในประเทศโคลอมเบีย (Colombia) นั้นจัดอยู่ใน sequevar 2 และ phylotype IIB เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกจาก มะเขือเปราะ ไอโซเลท E01 และมะเขือเทศไอโซเลท TL1 จัดอยู่ใน sequevar 15 (ภาพที่ 23 และ 24) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Waki *et al.* (2013) ที่พบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* strain PSS4, PSS81, PSS219, PSS358 และ PSS366 เข้าทำลายในมะเขือเทศ ในประเทศไต้หวัน จัดอยู่ใน sequevar 15, 14, 34, 15 และ 15 ตามลำดับ และ Kyaw *et al.* 2017 พบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* sequevar 15 เข้าทำลายมะเขือเทศ และพริก ในประเทศพม่า ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท C01 ที่แยกจากพริก จัดอยู่ใน sequevar 13 เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากมะเขือเทศไอโซเลท T01 และมันฝรั่ง ไอโซเลท P01 นั้นจัดอยู่ใน sequevar 17 และ 1 ตามลำดับ โดยที่ Liu *et al.* (2017) และ Xu *et al.* (2009) ได้รายงานไว้ว่าพบแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่จัดอยู่ใน sequevar 17 เข้าทำลาย ยาสูบ และถั่วลิสงได้

Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตารางที่ 9 *Ralstonia solanacearum* ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลตอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ลำดับ sequence	ไอโซเลต <sup>a</sup>	แหล่งที่มา	พืชอาศัย	PCR 759R/760F	Biovar	Phylotype/Sequevar determined by		GeneBank accession number <sup>b</sup>
						PCR	<i>egl</i> -tree	
1.	MH2	Chiang Mai, Thailand	Patumma	+	4	I	48	MG136849
2.	SS1	Chiang Mai, Thailand	Patumma	+	4	I	48	MG136850
3.	E01	Chiang Mai, Thailand	brinjal	+	4	I	15	MG136854
4.	C01	Chiang Mai, Thailand	chili	+	3	I	13	MG136851
5.	T01	Chiang Mai, Thailand	tomato	+	3	I	17	MG136852
6.	TL1	Laos	tomato	+	1	I	15	MG136853
7.	P01	Chiang Mai, Thailand	potato	+	2T	II	1	MG136855
8.	CFBP3858	Netherlands	potato		2	II	1	AF295259 (2)
9.	CIP117	Nigeria	potato		2	II	1	JF702301 (2)
10.	CFBP1183	Costa Rica	<i>Heliconia</i>		1	II	3	EF371805 (2)
11.	UW181	Venezuela	plantain		1	II	6	KU708075 (2)
12.	ICMP7963	Kenya	potato			II	7	AF295263 (1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตารางที่ 9 *Ralstonia solanacearum* ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลตอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (ต่อ1)

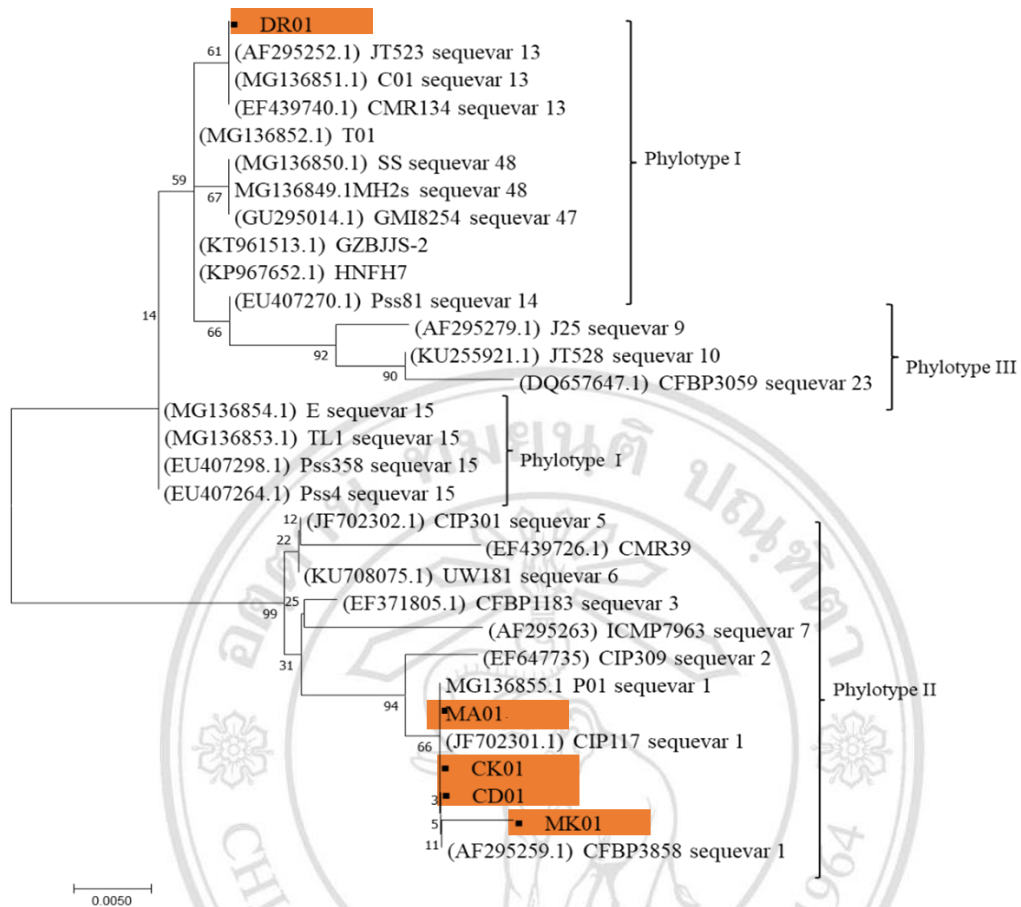
ลำดับ sequence	ไอโซเลต <sup>a</sup>	แหล่งที่มา	พืชอาศัย	PCR 759R/76 0F	Biovar	Phylotype/Sequevar determined by		GeneBank accession number <sup>b</sup>
						PCR	<i>egl</i> -tree	
13.	J25	Kenya	potato			III	9	AF295279 (2)
14.	JT523	Reuion Is.	potato			I	13	AF295252 (1)
15.	CMR134	Cameroon	black huckleberry			I	13	EF439740 (6)
16.	PSS81	Taiwan	tomato		3	I	14	EU407270 (6)
17.	PSS4	Taiwan	tomato			I	15	EU407264 (5)
18.	PSS358	Taiwan	tomato			I	15	EU407298 (6)
19.	GZBJJS-2	China	tobacco			I	17	KT961513 (7)
20.	NCPPB332	Zimbabwe	potato		1	III	21	AF295276 (3)
21.	CFBP3059	Burkina Faso	egg plant		1	III	23	DQ657647 (3)
22.	GMI8254	Indonesia	tomato		-	I	47	GU295014 (6)
23.	HNFH7	China	tobacco		3	I	17	KP967652 (1)
24.	JT528	African	potato			III	9	KU255921 (1)
25.	CIP309	Colombia	potato		2	II	2	EF647735 (1)

ตารางที่ 9 *Ralstonia solanacearum* ที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (ต่อ2)

ลำดับ sequence	ไอโซเลท <sup>a</sup>	แหล่งที่มา	พืชอาศัย	PCR 759R/76 0F	Biovar	Phylotype/Sequevar determined by		GeneBank accession number <sup>b</sup>
						PCR	<i>egl</i> -tree	
26.	RS345	China	pumpkin			I	17	KY594813 (1)
27.	RS362	China	pumpkin			I	17	KY594821 (1)
28.	CFBP2047	United States	tomato		1	II	7	AF295615 (1)
29.	UW469	Brazil	potato		1	II	40	AF295622 (1)
30.	CFBP3858	Netherlands	potato		2	II	1	AF295612 (1)

<sup>a</sup>ชื่อไอโซเลทที่ใช้ในการศึกษานี้ และ ไอโซเลทที่ใช้อ้างอิง

<sup>b</sup> Reference ของ sequevar ในแต่ละสายพันธุ์ จาก Poussier *et al.* (2000); Fegan and Prior (2005); Prior and Fegan (2005); Xu *et al.* (2009); Lebeau *et al.* (2010); Waki *et al.* (2013); Liu *et al.* (2017)



ภาพที่ 23 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ยีน *egl* ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ค่า Bootstrap 1000 ด้วย โปรแกรม MEGA 7

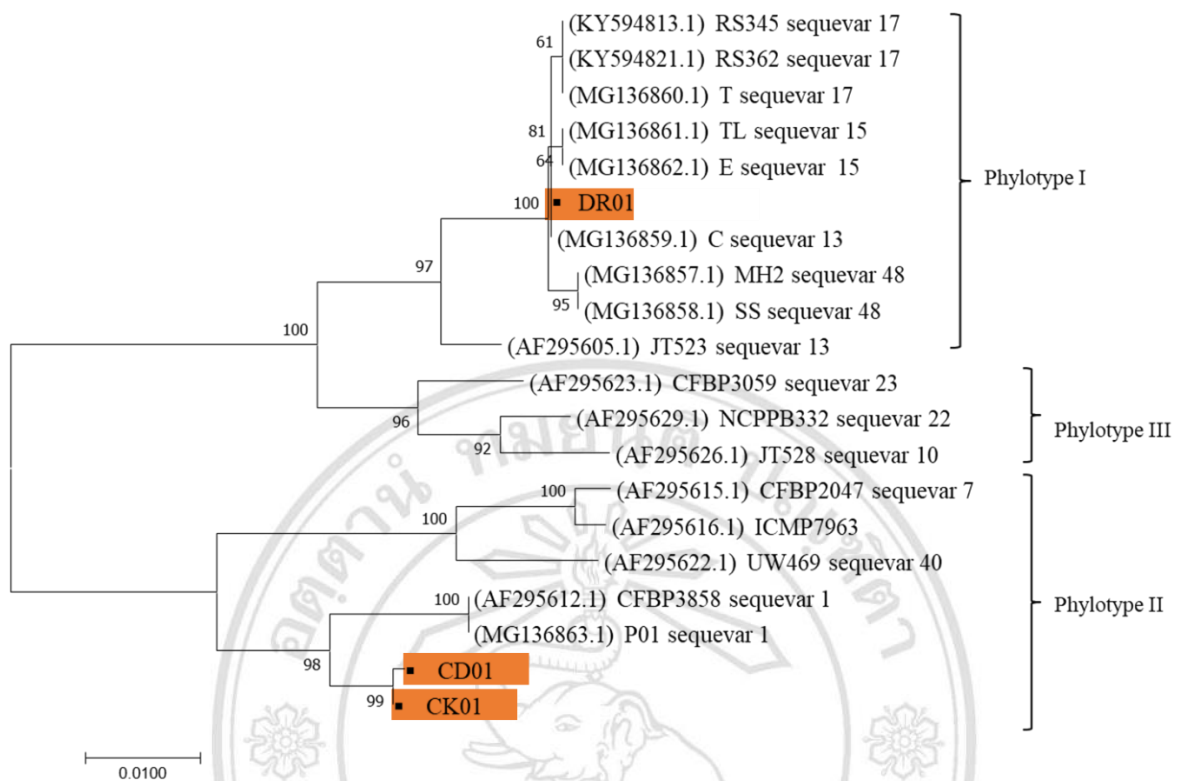
CK01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

CD01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

MK01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

MA01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอแม่เมาะ จังหวัดเชียงใหม่

DR01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากดาวเรือง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 24 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยรูปแบบ neighbor-joining tree โดยใช้ยีน *hrpB* ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ค่า Bootstrap 1000 ด้วย โปรแกรม MEGA 7  
 CK01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่  
 CD01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากมันฝรั่ง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่  
 DR01 = *R. solanacearum* ไอโซเลทจากดาวเรือง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

#### 4. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณดินรอบต้นไผ่ และดินรอบต้นกล้วย อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส ดินบริเวณฝักรากมันฝรั่ง ดินบริเวณรอบรากต้นมันฝรั่ง และดินปลูกลูกมันฝรั่ง จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้วิธี soil dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ King's B สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลท โดย 10 ไอโซเลท จากดินรอบต้นไผ่ และ 12 ไอโซเลท จาก ดินรอบต้นกล้วย ในพื้นที่ อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส 10 ไอโซเลท จากบริเวณฝักรากมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ 26 ไอโซเลท จากดินบริเวณรอบรากมันฝรั่ง และ 25 ไอโซเลท จากดินปลูกลูกมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่แยกได้จากดินดิน ไร่ ดินกล้วย มันฝรั่ง รากมันฝรั่ง และดินปลูกมันฝรั่ง

ไอโซเลท	จำนวน	แหล่งที่มา
SD01 – SD10	10	ดินรอบรากต้น ไร่ อำเภอสุคริพ จังหวัดนครราชสีมา
SB01 – SB12	12	ดินรอบรากต้นกล้วย อำเภอสุคริพ จังหวัดนครราชสีมา
RP01- RP10	10	ดินบริเวณฝักรากของมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่
SRP01 – SRP26	26	ดินรอบรากมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่
SPP01 - SPP25	25	ดินปลูกมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่
รวม	83	

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง

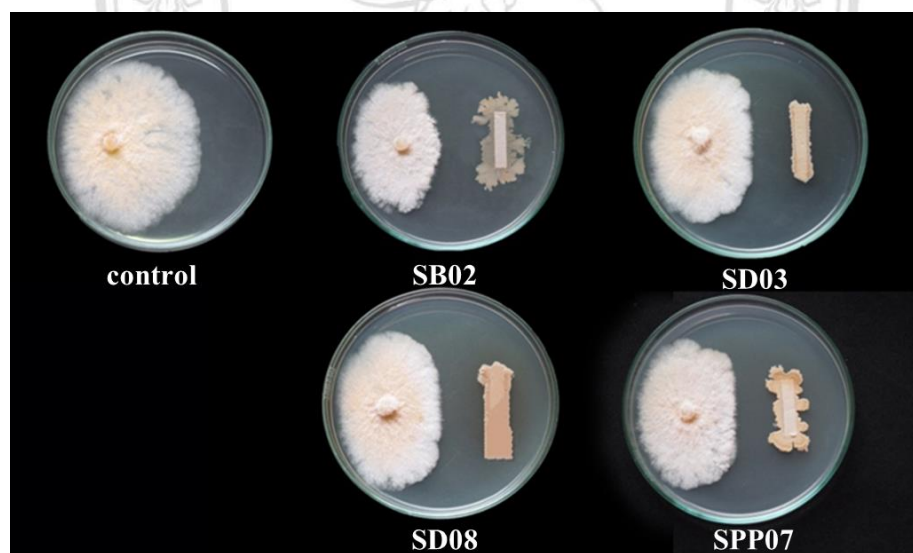
5.1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ

จากแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 83 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณดินรอบต้น ไร่ และดินรอบต้นกล้วย อำเภอสุคริพ จังหวัดนครราชสีมา ดินบริเวณฝักรากมันฝรั่ง ดินบริเวณรอบรากต้นมันฝรั่ง และดินปลูกมันฝรั่ง จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง เบื้องต้นพบว่า มี 13 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ ไอโซเลท SB02, SB04, SD02, SD03, SD04, SD07, SD08, SPP07 SPP08 และ RP01 มี เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญสูงสุดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 57.02, 57.89, 51.75, 53.51, 59.91, 47.37, 57.02, 52.63, 50.88 และ 49.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Mezaache-Aichour *et al.* (2012) ที่ได้ทำการแยกแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์จากดินแปลงปลูกมันฝรั่ง 3 แห่งในประเทศแอลจีเรียแล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *albidenis* เชื้อราสาเหตุโรคทางดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง พบว่า จากแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ 50 ไอโซเลท มี 14 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 92 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์โดยอาศัยความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและแหล่งที่มาที่แตกต่างกันของแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ พบว่า สามารถคัดเลือกเหลือเพียง 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 (ตารางที่ 11, ภาพที่ 25)

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรค dry rot ของมันฝรั่ง

แบคทีเรียปฏิบัณฑ์ ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใย เชื้อรา <i>Fusarium graminearum</i> <sup>1</sup>
SB02	57.02 a <sup>2</sup>
SD03	53.51 a
SD08	57.02 a
SPP07	52.63 a
LSD ( $P=0.05$ )	10.80
CV (%)	10.42

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ, <sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 25 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ต่อเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ด้วยวิธีการ dual culture ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการควบคุมการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง พบว่า ไอโซเลท SB02 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสูงสุดที่ 47.81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท SD03, SD08 และ SPP07 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราที่ 41.77, 41.15 และ 38.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 12, ภาพที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Abeyasinghe (2007) พบว่า *Bacillus subtilis* strain CA32r ที่แยกได้จากดินปลูกพริก มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ในพริกได้ ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง

แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใย เชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> <sup>1</sup>
SB02	47.81 a <sup>2</sup>
SD03	41.77 b
SD08	41.15 c
SPP07	38.48 d
LSD ( $P=0.05$ )	0.2338
CV (%)	0.36

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ, <sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 26 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ต่อเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SC01 บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ด้วยวิธีการ dual culture ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

## 5.2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

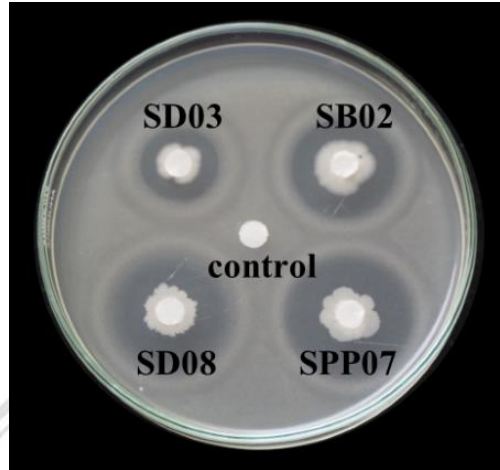
การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคเน่าเน่าของมันฝรั่ง พบว่า แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SD08 และ SPP07 มีรัศมีของความกว้างบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 สูงสุดที่ 12.88 และ 13.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13, ภาพที่ 27) เช่นเดียวกับการทดลองของ Kobayashi *et al.* (2011) ที่ทำการแยกเชื้อปฏิชีวนะ ได้แก่ เชื้อรา เชื้อแอคติโนมัยซิส และแบคทีเรียปฏิชีวนะ ที่แยกจากดินปลูกมันฝรั่ง ต้นมันฝรั่ง และต้นข้าวโอ๊ตป่า จำนวน 345 ไอโซเลท โดยไอโซเลท WoRs-501 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces turgidiscabies* สาเหตุโรคเน่าเน่าของมันฝรั่งที่  $6.4 \pm 0.7$  มิลลิเมตร และสามารถลดความรุนแรงของโรคในสภาพแปลงปลูกได้ที่ 78-91 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานของ Han *et al.* (2005) พบว่า *Bacillus sp. sunhua* มีสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces scabiei* โดยมีรัศมีวงใสในการยับยั้งเชื้อสาเหตุที่ 22.0 มิลลิเมตร

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 4 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคเน่าเน่าของมันฝรั่ง

แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท	รัศมีของความกว้างบริเวณใส <sup>1</sup> (มิลลิเมตร)
SB02	10.75 b
SD03	9.38 c
SD08	12.88 a
SPP07	13.63 a
LSD ( $P=0.05$ )	1.24
CV (%)	6.92

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

<sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 27 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคพืชกลากของมันฝรั่ง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

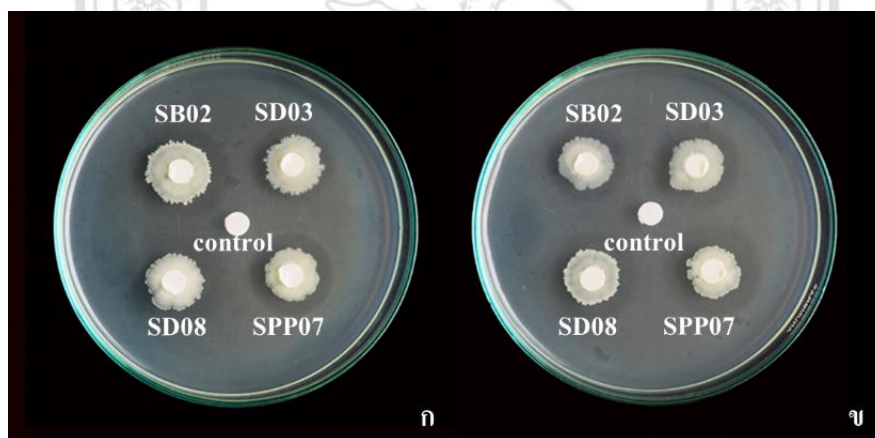
ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basilense* ไอโซเลท SR01 และ SR03 สาเหตุโรคเน่าและหรือแห้งค้ำของ มันฝรั่ง พบว่า แบคทีเรียปฏิบั้กษ์ไอโซเลท SB02 มีรัศมีของความกว้างบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basilense* สูงสุดที่ 7.00 และ 7.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 14, ภาพที่ 28) เช่นเดียวกับการทดลองของ Jafra *et al.* (2006) ที่ได้ทำการแยกแบคทีเรียปฏิบั้กษ์จากดินบริเวณรอบรากของมันฝรั่ง โดยพบว่า แบคทีเรียปฏิบั้กษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* ในระดับห้องปฏิบัติการได้ และมีความสามารถในการสลายสาร (degrade) N-acyl homoserine lactones (AHLs) ที่ผลิตมาจาก เชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* ซึ่งเมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จัดอยู่ใน genus *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Delftia* และจากการรายงานของ Azaiez *et al.* (2018) พบว่า จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนต่างๆของมันฝรั่ง มีแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ 50 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* sp strain III 6 ภายในห้องปฏิบัติการ โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. Amyloliquefaciens* strain Ar10 มีรัศมีความกว้างบริเวณใสยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงสุดที่ 18 มิลลิเมตร

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 4 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR01 และ SR03 สาเหตุโรคแฉ่งดำหรือเน่าและของมันฝรั่ง

แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท	รัศมีของวงกว้างบริเวณใส <sup>1</sup> (มิลลิเมตร)	
	SR01	SR03
SB02	7.00 a	7.50 a
SD03	6.38 ab	5.50 bc
SD08	5.50 b	5.13 c
SPP07	6.75 a	6.75 ab
LSD ( $P=0.05$ )	1.08	1.37
CV (%)	10.98	14.26

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

<sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 28 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* สาเหตุโรคแฉ่งดำหรือเน่าและของมันฝรั่ง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ก. ชุดทดสอบการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR01

ข. ชุดทดสอบการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03

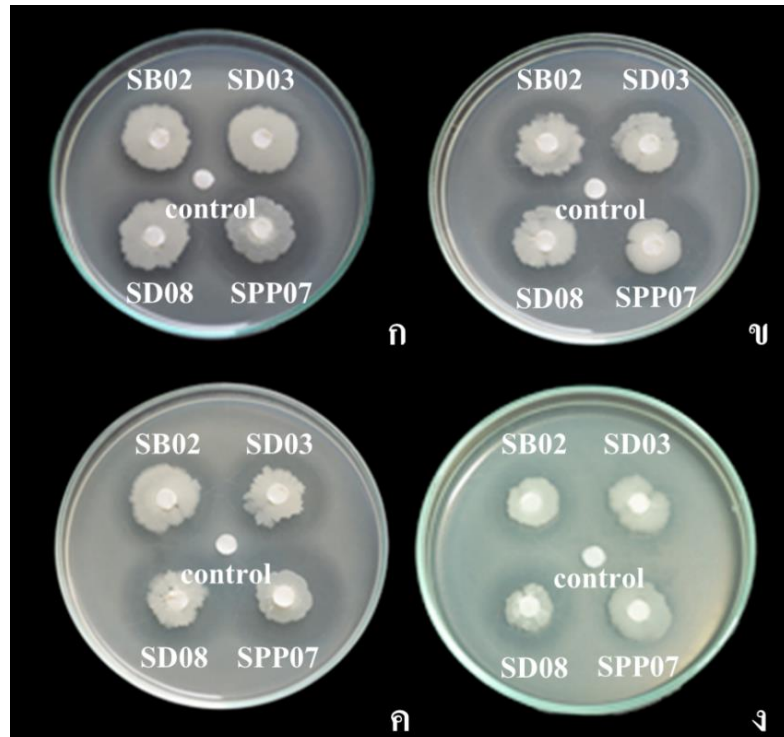
เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01, MA01 และ CD01 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท SPP07 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยมีรัศมีของวงกว้างบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ 8.25, 8.75, 9.88 และ 8.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 15, ภาพที่ 29) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lemessa and Zeller (2007) ที่ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบ ๆ รากของมันฝรั่ง มะเขือเทศ พริก กาแฟ และข้าวโพด ได้ทั้งหมด 118 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้สูงสุด และจาก 6 ไอโซเลท มี 2 ไอโซเลทที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวหรือโรคเน่าสีน้ำตาล ทั้ง 4 ไอโซเลท ของมันฝรั่ง

แบคทีเรียปฏิปักษ์	รัศมีของวงกว้างบริเวณใส <sup>1</sup> (มิลลิเมตร)			
ไอโซเลท	CK01	MK01	MA01	CD01
SB02	6.63 b <sup>2</sup>	6.75 b	7.63 c	6.75 b
SD03	7.13 b	6.88 b	7.88 bc	6.63 b
SD08	7.38 ab	7.00 b	8.63 b	6.381 b
SPP07	8.25 a	8.75 a	9.88 a	8.38 a
LSD ( $P=0.05$ )	0.92	1.15	0.92	1.53
CV (%)	8.16	10.00	7.00	14.11

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

<sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 29 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวหรือหัวเน่าสีน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- ก. ชุดทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01
- ข. ชุดทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท MA01
- ค. ชุดทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท MK01
- ง. ชุดทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท CD01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## 6. การศึกษา และการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

### 6.1. การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่งสูงสุดในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02 มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างกลมรี อยู่ตรงกลางเซลล์ โคโลนิรูปร่างไม่แน่นอน ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย โคโลนิแบนราบไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางนูนขึ้นมา สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างกลมรี อยู่ตรงกลางเซลล์ โคโลนิรูปร่างไม่แน่นอน ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย แบนราบไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางนูนขึ้นมา สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD08 มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างกลมรี อยู่ตรงกลางเซลล์ โคโลนิรูปร่างไม่แน่นอน ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย แบนราบไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางนูนขึ้นมา สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPP07 มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างกลมรี อยู่ตรงกลางเซลล์ โคโลนิรูปร่างกลม ขอบเรียบ โคโลนิหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย สีขาวขุ่น พื้นผิวเรียบ (ตารางที่ 16, ภาพที่ 30)

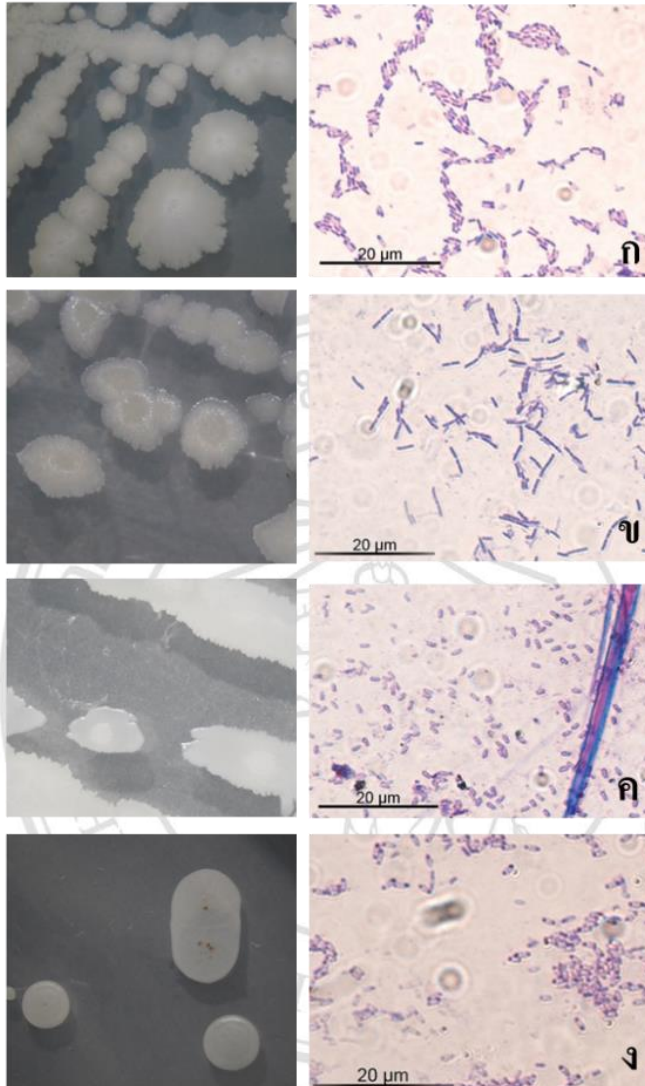
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตารางที่ 16 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรีย ปฏิปักษ์	ลักษณะ เซลล์	การย้อม สีแบบ แกรม	รูปร่าง และ ตำแหน่ง เอนโดสปอร์	ลักษณะโคโลนี
SB02	เป็นท่อน (bacillus)	+	รูปร่างกลมรี ตรงกลางเซลล์	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ขอบ เป็นคลื่น โคนเว้าเล็กน้อย (lobate) แบนราบ (smooth) ไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรง กลางนูนขึ้นมา (umbonate) สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง
SD03	เป็นท่อน (bacillus)	+	รูปร่างกลมรี ตรงกลางเซลล์	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ขอบ เป็นคลื่น โคนเว้าเล็กน้อย (lobate) แบนราบ (smooth) ไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรง กลางนูนขึ้นมา (umbonate) สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง
SD08	เป็นท่อน (bacillus)	+	รูปร่างกลมรี ตรงกลางเซลล์	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ขอบ เป็นคลื่น โคนเว้าเล็กน้อย (lobate) แบนราบ (smooth) ไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรง กลางนูนขึ้นมา (umbonate) สีขาวขุ่น พื้นผิวด้าน และแห้ง
SPP07	เป็นท่อน (bacillus)	+	รูปร่างกลมรี ตรงกลางเซลล์	รูปร่างกลม (circular) ขอบเรียบ (entire) โคโลนีหนาสูง (raised) ขึ้นมาจากผิวหน้า อาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย สีขาวขุ่น พื้นผิว เรียบ

ลักษณะโคโลนี

ลักษณะการย้อมติดสี



ภาพที่ 30 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลต

ก. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SB02

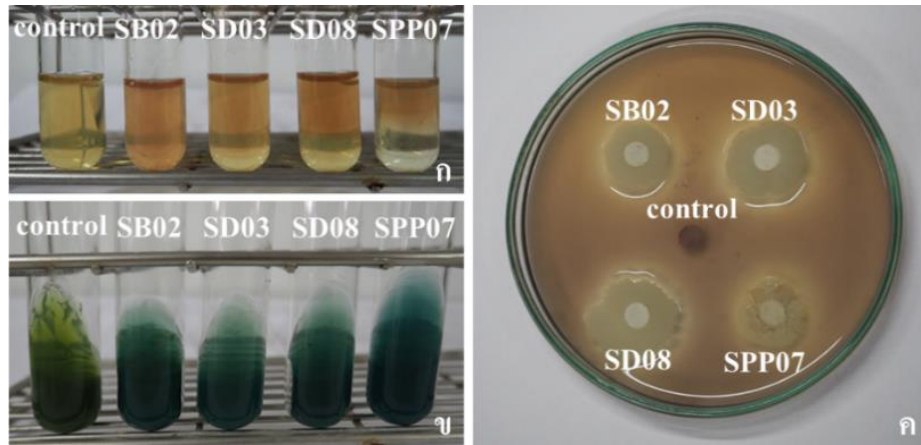
ข. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SD03

ค. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SD08

ง. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SPP07

## 6.2. การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ที่แยกได้จากดินบริเวณดินรอบต้นไม้และดินรอบต้นกล้วย อำเภอสุคริน จังหวัดนราธิวาส ดินบริเวณฝักรากมันฝรั่ง ดินบริเวณรอบรากต้นมันฝรั่ง และดินปลูกมันฝรั่ง จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี มีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 มาศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์บนอาหาร motility test แบคทีเรียปฏิบัณฑ์ทั้ง 4 ไอโซเลทให้ผลบวกโดยเชื้อมีการเจริญกระจายรอบแนว stab และเจริญบนผิวหน้าอาหาร motility agar แสดงให้เห็นว่าสามารถเคลื่อนที่ได้ การทดสอบการย่อยแป้งพบว่า แบคทีเรียปฏิบัณฑ์ทั้ง 4 ไอโซเลทให้ผลบวก โดยทำให้อาหารเป็นสีม่วง ส่วนบริเวณรอบ ๆ โคลิโคนิส ไม่มีสี ในการทดสอบ VP (Voges-Proskauer) พบว่าแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลบวก โดยเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีแดงภายในเวลา 30 นาที ส่วนการทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (citrate utilization) แบคทีเรียปฏิบัณฑ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลบวก โดยทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินในวันที่ 3 หลังจากเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร (ภาพที่ 31) และการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียปฏิบัณฑ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสม 6.5 % NaCl ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ โดยเชื้อสร้างโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Olanbiwoninu and Samuel (2015) ที่ได้จัดจำแนกแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Bacillus subtilis* ที่แยกจากเปลือกมันเทศ โดยทดสอบทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยแป้ง การทดสอบ VP (Voges-Proskauer) การทดสอบการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (citrate utilization) และทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ 6.5% NaCl ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 31 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์ ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 บนอาหารจำเพาะ

- ก. การทดสอบ VP (Voges-Proskauer)
- ข. การทดสอบความสามารถการใช้แหล่งคาร์บอน (citrate utilization)
- ค. การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test)

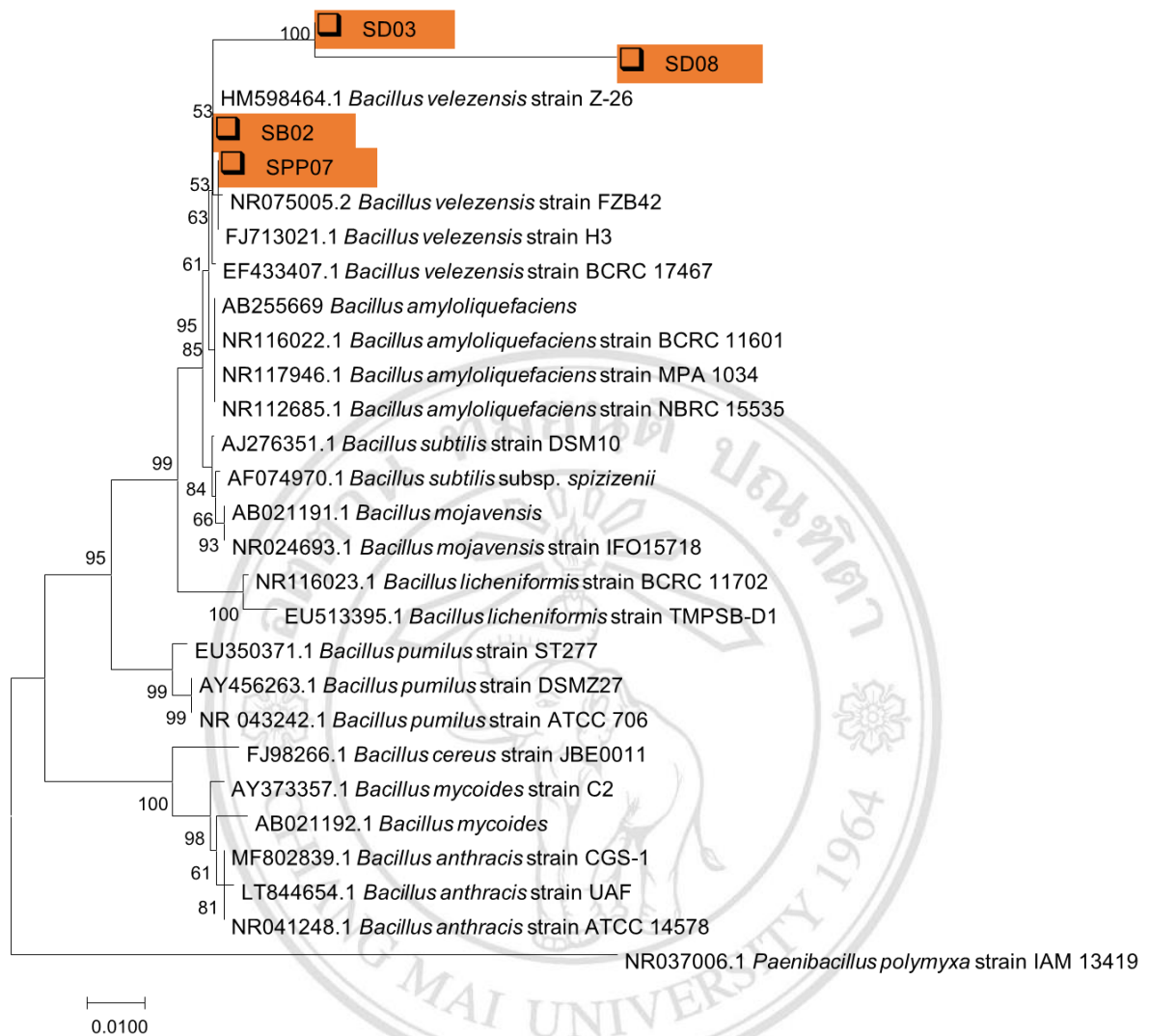
**6.3. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA**

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีน 16s rRNA ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7 แบบ neighbor – joining (NJ) analysis เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 17 พบว่า แบคทีเรียปฏิบั๊กษ์ไอโซเลท SB02, SD03, SD08 และ SPP07 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* สายพันธุ์ Z – 26, FZB42, H3 และ BCRC รหัส HM598464, NR075005, FJ713021 และ EF433407 (ภาพที่ 32)

ตารางที่ 17 *Bacillus* species ที่ใช้ในการศึกษานี้ และไอโซเลตอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ลำดับ	<i>Bacillus</i> species	Strain	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา	Accession No. <sup>a</sup>
1.	<i>B. velezensis</i>	Z-26	pigs	China	HM598464
2.	<i>B. velezensis</i>	FZB42	no data	no data	NR075005
3.	<i>B. velezensis</i>	H3	no data	no data	FJ713021
4.	<i>B. velezensis</i>	BCRC	no data	no data	EF433407
5.	<i>B. amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	no data	no data	AB255669
6.	<i>B. amyloliquefaciens</i>	BCRC	no data	no data	NR116022
7.	<i>B. amyloliquefaciens</i>	MPA	no data	no data	NR117946
8.	<i>B. amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	no data	no data	NR112685
9.	<i>B. subtilis</i>	DSM 10	no data	no data	AJ276351
10.	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>		no data	no data	AF074970.1
11.	<i>B. mojavensis</i>		no data	no data	AB021191
12.	<i>B.s mojavensis</i>	IFO15718	no data	no data	NR024693
13.	<i>B. licheniformis</i>	BCRC 11702	no data	no data	NR116023
14.	<i>B. licheniformis</i>	TMPSB-D1	no data	India	EU513395
15.	<i>B. pumilus</i>	ST277	no data	no data	EU350371
16.	<i>B. pumilus</i>	DSMZ27	no data	no data	AY456263
20.	<i>B. mycoides</i>		no data	no data	AB021192
21.	<i>B. anthracis</i>	CGS-1	citrus variety	no data	MF802839
22.	<i>B. anthracis</i>	UAF	leaf	Pakistan	LT844654
23.	<i>B. anthracis</i>	ATCC 14578	no data	no data	NR041248
24.	<i>P. polymyxa</i>	IAM 13419	no data	no data	NR037006

<sup>a</sup>reference จาก Chen *et al.* (2007); Liu *et al.* (2010); Wang *et al.* (2007); Meerak *et al.* (2008); Nakamura *et al.* (1999); Nakamura *et al.* (1999); Goto *et al.* (2000); Matarante *et al.* (2004); Suzuki and Yamasato (1994)

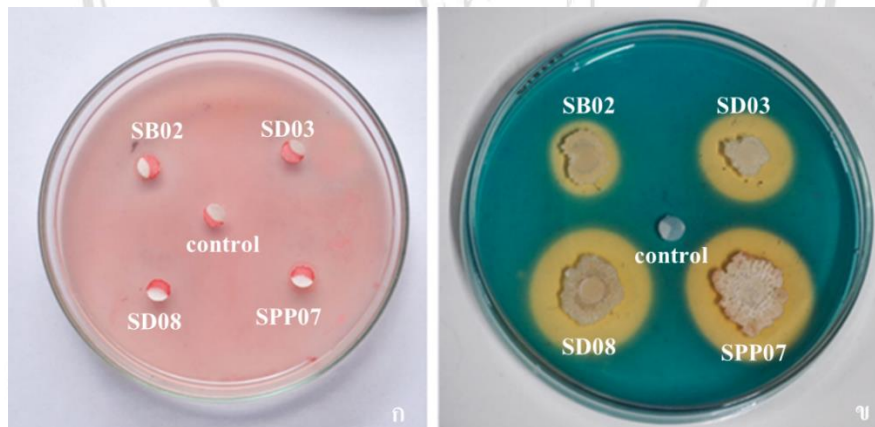


ภาพที่ 32 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต SB02, SD03, SD08 และ SPP07 ค่า Bootstrap 1000  
 SB02 = แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากดินรอบรากต้นกล้วย อำเภอสุคีริน จังหวัดนราธิวาส  
 SD03 = แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากดินรอบรากต้นไผ่ อำเภอสุคีริน จังหวัดนราธิวาส  
 SD08 = แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากดินรอบรากต้นไผ่ อำเภอสุคีริน จังหวัดนราธิวาส  
 SPP07 = แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากดินรอบรากต้นมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

7. ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค

7.1. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

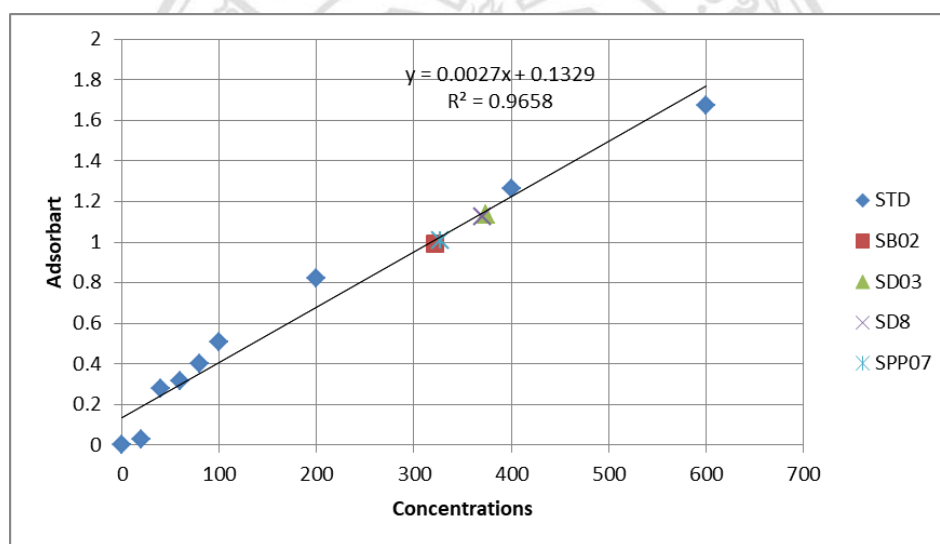
การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย 3 คุณสมบัติ ได้แก่ การย่อยธาตุฟอสเฟต การสร้างสาร IAA และการสร้าง siderophore พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายฟอสเฟต โดยทำให้เกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี ภายในเวลา 7 วัน พบมีการสร้าง siderophore เนื่องจากพบวงใสบนอาหาร Chrome Azurol S Agar (CAS agar) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 33) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yang *et al.* (2012) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* มีการสร้างเอนไซม์ protease chitinase, cellulase, glucanase และ siderophore



ภาพที่ 33 คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค

- ก. คุณสมบัติในการย่อยฟอสเฟต ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
- ข. คุณสมบัติในการสร้าง siderophore ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ส่วนการทดสอบความสามารถในการผลิต IAA ในอาหาร LB ที่มี tryptophan เข้มข้น 500 นาโนกรัม วัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ไอโซเลท SD03 สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินได้สูงสุดที่ 374.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลท SD08 ที่ 370.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไอโซเลท SPP07 และ SB02 สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินได้ที่ 327.33 และ 321.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 34) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Tsavkelova *et al.* (2016) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Klebsiella* และ *Enterobacter* มีความสามารถในการผลิต IAA ที่เป็นฮอร์โมนพืช สามารถนำไปใช้การเจริญเติบโตของพืช โดยการปักชำแต่ละครั้งของการทดลองพบว่า ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้ความยาวของรากและความสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมได้สูงสุดถึง 3-17 เท่า



ภาพที่ 34 ค่าความเข้มข้น indole-3-acetic; IAA ที่ผลิตได้ของแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ *Bacillus velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

STD = ค่ามาตรฐาน (0-100 ไมโครลิตร)

SB02 = แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แยกจากดินรอบรากต้นกล้วย อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส

SD03 = แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แยกจากดินรอบรากต้นไผ่ อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส

SD08 = แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แยกจากดินรอบรากต้นไผ่ อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส

SPP07 = แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แยกจากดินรอบรากต้นมันฝรั่ง อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

## 7.2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

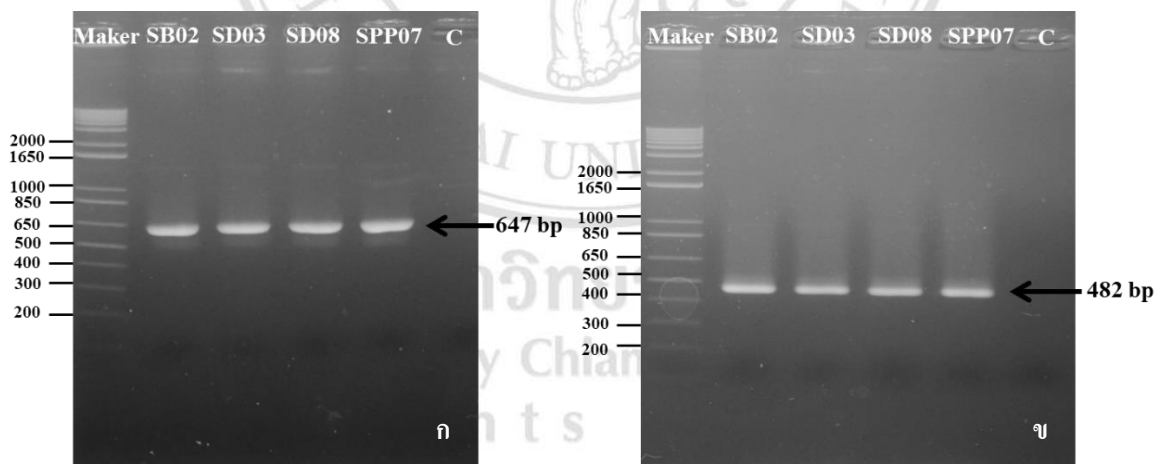
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ หลังจากการแช่เมล็ดมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ SB01, SB02, SD02, SD03, SD04, SD08, SPP07 และ SPP08 พบว่าหลังจากวางเมล็ดแล้วที่เวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ไอโซเลท SB01, SB02, SD03, SD04, SD08, SPP07 และ SPP08 มีอัตราการงอกของเมล็ดมะเขือเทศที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก ที่ 76.00, 82.00, 82.00, 80.00, 84.00, 87.00, 84.00 และ 86.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไอโซเลท SD02 มีอัตราการงอกของเมล็ดมะเขือเทศต่ำสุดที่ 43 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 18) สอดคล้องกับการรายงานของ Widnyana and Javandira (2016) ที่ได้รายงานว่าพบการส่งเสริมการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ เมื่อนำเมล็ดมะเขือเทศแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* sp. โดยเมล็ดมะเขือเทศที่แช่ในเซลล์แขวนลอยของเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบแนวโน้มการงอก และการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ เร็วกว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp.

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

ไอโซเลท แบคทีเรียปฏิชีวนะ	เปอร์เซ็นต์การงอก ของเมล็ดมะเขือเทศ อายุ 10 วัน
Control	86.00 a
SB01	76.00 a
SB02	82.00 a
SD02	43.00 b
SD03	82.00 a
SD04	80.00 a
SD08	84.00 a
SPP07	87.00 a
SPP08	84.00 a
LSD ( $P=0.05$ )	17.103
CV (%)	15.07

## 8. การศึกษาหาชนิดที่สร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

จากการนำ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง มาตรวจสอบหาชนิดที่สร้างสารปฏิชีวนะ iturin A, bacillomycin A, bacillomycin D, fengycin D, zwittermycin และ surfactin โดยอาศัยเทคนิค PCR ร่วมกับ specific primers ที่จำเพาะกับชนิดดังกล่าว (ตารางที่ 1) พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ปรากฏแถบ DNA ขนาด 647 bp และ 482 bp ซึ่งเป็นขนาดแถบ DNA ที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ iturin A และ bacillomycin D ตามลำดับ (ภาพที่ 35) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jasim *et al.* (2016) ที่ระบุว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากพืชพรมมิ (*Bacopa monnieri*) มีการสร้างสารปฏิชีวนะ surfactin และ iturin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ จากการหลั่งสารปฏิชีวนะ และการทดลองของ Han *et al.* (2005) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. *sunhua* มีการผลิตสารปฏิชีวนะ iturin A และ macrolactin A ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุได้



ภาพที่ 35 ผลการตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

*Bacillus velezensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท

ก. ขนาดของแถบ DNA ที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ iturin A

ข. ขนาดของแถบ DNA ที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ bacillomycin D

## 9. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือน

จากการนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03 และ SPP07 ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดสอบประสิทธิภาพในขั้นยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการมาทดสอบผลกระทบต่อการเจริญของต้นมันฝรั่งหลังปลูกต้นมันฝรั่งที่ 90 วัน พบหัวพันธุ์มันฝรั่งกรรมวิธีที่ผ่านการแช่ปฏิชีวนะทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03 และ SPP07 เทียบกับชุดควบคุม มีจำนวนหัวต่อถุงที่ 3.40, 3.30, 2.50 และ 3.80 หัว ตามลำดับ และมีน้ำหนักหัวที่ 52.30, 55.80, 57.80 และ 41.40 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักหัว และจำนวนหัวของมันฝรั่งหลังจากทดสอบกับเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ที่เวลา 90 วัน

กรรมวิธี	ชุดควบคุม <sup>1</sup>	
	จำนวน (หัว)	น้ำหนัก (kg)
ชุดควบคุม	3.80 a <sup>2</sup>	41.40 b
ปฏิชีวนะ SB02	3.40 ab	52.30 ab
ปฏิชีวนะ SD03	3.30 ab	55.80 a
ปฏิชีวนะ SPP07	2.50 b	57.80 a
LSD ( $P=0.05$ )	1.16	11.48
CV (%)	39.26	24.42

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ, <sup>2</sup>ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน โดยทำการทดสอบกับต้นมันฝรั่งทั้งหมด 20 กรรมวิธี ประเมินเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 25 วัน ประเมินความรุนแรงของโรคที่ 45 วัน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เวลา 45 วันหลังการปลูกเชื้อทดสอบ พบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีที่ระดับค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ร่วมกับการปลูกเชื้อ *F. graminearum* เทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเพียงเชื้อรา *F. graminearum* ไอโซเลท CP01 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 54.54, 81.81, 72.72 และ 63.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) มีระดับการเกิดโรคที่ 2.59, 1.73, 2.14 และ 2.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และมี

ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่ 3.89,35.59 และ 20.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36) สอดคล้องกับการรายงานของ Anahosur (2001) ว่าเชื้อปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium virens*, *Penicillium* sp., *Paeocilomyces lilacinus*, *Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis* และ *Mycorrhizae* มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่า เหี่ยว และรากเน่าโคนเน่าอันเกิดจากเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. และ *Pythium debarianum* และรายงานของ Khan *et al.* (2018) ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus simplex* 30N-5, *B. simplex* 11, *B. simplex* 237 และ *B. subtilis* 30VD-1 มีสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และคุณสมบัติทางชีวภาพ โดย *subtilis* 30VD-1 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ และเมื่อใช้สารสกัด 1-butanol ที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* 30VD-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งจากการรายงานของ Grosu *et al.* (2015) ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สามารถนำมาใช้ควบคุมเชื้อรา *Fusarium graminearum* และ *F. culmorum* สาเหตุโรค head blight ของข้าวสาลีได้ โดยพบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ BIR และ B3 มีศักยภาพในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวสาลี รวมถึงการเจริญเติบโตของต้น และชะลอการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. graminearum* และ *F. culmorum* ในระยะแรกของข้าวสาลี ที่ 78 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ต่อการเจริญของหัวพันธุ์มันฝรั่งหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค ที่เวลา 25 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นมันฝรั่ง (%)					
	ชุดควบคุม	<i>F. graminearum</i> CP01	<i>S. rolfsii</i> SC01	<i>S. tendea</i> MJ21	<i>R. solanacearum</i> CK01	<i>P. carotovorum</i> SR03
ชุดควบคุม	90.90	63.0	0.0	54.54	63.63	36.36
ปฏิปักษ์ SB02	95.45	54.54	31.81	68.18	68.18	50.0
ปฏิปักษ์ SD03	95.45	81.81	22.72	90.90	63.63	59.09
ปฏิปักษ์ SPP07	95.45	72.72	13.63	81.81	59.09	27.27

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

ตารางที่ 21 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อทดสอบ ที่เวลา 45 วัน

กรรมวิธี <sup>1</sup>	ระดับการเกิดโรค <sup>2</sup>				
	<i>F. graminearum</i> CP01	<i>S. rolfsii</i> SC01	<i>S. tendea</i> MJ21	<i>R. solanacearum</i> CK01	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>basiliense</i> SR03
ชุดควบคุม	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
ปลูกเชื้อสาเหตุ	2.68 a	4.00 a	2.86 a	3.41 a	3.64 a
ปฏิชีวนะ SB02	2.59 a	3.27 b	2.36 ab	2.95 ab	2.59 b
ปฏิชีวนะ SD03	1.73 b	3.36 b	1.86 b	2.55 b	2.50 b
ปฏิชีวนะ SPP07	2.14 ab	3.59 ab	2.09 b	2.77 ab	2.55 b
LSD ( $P=0.05$ )	0.77	0.62	0.69	0.67	0.87
CV (%)	56.33	28.90	50.77	38.03	51.27

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

<sup>2</sup>ระดับการเกิดโรค:

*Sclerotium* sp. ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = พอมสูง

ระดับที่ 2 = ลำต้นมีแผลเล็กน้อย

ระดับที่ 3 = ลำต้นมีแผล และล้ม

ระดับที่ 4 = ต้นล้มตาย

*Fusarium* sp. ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = แคระ หรือพอมสูง

ระดับที่ 2 = มีใบสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง หรือเหี่ยวเล็กน้อย

ระดับที่ 3 = ใบล่างร่วง ใบบนเหี่ยวมาก

ระดับที่ 4 = ต้นตาย

*Streptomyces* sp. ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = พอมสูง

*Pectobacterium* sp. ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = แคระหรือพอมสูง

ระดับที่ 2 = โคนลำต้นมีแผลน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 = โคนลำต้นมีแผลมากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 = ต้นล้มตาย

*Ralstonia* sp. ประกอบด้วย 4 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่ปรากฏอาการ

ระดับที่ 1 = ต้นแคระ หรือพอมสูง

ระดับที่ 2 = ใบอ่อนร่วงหรือมีอาการเหี่ยว

ระดับที่ 3 = 4 ใบหรือมากกว่ามีอาการเหี่ยว

ระดับที่ 4 = ต้นเหี่ยวตาย

ระดับที่ 2 = มีใบสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง

ระดับที่ 3 = แคระแกรน

ระดับที่ 4 = ตันตาย หรือไม่งอก



ภาพที่ 36 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค(%) ในสภาพโรงเรือนของแบคทีเรียปฏิบัคษ์

เชื้อสาเหตุ:

CP01 = เชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรค dry rot

SC01 = เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่าหรือลำต้นเน่า

MJ21 = เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคจึกกลาก

CK01 = เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท CK01 สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาล

SR03 = เชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03 สาเหตุโรคเน่าและหรือแข็งดำ

แบคทีเรียปฏิบัคษ์ :

SB02 = แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท SB02

SD03 = แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท SD03

SPP07 = แบคทีเรียปฏิบัคษ์ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท SPP07

สำหรับชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ร่วมกับการปลูกเชื้อ *S. rolfii* เทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเพียง *S. rolfii* ไอโซเลท SC01 พบมีเปอร์เซ็นต์ในการรอดชีวิตที่ 31.81, 22.72, 13.63 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) มีระดับการเกิดโรคที่ 3.27, 3.36, 3.59 และ 4.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่ 18.19, 15.91, และ 10.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36) จากกรายงานของ Abd-Allah (2005) พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. rolfii* ของถั่วได้ และพบว่า *B. subtilis* มีการสร้างสารต้านทานเชื้อราด้วย (antifungal) ส่วนชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ร่วมกับการปลูกเชื้อ *S. tendea* เทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเพียงเชื้อ *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 พบมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 62.5, 83.3, 75.0 และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) มีระดับการเกิดโรคที่ 2.09, 2.36, 1.86 และ 2.86 ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่ 11.86, 30.51 และ 22.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36) สอดคล้องกับการรายงานของ Chih *et al.* (2018) พบแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* Ba01 สามารถลดความรุนแรงของโรค common scab ที่เกิดจากเชื้อ *S. scabiei* ของมันฝรั่งภายในสภาพแปลงปลูกลงได้จาก  $55.6 \pm 11.1$  เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง  $4.2 \pm 1.4$  เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Qingxiao and Jianjun (2017) ว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* BAC03 สามารถลดความรุนแรงของโรคขี้กลากที่เกิดจากเชื้อ *S. scabiei* ของหัวไชเท้าลงได้ และยังพบว่าสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักของหัวมันฝรั่งและจำนวนใบของต้นมันฝรั่ง สำหรับชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. carotovorum* subsp. *basilense* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเพียงเชื้อ *P. carotovorum* subsp. *basilense* ไอโซเลท SR03 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 50.0, 59.09, 27.27 และ 36.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) มีระดับการเกิดโรคที่ 2.59, 2.50, 2.55 และ 3.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่ 28.75, 28.75, 31.25 และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36) สอดคล้องกับงานทดลองของ El-Hendawy and Abo-Elyousr (2016) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluoresces* (Pf2), *B. subtilis* (Bs3) และ *Rahnella aquatilis* (Ra39) มาควบคุมเชื้อ *P. atrosepticum* สาเหตุโรคแฉ่งดำของ มันฝรั่งในสภาพโรงเรือน ซึ่งพบว่าหากทำการแช่หัวพันธุ์มันฝรั่งในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ของทั้ง 3 ไอโซเลทก่อนจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุได้ดี และในชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท SB02, SD03 และ SPP07 ร่วมกับการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* เทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเพียงเชื้อ *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 68.18, 63.63, 59.09 และ 63.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) มีระดับการเกิดโรคที่ 2.95, 2.55, 3.50 และ 3.41 ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ 13.33, 25.33 และ 18.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36) สอดคล้องกับการรายงานของ Yendyo *et al.* (2017) ว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* เมื่อ

นำมาใช้ควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศในสภาพแปลงปลูกนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* และเชื้อรา *Trichoderma* spp.



ภาพที่ 37 ลักษณะอาการของต้นมันฝรั่งเมื่อทำการปลูกเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือนเทียบกับชุดควบคุม

ก. ชุดควบคุม

ข. ต้นมันฝรั่งที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Fusarium graminearum*

ค. ต้นมันฝรั่งที่ผ่านการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendae*

ง. ต้นมันฝรั่งที่ผ่านการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

จ.- ช. ต้นมันฝรั่งที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ซ. - ด. ต้นมันฝรั่งที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense*

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่แสดงอาการเน่าแห้ง (dry rot) หัวเน่า (tuber rot) และจี้กลาก (scab) เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรค พบ 4 ไอโซเลท ที่สามารถเกิดโรคได้ ได้แก่ ไอโซเลท CP01 และ PP03 ให้อาการโรคเน่าแห้ง ตัวอย่างจากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอพบพระ จังหวัดตาก ตามลำดับ ไอโซเลท SC01 ให้อาการโรคหัวเน่า ที่ตัวอย่างจากอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และ ไอโซเลท MJ21 ให้อาการโรคจี้กลาก ตัวอย่างจากอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ และ นอกจากนี้ได้แยกตัวอย่างมันฝรั่งและต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการผิดปกติที่พบในแปลงปลูกของเกษตรกรและเมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรค พบจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SR01 และ SR03 จากตัวอย่างต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการโรคแฉำจากอำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา และไอโซเลท MA01, CK01, MK01 และ CD01 ตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการเน่าสีน้ำตาล จากอำเภอไชยปราการ อำเภอเชียงดาว และอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงใหม่

เมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโดยอาศัยเทคนิคทางโมเลกุล พบว่า จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS1 และ ITS4 ของเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท CP01 จัดเป็นเชื้อรา *Fusarium graminearum* ส่วน *Sclerotium* sp. ไอโซเลท SC01 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ไพรเมอร์ SCR-F และ SCR-R พบแถบดีเอ็นเอขนาด 540 bp ที่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท MJ21 และ *Pectobacterium* sp. ไอโซเลท SR01 และ SR03 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีน 16S rRNA ไอโซเลท MJ21 คือเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces tendea* ส่วน ไอโซเลท SR03 คือเชื้อ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อจำแนก phylogroup ด้วยเทคนิค phylogroup-specific multiplex PCR (Pmx-PCR) และจำแนก sequevar ด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีนในตำแหน่ง endoglucanase (*egl*) และ hypersensitive reaction and pathogenicity (*hrpB*) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้ง 4 ไอโซเลท จัดอยู่ใน 2 phylogroup II และ sequevar 1

สำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และคัดเลือกจากทั้งหมด 83 ไอโซเลท ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือก ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรคเน่าแห้ง ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่า ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคจี้กลาก ไอโซเลท SR03 สาเหตุโรคเน่าเลหรือแฉ่งดำ และ ไอโซเลท CK01 สาเหตุโรคเหี่ยวเฉียวและเน่าสีน้ำตาล พบว่า SB02 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. graminearum* ไอโซเลท CP01 และเชื้อรา *S. rofsii* ไอโซเลท SC01 สูงสุดที่ 57.02 และ 47.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังมีรัศมีความกว้างในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *P. carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03 สูงสุดที่ 7.50 มิลลิเมตร ส่วน SPP07 มีรัศมีความกว้างในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 และ *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01 สูงสุดที่ 13.63 และ 8.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03, SD08 และ SPP07 มาจัดจำแนกได้อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่า มีความเหมือนกับบริเวณยีน 16S rRNA ของ *Bacillus velezensis* จึงจัดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท อยู่ในกลุ่ม *B. velezensis* นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลอะซีติก (indole-3-acetic acid; IAA) ได้เท่ากับ 321.78, 374.78, 370.33 และ 327.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังมีตำแหน่งของยีนที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ iturin A และ bacillomycin D ได้ทั้ง 4 ไอโซเลทเช่นกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน โดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ SB02, SD03 และ SPP07 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SD03 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของมันฝรั่งที่เกิดจาก เชื้อรา *F. graminearum* ไอโซเลท CP01 เชื้อรา *S. rofsii* ไอโซเลท SC01 เชื้อแบคทีเรีย *S. tendea* ไอโซเลท MJ21 เชื้อแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03 และ เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท CK01 ที่ 35.59, 15.91, 30.51, 25.33 และ 21.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปอร์เซ็นต์

## เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2558. “ลักษณะประจำพันธุ์มันฝรั่ง” เว็บไซต์ [http://www.doa.go.th/pvp/images/stories/indexpp2518/AnnoDOA\\_nameplant/t667.pdf](http://www.doa.go.th/pvp/images/stories/indexpp2518/AnnoDOA_nameplant/t667.pdf). 8 กุมภาพันธ์ 2562.
- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.
- พันธ์วี มาไพโรจน์. 2532. สอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช : บทแนะนำความรู้พื้นฐาน. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 44 น.
- พีรเดช ทองอำไพ. 2529. สอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 196 น.
- มานิตา คำแจ่ม วสุ ปฐมอารีย์. 2557. สารไซเดอโรฟอรัจากจุลินทรีย์ Siderophores from Microorganisms. Srinakharinwirot Science Journal. 30(1): 230-247.
- สมคิด ดิสถาพร วงศ์ บุญสืบสกุล ณีฎฐิมา โฆษิตเจริญกุล และรุ่งนภา คงสุวรรณ. 2548. การป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โดยชีววิธี ระยะที่ 1. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ ชุด โครงการการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. “ผลพยากรณ์การผลิตพืชผักที่สำคัญปี 2562” เว็บไซต์ <http://www.oae.go.th/view//TH-TH>. 8 กุมภาพันธ์ 2562.
- สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1. 2558. “การผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งคุณภาพ (Seed potato production)” เว็บไซต์ [http://edoc.doa.go.th/doccir/doc/iwebstat/misc/callview\\_extn.asp?ifmid=INT601107/002](http://edoc.doa.go.th/doccir/doc/iwebstat/misc/callview_extn.asp?ifmid=INT601107/002). 8 กุมภาพันธ์ 2562.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2540. การจัดการโรคพืช. โรงพิมพ์ลินคอร์น กรุงเทพฯ. 119 หน้า.
- สุวิณา รัตนชัชวรงค์. 2538. การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช: ความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม. หน้า 234-240. ใน: สัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการใชเชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. 218 หน้า.
- อาภารัตน์ มหาจันทร์. 2549. ปุ๋ยชีวภาพจากจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต กับอนาคตการเกษตรของประเทศไทย. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. บริษัทซีเอ็ดดูเคชั่น จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ

- Abbas, M.F., F. Naz, and G. Irshad. 2013. Important fungal diseases of potato and their management – a brief review. *Mycopath.* 11(1): 45-50.
- Abd-Allah, E.F. 2005. Effect of a *Bacillus subtilis* isolate on southern blight (*Sclerotium rolfsii*) and lipid composition of peanut seeds. *Phytopathology.* 33(5): 460-466.
- Abeyasinghe, S. 2007. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* CA32r on control of *Sclerotium rolfsii* on *Capsicum annuum*. *Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 42(9): 835-846.
- Abo-Elyousr, A. M. 2016. Combination of different antagonistic bacteria to control of potato blackleg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* under greenhouse and field conditions. *International Journal of phytopathology.* 5(1): 35-43.
- Aktaruzzaman, M.D., S.J. Xu, J.Y. Kim, J.H. Woo, Y. Hahm, and B.S. Kim. 2014. First Report of Potato Stem-End Rot Caused by *Fusarium oxysporum* in Korea. *Mycobiology.* 42(2): 206-209.
- Alison, S., V.V. Rivera, and G.A. Secor. 2005. First Report of *Fusarium graminearum* Causing Dry Rot of Potato in North Dakota. *American Plant Pathology.* 89(1): 105.
- Al-Mughrabi, K. 2010. Biological control of Fusarium dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control.* 53(3): 280-284.
- Anahosur, K.H. 2001. Integrated management of potato Sclerotium wilt caused by *Sclerotium rolfsii*. *Indian Phytopathology.* 54(2): 158-166.
- Asaka, O., and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental and Microbiology.* 62: 14081-4085.
- Aydın, M.H., F. Pala, and C. Kaplan. 2016. Potato tuber sprout rot caused by *Fusarium sambucinum* in Turkey. *Scientific Papers. Series A. Agronomy.* 54:189-193.
- Azaiez, S., I. Ben Slimene, I. Karkouch, R. Essid, S. Jallouli, N. Djebali, S. Elkahoui, F. Limam, and O. Tabbene. 2018. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research.* 217: 23-33.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Identification flow chart. [Online]. <https://www.yumpu.com/en/document/view/27488054/bergeys-manual-of-determinative-bacteriology/3> (6 November 2018).

- Billah, K.M.M, M.B. Hossain, M.H. Prince, and M.M.P. Sumon. 2017. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on Different Host, and Its over Wintering Survival; A Mini Review. International Journal of Advances in Agriculture Sciences. 2(7): 1-6.
- Bonde, R. 1952. The role of insects in dissemination of potato back leg and seed picae decay. International Journal of Agricultural Research. 59: 889-917.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux [for the] Commonwealth Mycological Institute, Great Britain.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*: *Fusarium solani* var. *coeruleum*. Kew (UK): Commonwealth Mycological Institute.
- Borshchevskaya, L.N., A.N. Kalinina, and S.P. Sineokii. 2013. Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. Applied Biochemistry and Microbiology. 49: 646-655.
- Bouček-Mechiche, K., L. Gardan, D. Andrivon, and P. Normand. 2006. *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabiei*: one genomic species, two pathogenic groups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 2771-2776.
- Bouček-Mechiche, K., L. Gardan, P. Normand, and B. Jouan. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50(1): 91-99.
- Boutheina, M.T., J.K. Hayfa, and D.R. Mejda. 2015. Interactions between Four *Fusarium* Species in Potato Tubers and Consequences for Fungal Development and Susceptibility Assessment of Five Potato Cultivars under Different Storage Temperature. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 6(8): 1-12.
- Cathrin, S., U. Mendrock, J. Swiderski, E. Lang, and E. Stackebrandt. 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 1433-1438.
- Cellier G., and P. Prior. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. Phytopathology. 100(11): 1250-1261.

- Cellier, G., Remenant B., Chiroleu F., Lefeuvre P., and Prior P. 2012. Phylogeny and Population Structure of Brown Rot- and Moko Disease-Causing Strains of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(7): 2367-75.
- Chandran, R.M., and K.M. Reddi. 2012. Studies on cultural, morphological variability in isolates of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., incitant of dry root-rot of Citrus. *Current Biotica*. 6(2): 52-162.
- Chen, X. F., H. L. Zhang, and J. Chen. 2014. First Report of *Dickeya solani* Causing Soft Rot in Imported Bulbs of *Hyacinthus orientalis* in China. *Plant Diseases*. 99(1): 155.
- Chen, X.H., A. Koumoutsis, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W.R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P.R. Jungblut, J. Vater, R. Sussmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*. 25(9): 1007-1014.
- Cheng, H. R., and N. Jiang. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*. 28: 55-59.
- Chevanet, C., F. Besson, and G. Michel. 1986. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 32: 254-258.
- Chih, L., C.H. Tsai, P.Y. Chen, C.Y. Wu, Y.L. Chang, Y.L. Yang, and Y.L. Chen. 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196520>.
- Cho, H., E.S. Song, Y.K. Lee, S. Lee, S.W. Lee, A. Jo, B.M. Lee, J.G. Kim, and I. Hwang. 2018. Analysis of Genetic and Pathogenic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Causing Potato Bacterial Wilt in Korea. *Plant Pathology*. 34(1): 23-34.
- Choiseul, J., L. Allen, and S.F. Carnegie. 2007. Fungi causing dry tuber rots of seed potatoes in storage in Scotland. *American Journal of Potato Research*. 49(4): 241-253.
- Christiane, D.S., Kr. Peter, M. Shulamit, K. Giora, S. Jorg, Z.C. Jolanta, S. Hildgund, and B. Isaac. 1992. Diversity among *Streptomyces* Strains Causing Potato Scab. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(12): 3932-3940.
- Chung, S., H. Kong, J.S. Buyer, D.K. Lakshman, J. Lydon, S.D. Kim, and D. Roberts. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogen of cucumber and pepper. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 80: 115-123.

- Cilia, V., B. Lafay, and R. Christen. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*. 13(3): 451-461.
- Díaz Nájera, J.F., J.S. Castellanos, M.V. Hernández, S.A. Serna, O.G. Alvarado Gómez, C.V. Verduzco, and M.A. Ramos. 2018. Diagnosis and Integrated Management of Fruit Rot in *Cucurbita argyrosperma*, Caused by *Sclerotium rolfsii*. *Plant Pathology Journal*. 1-11.
- Dinesh, S., K. Y. Dhananjay., C. Garima, S. R. Virendra, and R. K. Sharma. 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol of Bacterial Wilt of Tomato Incited by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathology and Microbiology*. 7: 1.
- Estrada, R., N.C. Gudmestad, V.V. Rivera, and G.A. Secor. 2010. *Fusarium graminearum* as a dry rot pathogen of potato in the USA: prevalence, comparison of host isolate aggressiveness and factors affecting aetiology. *Plant Pathology*. 59: 1114-1120.
- Fegan, M., and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex?. pp. 449–461. *In*: C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, (eds). *Bacterial Wilt the Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathology Society Press.
- Fergus, G.P., and J.S. Richard. 1990. Fermentation of Bacilli. *In*: O.J. Neway. (ed). *Fermentation process Development of Industrial Organisms*. Dekker, New York. 73 p.
- Fery, R.L., and F.D. Dukes. (2002). Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. *Crop Protection*. 21: 403-408.
- Fravel D.R., and H. Spurr. 1971. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycooides* in a controlled environment. *Phytopathology* 77: 930-932.
- Gardes, M., and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.
- Gashgari, R.M., and Y.A. Gherbawy. 2013. Pathogenicity of some *Fusarium* species associated with superficial blemishes of potato tubers. *Polish Journal of Microbiology*. 62(1): 59-66.
- Gherbawy Y, H. Elhariry, A. Altalhi, B. El-Deeb, and G. Khiralla. 2012. Molecular screening of *Streptomyces* isolates for antifungal activity and family 19 chitinase enzymes. *Journal of Microbiology*. 50(3): 459-68.

- Gholam, K., and N. Khodakaramian. 2013. Characteristics and Biocontrol of the Bacterial Causing Potato Complex Scab Diseases. P. 25-26. *In: International Conference on Medical Sciences and Chemical Engineering.*
- Goto, K., T. Omura, Y. Hara, and Y. Sadaie. 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *Journal of General and Applied Microbiology.* 46(1): 1-8.
- Grosu, A.I., A. Siciuio, A. Dobre, C. Voaide, and C.P. Cornea. 2015. Evaluation of Some *Bacillus* spp. Strains for the Biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in Wheat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* 6: 559-566.
- Gutarra, L., J. Herrera, E. Fernandez, J. Kreuze and H. Lindqvist-Kreuze. 2017. Diversity, Pathogenicity and Current Occurrence of Bacterial Wilt Bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. *Frontiers in Plant Science.* 8: 1-12.
- Han, J.S., J.H. Cheng, T.M. Yoon, J. Song, A. Rajkarnikar, W.G. Kim, I.D. Yoo, Y.Y. Yang, and J.W. Suh. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. *sunhua*. *Journal of Applied Microbiology.* 99(1): 213-21.
- Harris, S.D. 2005. Morphogenesis in germinating *Fusarium graminearum* macroconidia. *Mycologia.* 97(4): 880-7.
- Hauben, L., E.R. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology.* 21(3): 384-397.
- He, H., L.A. Silo-Suh, J. Hmdsman, and J. Clardy. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Letters.* 35: 2499-2502.
- Hoda, H., E. Hendawy, and A. M. Kamal. 2016. Combination of different antagonistic bacteria to control of potato blackleg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* under greenhouse and field. *International Journal of phytopathology.* 5(1): 35-43.
- Horita, M., and K. Tsuchiya. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology.* 91: 399-407.
- Huang, Q., X. Yan, and J. F. Wang. 2012. Improved biovar test for *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiological Methods.* 88: 271-274.

- Islam, R., and B. Datta. 2017. Characterization of *Fusarium solani* KUSF204 as a potential metal tolerant plant growth promoting fungus. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 7 (4): 151-161.
- Jafra, S., J. Przysowa, R. Czajkowski, A. Michta, P. Garbeva, and J.M. Wolf. 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 1006-1500.
- Jan, M. J., N. A. Dar, T. A. Bhatl, A. H Bhat, and M. A. Bhat. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *Modern Plant and Animal Sciences*. 1(2): 39-57.
- Jasim, B., C. J. Jimtha, M. Jyothis, and E. K. Radhakrishnan. 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*. 71: 1-11.
- Jeeva M.L., A.K. Mishra, P. Vidyadharan, R.S. Misra, and V. Hegde. 2010. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Sclerotium rolfsii*. *Australasian Plant Pathology*. 39: 517-523.
- Katz, E., and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriological Reviews*. 40: 449-474.
- Khalil, I., and K. El-Mghrabia. 2010. Biological control of Fusarium dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*. 53: 280-284.
- Khan, N., P. Martínez-Hidalgo, A.T. Ice, M. Maymon, E.A. Humm, N. Nejat, E.R. Sanders, D. Kaplan, and A.M. Hirsch. 2018. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2363.
- Kittipadukul, P., B. Jaipeng, A. Slater, S. Walter, and J. Shelley. 2016. Potato production in Thailand. *American Journal of Potato Research*. 1-6.
- Kobayashi, Y.O., A. Kobayashi, H. Soejima, and S. Takenaka. 2011. Biological control of potato scab and antibiosis by antagonistic *Streptomyces* sp. WoRs-501. *Journal of General Plant Pathology*. 81: 439-448.
- Koh, Y.J., G.H. Kim, Y.S. Lee, S.H. Sohn, H.S. Koh, S. Kwon, S. Heu, and J.S. Jung. 2012. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen

- causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 40(4): 269-279.
- Korsten, L., and E.E. De Jager. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 18: 124-130.
- Lambert, D.H., and R. Loria. 1989. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 39(4): 393-396.
- Lambert, D.H., and R. Loria. 1989. *Streptomyces scabies* sp. nov., nov. Rev. International Journal of Systematic Bacteriology. 39(4): 387-392.
- Lee, A.B., J.R. Jame, and A. Hoch. 1985. Biology of the Bacilli. Pp. 57-58. In A. L. Demain and N. A. Solomon. Biology of Industrial Microorganism: Biotech series. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., Murlo Park, California.
- Lehtonen, M.J., H. Rantala, J.F. Kreuze, H. Bång, L. Kuisma, P. Koski, E. Virtanen, K. Vihlman, and J.P.T. Valkonen. 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. Plant pathology. 53: 280-287.
- Lemessa, F., and W. Zeller. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control. 42: 336-344.
- Leslie, J.F., and B.A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Wiley, New York.
- Liu, B., H. Qiao, L. Huang, H. Buchenauer, Q. Han, Z. Kang, and Y. Gong. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. Biological Control. 49: 277-285.
- Liu, Y., D. Wu, Q. Liu, S. Zhang, Y. Tang, G. Jiang, S. Li, and W. Ding. 2017. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation. European Journal of Plant Pathology. 147: 541-551.
- Loeffler, W., J.S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T.F. Hsieh, and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. Phytopathology. 115: 204-213.
- Lwin, K. M., M. M. Myint, T. Tar, and W. Z. M. Aung. 2012. Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid - IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. Engineering Journal. 16: 137-144.

- Mahadatanapuk, S., M. Sanguansermisri, W. C. Robert, V. Sardud, and S. Anuntalabhochai. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus spp.* American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 2(2): 54-61.
- María, E.S.C., F.G. Ruben, H.R. Gabriel, G.E.M. Mariela, G.M.R. Arlene, and L.L. Norma. 2017. Characterization, Pathogenicity and Chemical Control of *Streptomyces acidiscabies* Associated to Potato Common Scab. American Journal of Potato Research. 94(1): 14-25.
- Marten, P., K. Smalla, and G. Berg. 2000. Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology. 89: 463-471.
- Matarante, A., F. Baruzzi, P.S. Cocconcelli, and M. Morea. 2004. Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. Applied and Environmental Microbiology. 70(9): 5168-5176.
- Meerak, J., H. Iida, Y. Watanabe, M. Miyashita, H. Sato, Y. Nakagawa, and Y. Tahara. 2007. Phylogeny of gamma-polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. Journal of General and Applied Microbiology. 53(6): 315-323.
- Mejda, D.R., F. Ayed, J.K Hayfa, H Khaled, and E.M. Mohamed 2006. Effects of some *Bacillus sp.* Isolates on *Fusarium spp.* In vitro and potato tuber dry rot development in vivo. Plant Pathology 5(3): 283-290.
- Meng, Q., H. Jiang, and J.J. Hao. 2016. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. Biological Control. 98: 18-26.
- Mezaache-Aichour, S., N. Sayah, M.M. Zerroug, and A. Guechi. 2012. The antagonism activity of bacteria isolated from potato cultivated soil. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 77(3): 259-64.
- Miyajima, K., F. Tanaka, T. Takeuchi, and S. Kuninaga. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 48: 495-502.
- Nabhan, S., S.H De Boer, E. Maiss, and K. Wydra. 2012. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. Journal of Applied Microbiology. 113(4): 904-13.

- Nakamura, L. K., M.S. Roberts, and F.M. Cohan. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 49(3): 1211-1215.
- Nunes, L., E.G. De-Haan, M. Krijger, P. Kastelein, P.S. Vander Zouwen, G.W. Vanden Bovenkamp, N.D. Tebaldi, and J.M. Vander Wolf. 2015. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. New Disease Reports 29: 24.
- Olanbiwoninu, A. A., and F. Samuel. 2015. Production of bacterial amylases and cellulases using sweet potato (*Ipomoea batatas*. (L.) Lam.) peels. African Journal of Biochemistry Research. 9(9): 104-109.
- Padvi, S.A., P.B. Khaire, V.H. Bhagat, and D.G. Hingole. 2018. Studies on Cultural, Morphological Variability in Isolates *Fusarium solani*, Incitant of Dry Root-rot of Sweet Orange. Int J Curr Microbiol App Sci. 7(7): 3671-3676.
- Pandiyam, R., A.J. Polpass, A. Richa, and R.D.J. Solomon. 2015. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. And statistical media optimization for its improved antibacterial activity. Original Research Article. 5: 1-11.
- Patil, V., S. Sundaresha, Kr. Prashant, and B. Vinay. 2016. Biology of *Solanum tuberosum* (Potato), Series of Crop Specific Biology Document.
- Peter, J.G. 1996. Plant roots growth, activity and interaction with soils. Blackwell Publishing U.S.A. p. 203.
- Peters, J.C., A.K. Lees, D.W. Cullen, L. Sullivan, G. P. Stroud, and A. C. Cunnington. 2008. Characterization of *Fusarium* spp. responsible for causing dry rot of potato in Great Britain. American Plant Pathology. 57: 262-71.
- Prapagdee, B., L. Tharasaitong, R. Nanthaphot, and C. Paisitwiroj. 2012. Efficacy of crude extract of antifungal compounds produced from *Bacillus subtilis* on prevention of anthracnose disease in *Dendrobium* Orchid. Environment Asia. 5(1): 32-38.
- Qingxiao, M., and H. Jianjun. 2017. Optimizing the application of *Bacillus velezensis* BAC03 in controlling the disease caused by *Streptomyces scabies*. Biological control. 62(4): 535–544.

- Reyes-ramirez, A., B.I. Escudero-Abarca, G. Aguilar-Uscanga, P.M Hayward-Jones, and J.E. Barbozacorona. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *Journal of Food Sciences* 65 (5): 130–134.
- Robertson, L.A., G.A. Payne, and J.B. Holland. 2005. Marker assisted breeding for resistance to mycotoxin contamination. *In: Aflatoxin and Food Safety*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 423-35.
- Romberg, M.K., and R.M. Davis. 2007. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Diseases*. 91: 585-592.
- Rubayet, M. T., and M.K.A. Bhuiyan. 2016. Integrated management of stem rot of potato caused by *Sclerotium rolfsii*. *Bangladesh Journal of Plant Pathology*. 32 (2): 7-14.
- Sagar, V., A. Jeevalatha, S. Mian, S.K. Chakrabarti, M.S. Gurjar, R.K. Arora, S. Sharma, R. R. Bakade, and B. P. Singh. 2013. Potato bacterial wilt in India caused by strains of phylotype I, II and IV of *Ralstonia solanacearum*. *European Journal of Plant Pathology*. 138(1): 51–65.
- Santiago, T.R., C.A. Lopes, G. Caetano-Anollés, and E.S.G. Mizubut. 2017. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*. 66: 383-392.
- Satomi, M., M.T. La Duc, and K. Venkateswaran. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(8): 1735-1740.
- Singha, I.M., Y. Kakoty, B.G. Unni, J. Dasd, and M. C. Kalitae, 2016. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 14(1): 99-105.
- Song, J., S.C. Lee, J.W. Kang, H.J. Baek, and J.W. Suh. 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 54: 203-209.

- Stefanczyk, E., S. Sobkowiak, M. Brylinska, and J. Sliwka. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 145(4): 871-884.
- Sun, L., Z. Lu, X. Bie, F. Lu, and S. Yang. 2006. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 1259-1266.
- Suzuki, T., and K. Yamasato. 1994. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 115(1): 13-17.
- Takeuchi, T., H. Sawada, F. Tanaka, and I. Matsuda. 1996. Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab Based on 16s rRNA Sequences. *Journal of Systematic Bacteriology*. 46(2): 476-479.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Tan, M.K. and L.M. Niessen. 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research*. 107(7): 811-821.
- Thanassouloupoulos, C.C., and G.T. Kitsos. 1985. Studies on *Fusarium* wilt of potatoes. 2. Leaf, sprout and tuber infection in artificial inoculations. *Potato Research*. 28(4): 515-518.
- Thano, P., and A. Akarapisan. 2018. Phylotype and sequevar of *Ralstonia solanacearum* which causes bacterial wilt in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *Applied Microbiology*. 66(5): 384-393.
- Tsavkelova, E.A., M.A. Egorova<sup>1</sup>, M.R. Leontieva, S.G. Malakho, G.L. Kolomeitseva, and A.I. Netrusov. 2016. *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regulation*. 80: 79-91.
- Vander Wolf, J. M., E. G. De-Haan, P. Kastelein, M. Krijger, B.H. De-Haan, H. Velvis, O. Mendes, M. Kooman-Gersmann, and P.S. Vander Zouwen. 2016. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant Pathology*. 66(4): 571-583.

- Venkatesan, S., G. Karthikeyan, T. Raguchander, and P. Kuppusami. 2015. Identification of antifungal antibiotics genes of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction. *African Journal of Microbiology Research*. 9: 280-285.
- Vu, D., M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, J.Z. Groenewald, G. Cardinali, J. Houbraken, T. Boekhout, P.W. Crous, V. Robert and G.J.M. Verkley. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology* 92: 135-154.
- Waalwijk, C., J.R.A. de Koning, R.P. Baayen, and W. Gams, 1996. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlamia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88 (3): 361-368.
- Waki, T., M. Horita, D. Kurose, K. Mulya, and K. Tsuchiya. 2013. Genetic Diversity of Zingiberaceae Plant Isolates of *Ralstonia solanacearum* in the Asia-Pacific Region. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 47(3): 283-294.
- Wang, A.X., and G. Lazarovits. 2004. Enumeration of plant pathogenic *Streptomyces* on postharvest potato tubers under storage conditions, *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 563-572.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., and H. Kasai. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(8): 1846-1850.
- Wanner, L.A. 2007. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. *Plant Disease*. 91: 352-359.
- Wanner, L.A. 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *American Journal of Potato Research*. 86: 247-264.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. CRC Press, Washington DC, USA. 500 pp.
- Wharton, P.S., W.W. Kirk, D. Berry, and P. Tumbalam, 2007. Seed treatment application timing options for control of *Fusarium* decay and sprout rot of cut seed pieces. *American Journal of Potato Research*. 84: 237-244.
- Widnyana, K.I., and C. Javandira. 2016. Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to stimulate germination and seedling growth of tomato plants. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 9: 419-423.

- Xu, J., Z. C. Pan, P. Prior, J. S. Xu, Z. Zhang, H. Zhan, L. Q. Zhang, L. Y. He, and J. Feng. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology*. 125(4): 641–653.
- Yang, W., Q. Xu, H. X. Liu, Y. P. Wang, Y. M. Wang, H. T. Yang, and J. H. Guo. 2012. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger. *Biological Control*. 62(3): 144-151.
- Yendyo, S., and B.R. Pandey. 2017. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. doi: 10.12688/f1000research.12448.1
- 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(2): 138-145.
- Zahoor, A., J. Wu, L. Chen, and W. Dong. 2017. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Scientific Reports*. 7: 1-13.
- Zhang, Q., J. Zhang, L. Yang, L. Zhang, D. Jiang, W. Chen., and G. Li. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*. 72: 98-108.



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบ

#### 1. Nutrient Agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

#### 2. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

#### 3. King's Medium B (KB)

Peptone	20	กรัม
$K_2HPO_4$	1.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5	กรัม
Glycerol	15	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
Malachite green	10	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

#### 4. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

### 5. 6.5% NaCl Growth

NaCl	6.5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	L

### 6. Citrate

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Sodium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

### 7. Motility

Tryptose	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

### 8. Starch hydrolysis

Soluble starch	2	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 6.8

### 9. Voges–Proskauer medium (MR/VP test)

Polypeptone	7	กรัม
Glucose	5	กรัม
Dipotassium phosphate	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

#### 10. Luria Bertani (LB)

Proteose peptone	10	กรัม
Tryptone	20	กรัม
NaCl	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ข

### การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์

#### 1. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

##### 1.1 การย้อมสีแบบแกรม (Gram staining)

เตรียมสไลด์สะอาด หยคน้ำกลั่น 1 หยด แล้วใช้หิ้งถ่ายเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 2 วัน แล้วนำมาเกลี่ยให้บาง ๆ บนน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่หยดบนสไลด์ ปล่อยให้เชื้อแห้ง โดยวิธี air dry แล้ว fix เชื้อ โดยผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้เชื้อโดนความร้อนมากเกินไปเพราะจะทำให้เซลล์แตกหรือเสียรูปร่างได้ จากนั้นหยด crystal violet ให้ทั่วรอย smear ย้อมเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลาย iodine ให้ทั่วรอย smear แล้วปล่อยให้แห้ง 1 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% ethyl alcohol จนไม่มีสีติดออกมา แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด safranin O ให้ทั่วรอย ปล่อยให้แห้ง 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำด้วยกระดาษทิชชู หรือผ้าแห้ง จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

##### 1.2 การย้อมสีสปอร์

ตรวจตำแหน่งของสปอร์ โดยเตรียมสไลด์สะอาด หยคน้ำกลั่น 1 หยด แล้วใช้หิ้งถ่ายเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 3-4 วัน แล้วนำมาเกลี่ยให้บาง ๆ บนน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่หยดบนสไลด์ ปล่อยให้เชื้อแห้ง โดยวิธี air dry แล้ว fix เชื้อ โดยผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้เชื้อโดนความร้อนมากเกินไปเพราะจะทำให้เซลล์แตกหรือเสียรูปร่างได้ หยดสี malachite green ให้ทั่วรอย smear บนไอน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด safranin O ให้ทั่วรอย ปล่อยให้แห้ง 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำด้วยกระดาษทิชชู หรือผ้าแห้ง จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

### 2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

#### วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA อายุประมาณ 24–48 ชั่วโมง
2. หยด  $H_2O_2$  เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ ใช้หัวง่ายเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียลงบน  $H_2O_2$   
ผลบวก เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase  
ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase

### 2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase

#### วิธีทดสอบ

1. นำกระดาษกรองที่เคลือบด้วยสาร tetramethyl-*p*-phenylene-diamine dihydrochlorine (Oxidase reagent) ใช้ หัวง่ายเชื้อเปียกเชื้อมาจิกบนกระดาษกรองเป็นลักษณะเส้นตรง 1 จีค  
ผลบวก จะได้สารประกอบสีม่วงน้ำเงินขึ้นภายใน 10 วินาที

### 2.3 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

#### วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Starch hydrolysis plate โดยใช้กระดาษกรองรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และเชื้อแบคทีเรียแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารดังกล่าว บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง
2. เทสารละลาย 1% Lugol's iodine ราดบนอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี  
ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแต่บริเวณรอบโคโลนีไม่มีสี  
ผลลบ อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแต่บริเวณรอบโคโลนียังคงเป็นสีน้ำเงิน

### 2.4 การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate)

#### วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร Simmon's citrate agar
2. บ่มเชื้อนาน 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร  
ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ                   อาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

## 2.5 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

วิธีทดสอบ

1. ใช้เข็มจิ้มตะกั่วและเชื้อแบคทีเรีย แล้ว stab ลงในอาหาร Motility test
2. บ่มเขื่อนาน 48 ชั่วโมง

ผลบวก                   เชื้อเจริญกระจายรอบๆบริเวณรอย stab

ผลลบ                   เชื้อไม่เจริญกระจายรอบๆบริเวณรอย stab

## 2.6 การทดสอบ VP (Voges-Proskauer)

วิธีทดสอบ

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร VP (Voges-Proskauer)
2. บ่มเขื่อนาน 48 ชั่วโมง
3. หยดสาร VP reagent A 6 หยด และ VP reagent A 2 หยด (3:1) แล้วสังเกตการเปลี่ยนสี

ผลบวก                   อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง ภายใน 5-10 นาที

ผลลบ                   อาหารทดสอบไม่เปลี่ยนสี

\*หมายเหตุ ถ้าทิ้งไว้นานเกินไป อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

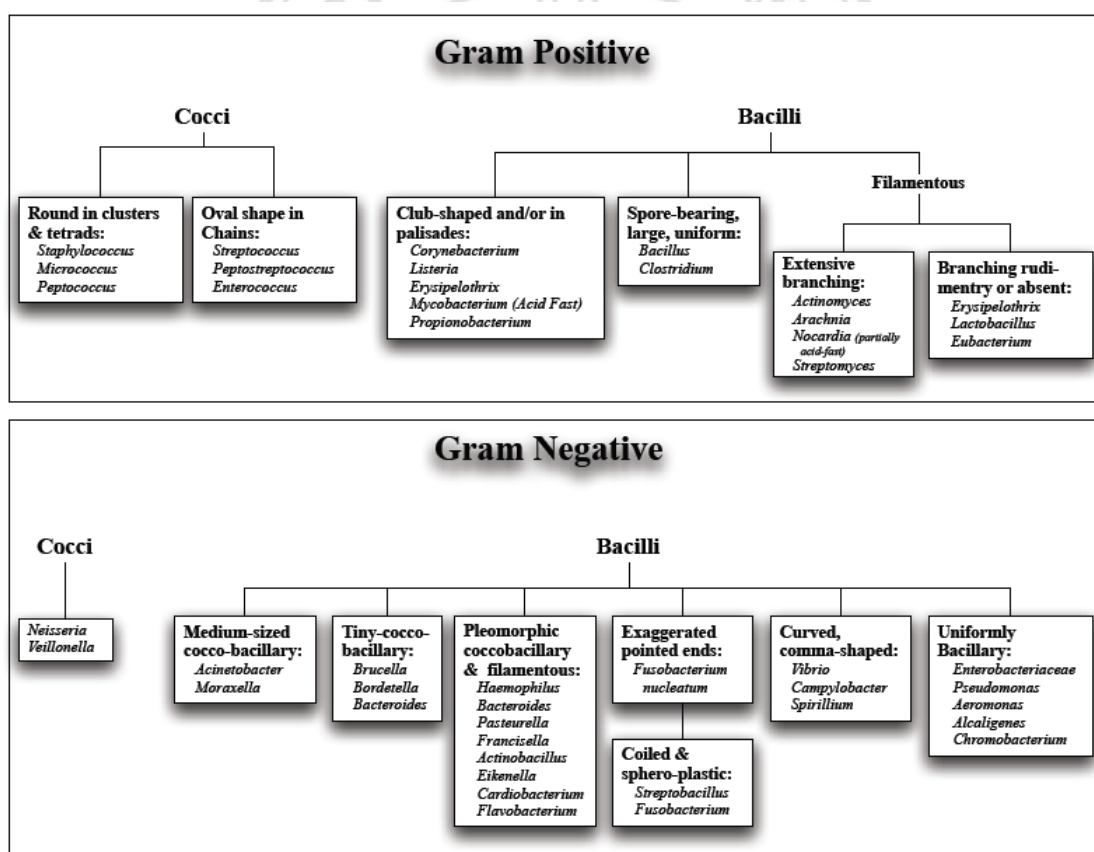
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ค

### การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

#### Identification flow charts

#### Differentiation via Gram stains and cell morphology

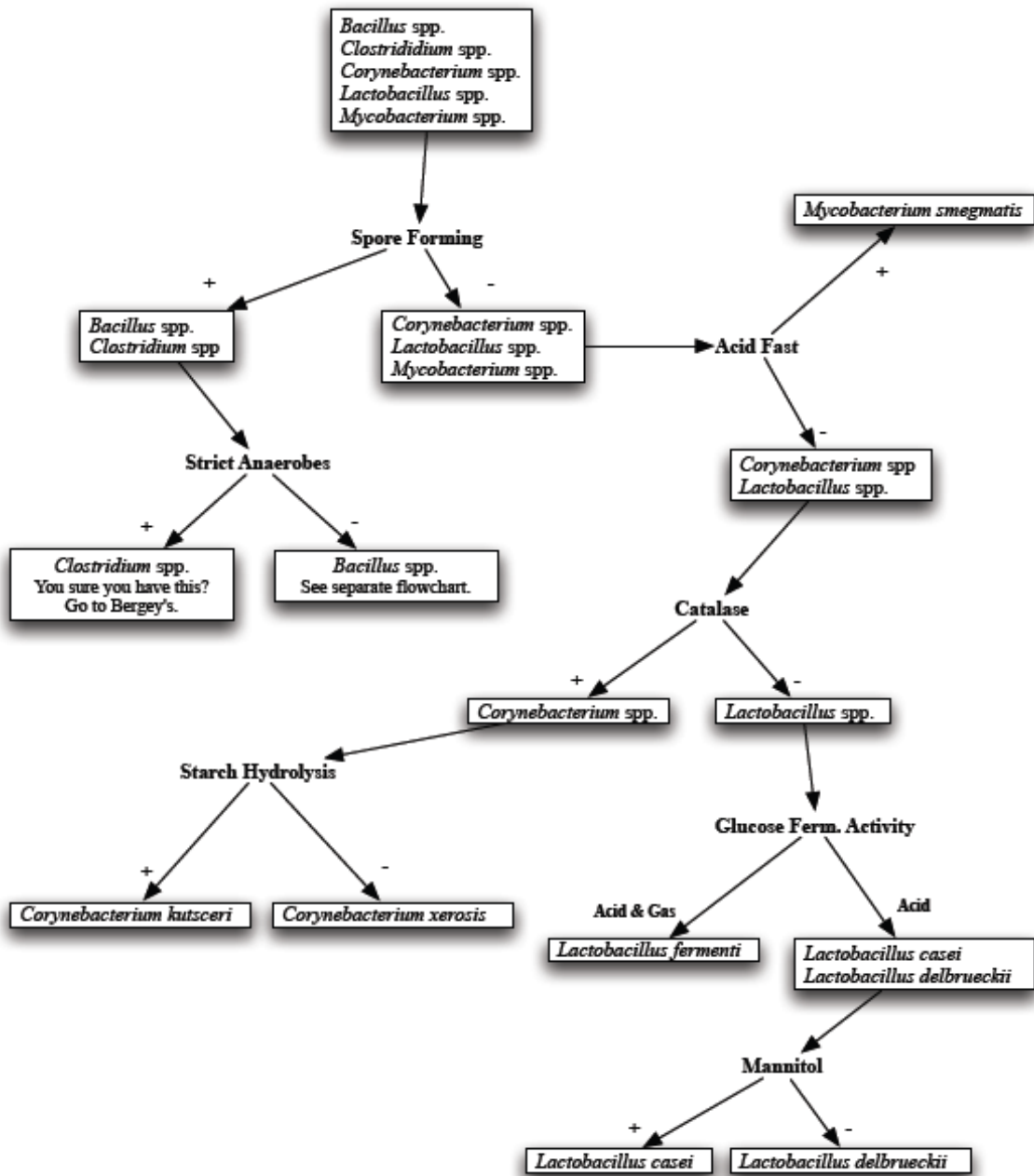


ภาพที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแบบแกรม

Identification flow charts

Gram Positive Rods ID Flowchart

Gram Positive Rods

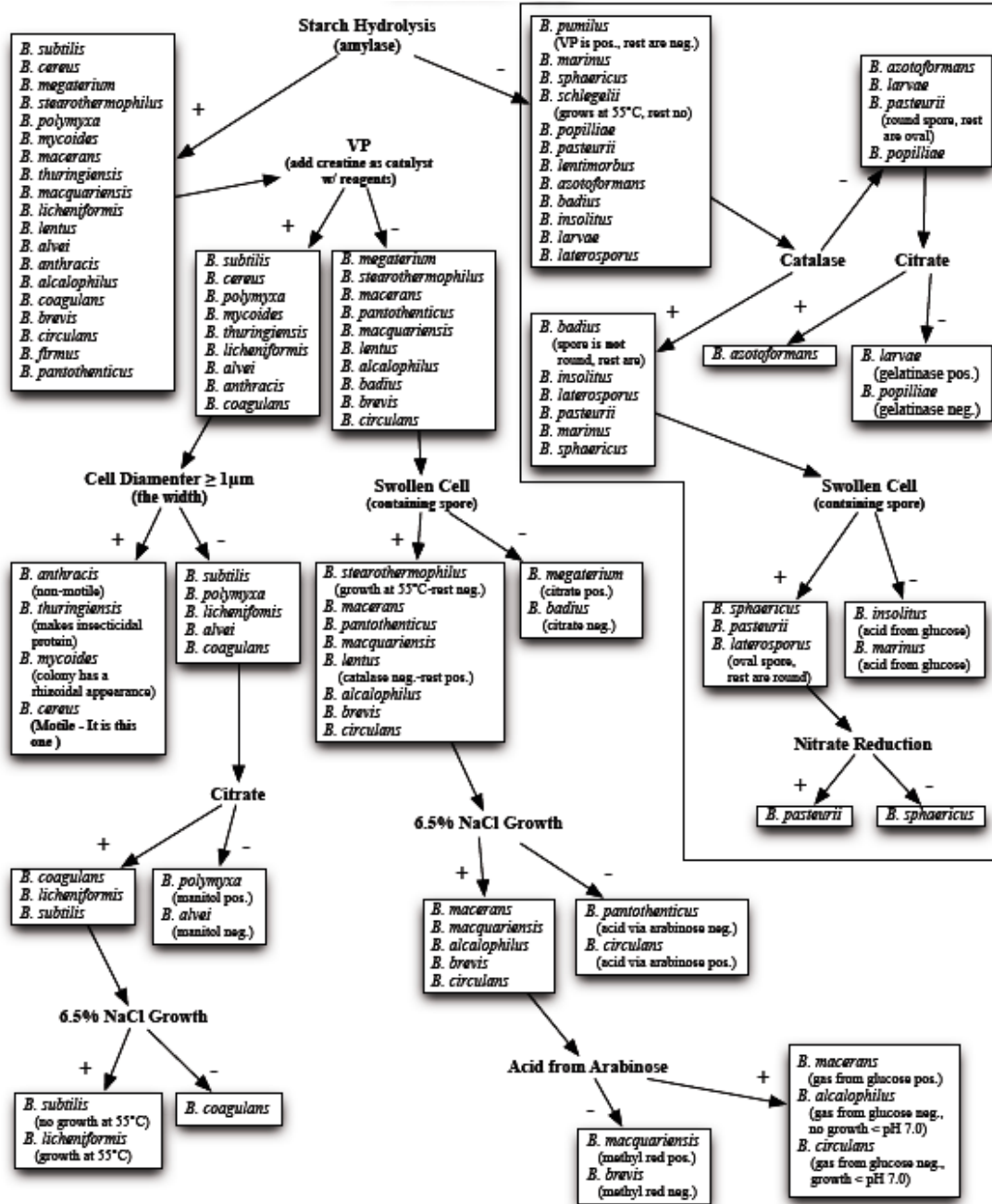


ภาพที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง

Identification flow charts

Bacillus spp. ID Flowchart

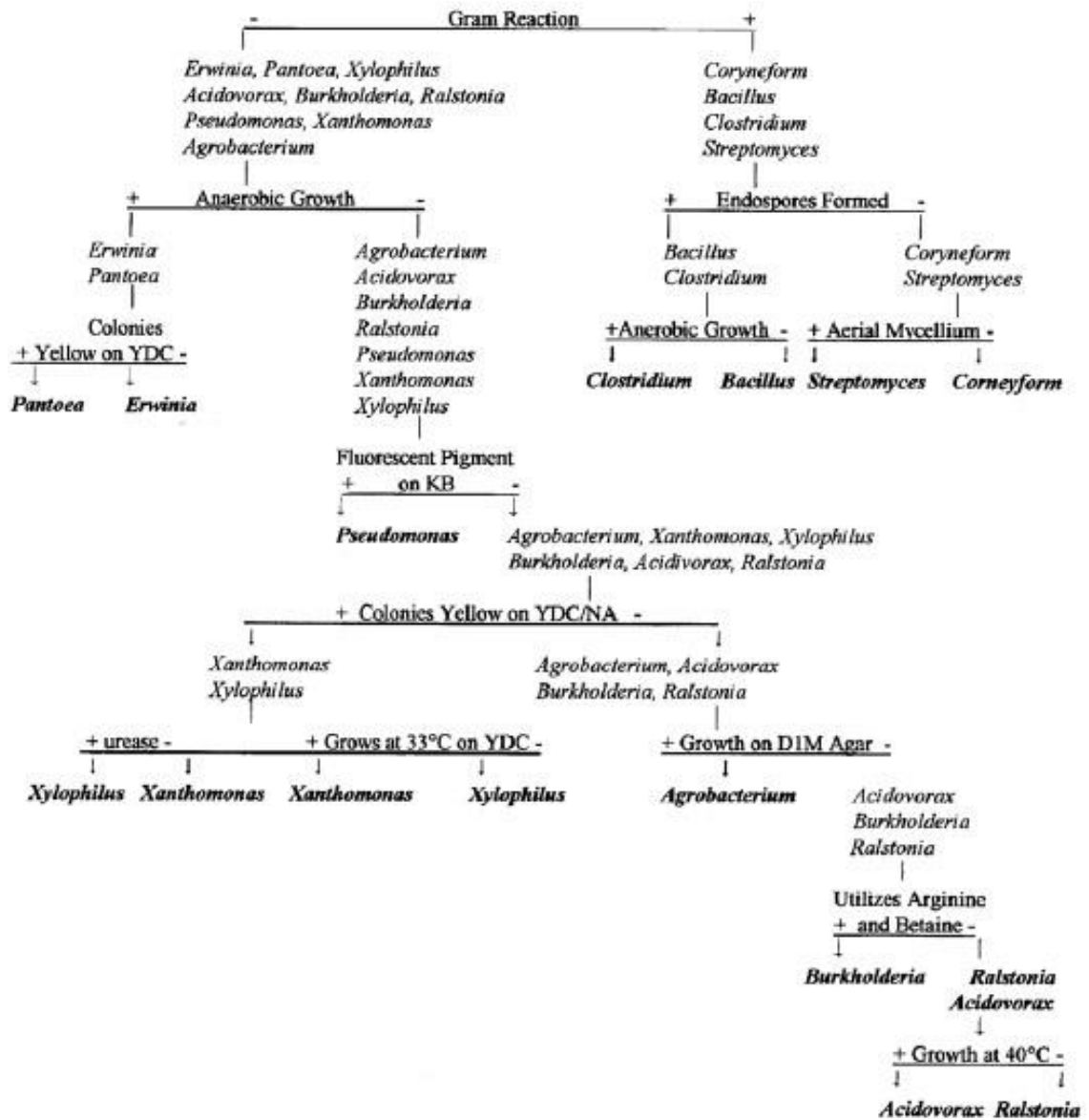
Bacillus spp.



ภาพที่ 3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

Identification flow charts

Differentiation of commonly isolated genera



ภาพที่ 4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์สถิติ

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่เรียปฏิบัติกัยในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลท CP01 สาเหตุโรคน้ำแห้ง (dry rot) ของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	47.899	15.9665	0.49	0.7018
Error	8	263.158	32.8947		
Corrected total	11	311.057			
Grand Mean		55.044			
CV (%)		10.42			

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่เรียปฏิบัติกัยในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	186.277	62.0923	2695	0.0000
Error	12	0.276	0.0230		
Corrected total	15	186.553			
Grand Mean		42.305			
CV (%)		0.36			

ตารางที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อ *Streptomyces tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรครีกกากของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	12.227	4.07576	3.00	0.0351
Error	84	114.091	.35823		
Corrected total	87	126.318			
Grand Mean		2.2955			
CV (%)		50.77			

ตารางที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR01 สาเหตุเน่าหรือเน่าและของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	5.1719	1.72396	3.48	0.0502
Error	12	5.9375	0.49479		
Corrected total	15	11.1094			
Grand Mean		6.4063			
CV (%)		10.98			

ตารางที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basiliense* ไอโซเลท SR03 สาเหตุเน่าหรือเน่าและของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	14.5469	4.84896	6.17	0.0089
Error	12	9.4375	0.78646		
Corrected total	15	23.9844			
Grand Mean		6.2188			
CV (%)		14.26			

ตารางที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลต CK01 สาเหตุเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	18.307	6.10227	2.63	0.0552
Error	84	194.682	2.31764		
Corrected total	87	212.989			
Grand Mean	3.7386				
CV (%)	40.72				

ตารางที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลต MK01 สาเหตุเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	10.6719	3.55729	6.38	0.0078
Error	12	6.6875	0.55729		
Corrected total	15	17.3594			
Grand Mean	7.3438				
CV (%)	10.17				

ตารางที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลต MA01 สาเหตุเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	12.2500	4.08333	11.5	0.0008
Error	12	4.2500	0.35417		
Corrected total	15	16.5000			
Grand Mean	8.5000				
CV (%)	7.00				

ตารางที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลต CD01 สาเหตุเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	9.9219	3.30729	3.36	0.0551
Error	12	11.8125	0.98438		
Corrected total	15	21.7344			
Grand Mean	7.0313				
CV (%)	14.11				

ตารางที่ 10 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	8	5926.22	740.778	5.33	0.0005
Error	27	3752.00	138.963		
Corrected total	35	9678.22			
Grand Mean	78.222				
CV (%)	15.07				

ตารางที่ 11 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium graminearum* ไอโซเลต CP01 สาเหตุโรคเน่าแห้ง (dry rot) ของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	12.852	4.28409	2.59	0.0583
Error	84	139.045	1.65530		
Corrected total	87	151.898			
Grand Mean	2.2841				
CV (%)	56.33				

ตารางที่ 12 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไอโซเลท SC01 สาเหตุโรคหัวเน่าของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	6.9432	2.31439	2.19	0.0952
Error	84	88.7727	1.05682		
Corrected total	87	95.7159			
Grand Mean	3.5568				
CV (%)	28.90				

ตารางที่ 13 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการควบคุมเชื้อ *Streptomyces tendea* ไอโซเลท MJ21 สาเหตุโรคจ้กลากของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	1.3089	0.43630	1.91	0.1420
Error	44	10.0532	0.22848		
Corrected total	47	11.3620			
Grand Mean	0.4410				
CV (%)	108.38				

ตารางที่ 14 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท CK01 สาเหตุเหี่ยวเฉาหรือเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	8.852	2.95076	2.39	0.0742
Error	84	103.591	1.23323		
Corrected total	87	112.443			
Grand Mean	2.9205				
CV (%)	38.03				

ตารางที่ 15 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *basilense* ไอโซเลท SR03 สาเหตุแฉ่งดำหรือเน่าและของมันฝรั่งในสภาพโรงเรือน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	3	19.727	6.57576	3.15	0.0292
Error	84	175.364	2.08766		
Corrected total	87	195.091			
Grand Mean	2.8182				
CV (%)	51.27				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุภาพร ฟ้าเลิศ
วัน เดือน ปี เกิด	29 เมษายน 2537
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ ภาควิชา ภูมิวิทยาและโรคพืช สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2559
ประสบการณ์	- เข้าร่วมการนำเสนอผลงานวิจัยในงานพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 17 ระหว่าง วันที่ 19 ถึง 21 พฤศจิกายน 2561 ณ โรงแรมเชียงใหม่แกรนด์วิว ในหัวข้อ Selection of antagonistic bacteria for control <i>Fusarium graminearum</i> causing dry rot of potato. - เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัยในงาน The 8 <sup>th</sup> AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agriculture Biotechnology & KU-UT Joint Seminar IV ระหว่างวันที่ 8 ถึง 9 ธันวาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ในหัวข้อ Phylotype and Sequevar of <i>Ralstonia solanacearum</i> Causing Potato Bacterial Wilt in Chiang Mai, Thailand.



ทรัพย์สินทางปัญญา  
right © by Chiang Mai University  
rights reserved