บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (Fusarium wilt of tomato)

โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เชื้อราชนิดนี้พบทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกมะเขือเทศทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบที่มีอากาศค่อนข้างร้อนและอบอุ่น เนื่องจากเชื้อราเจริญได้ดีในดินที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงประมาณ 28 °ซ ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงมักพบการระบาดของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* อยู่เสมอ โดยเฉพาะแหล่งพื้นที่การผลิตส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักจะประสบปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้ ส่งผลให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้กระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศยังได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

เชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้น(septate mycelium) ในระยะแรกเส้นใยจะไม่มีสี แต่ต่อมาเมื่อเส้นใยแก่ขึ้นจะกลายเป็นสีครีม (cream-colored) หรือสีเหลืองอ่อน (pale yellow) และภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะสร้างเส้นใยสีชมพูอ่อน (pale pink) หรือค่อนข้างเป็นสีม่วง (purplish) มีระบบการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (imperfect fungi) จะไม่พบการสร้างสปอร์เพศ (sexual spore) แต่มีการสร้างสปอร์แบบไม่ใช้เพศ (asexual spore) 3 ชนิด คือ ไมโครโคนิเดีย (microconidia) มาโครโคนิเดีย (macroconidia) และคลามายโดสปอร์ (chlamydospore) จะสร้างสปอร์ชนิดใดขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อราเจริญอยู่ในขณะนั้น (Agrios, 2005)

ไมโครโคนิเดีย เป็นสปอร์ที่พบบ่อยมากที่สุด และสร้างได้ในทุกสภาวะการเจริญเติบโต มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือมีผนังกั้น 1 อัน ไม่มีสี รูปไข่ (ovoid) หรือ ellipsoid มีขนาดประมาณ 3 x 6 - 15 ไมครอน เป็นสปอร์ที่พบอยู่ภายในท่อน้ำท่ออาหารของพืชที่ถูกทำลายด้วยเชื้อนี้

มาโครโคนิเดีย เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อรา *Fusarium* spp. มีลักษณะโค้งไปทางปลายทั้ง 2 ด้าน แต่ละสปอร์มีผนังกั้น 2 - 4 อัน มีขนาดกว้างประมาณ 4 ไมครอน ความยาวประมาณ 30 ไมครอน ปกติพบสปอร์ชนิดนี้ที่ผิวของต้นพืชที่ตายจากสาเหตุการเข้าทำลายของ Fol

คลามายโดสปอร์ เป็นสปอร์ผนังหนา รูปร่างกลม สร้างที่ปลายหรือตรงกลางเส้นใยที่อายุมาก หรือสร้างภายในมาโครโคนิเดีย มีขนาดประมาณ 7-11 ไมครอน

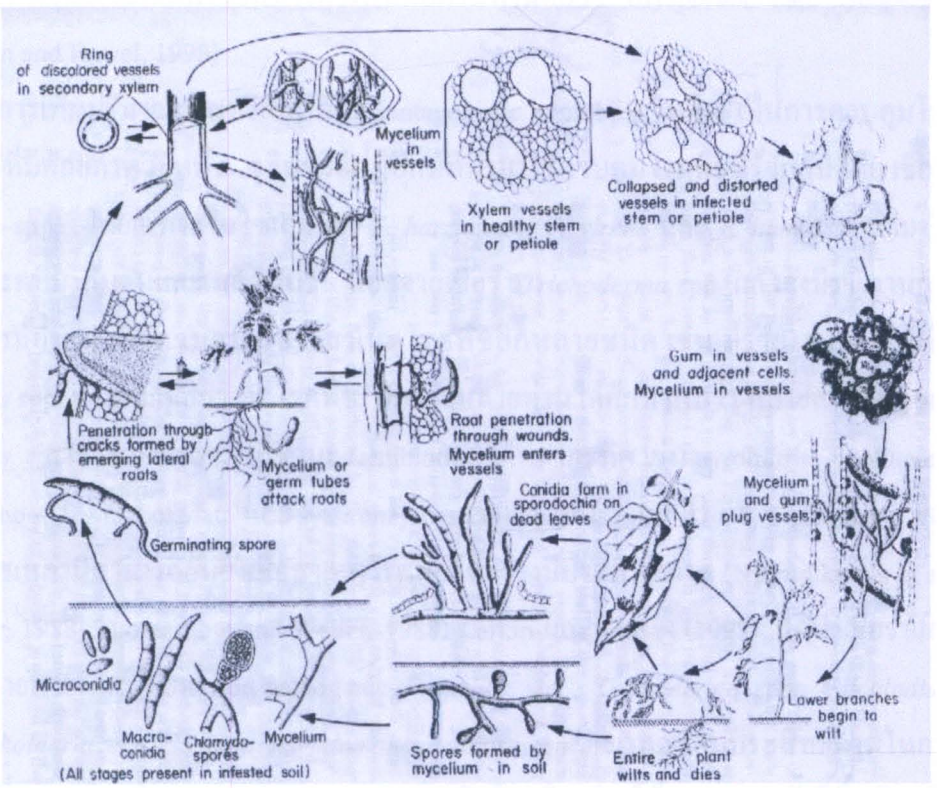
2.1.2 พืชอาศัยและอาการของโรค

เชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ของมะเขือเทศ เข้าทำลายมะเขือเทศในทุก ๆ พื้นที่ทำความเสียหายให้กับแหล่งปลูกมะเขือเทศไปทั่วโลก ลักษณะอาการที่ปรากฏครั้งแรกในระยะต้นกล้า พบว่าที่ใบอ่อนกว่าจะมีสีอ่อนโปร่งแสง (vein clearing) ใบที่แก่กว่าจะปรากฏอาการครั้งแรกเช่นเดียวกับในระยะกล้า ต่อมาต้นจะแคระแกร็น ใบล่างมีสีเหลือง บางครั้งมีการสร้างรากแขนง ลำต้นและใบเหี่ยวใบหลุดล่วง ใบที่เหลืออยู่เกิดการตายของเนื้อเยื่อที่ขอบใบ (necrosis) ในที่สุดต้นมะเขือเทศจะตาย (รูปที่2.1) บ่อยครั้งที่พบอาการเกิดขึ้นเพียงด้านเดียวของลำต้น ขณะที่พืชถูกเชื้อเข้าทำลาย และยังมีชีวิตอยู่จะไม่พบเส้นใย หรือ fructifications ปรากฏบนผิวของต้นพืช เมื่อตัดลำต้นพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายตามขวาง จะเห็นว่าที่บริเวณท่อน้ำ (vascular bundles) เปลี่ยนสี (discoloration) เป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ได้สารพวก ควินโนน (quinones) ซึ่งต่อมาจะถูกโพลีเมอร์ไรส์ไปเป็นเม็ดสีเมลานินซึ่งมีสีดำหรือสีน้ำตาล

รูปที่ 2.1 โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (Fusarium wilt on tomato) สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* มะเขือเทศแสดงอาการใบเป็นสีเหลืองและเหี่ยว (Bunyatratchata et al., 2003)

2.1.3 วงจรการเกิดโรค

เชื้อโรคอยู่ข้ามฤดูหนาวในดินในรูปของสปอร์และเส้นใย (mycelium) เชื้อในดินสามารถแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่น ๆ ได้โดยปนเปื้อนไปกับน้ำ เครื่องมือการเกษตรในแปลง การย้ายปลูกต้นกล้าที่ถูก infected หรือดินที่ติดมากับกล้า เมื่อพืชปกติเจริญในดินที่มีเชื้อชนิดนี้ สปอร์จะงอกเป็นเส้นใยเล็ก ๆ (germ tube) แทงทะลุผ่านปลายรากเข้าไปโดยตรง หรือเขาทางบาดแผลที่ราก หรือจุดที่มีการสร้างรากแขนง (lateral roots) จากนั้นเส้นใยจะพัฒนาเจริญเติบโตผ่านเข้าไประหว่างเซลล์คอร์เทคของราก (root cortex) จนถึงท่อน้ำ (xylem vessels) และเจริญอยู่ในท่อน้ำสร้างไมโครโคนิเดียขึ้น ขณะเดียวกันพืชจะแสดงปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราโดยสร้างสิ่งต่าง ๆ ขึ้น เช่น gum, tylose เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ท่อน้ำของเซลล์อุดตัน น้ำไหลผ่านไปไม่สะดวก ทำให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยว เมื่อพืชตายลงเชื้อราที่ยังอาศัยอยู่บนซากพืชจะสร้างโคนิเดียบนใบพืชที่ตายทับถมลงในดิน เป็นแหล่งของการแพร่ระบาดต่อไป (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 วงจรการเกิดโรค (Disease cycle) เหี่ยวเหลืองสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Agrios, 2005)

2.2 การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี (Biological control)

ในสมัยก่อนการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* มักใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว เช่นใช้สารเคมีเมทิลโบรไมด์ (methyl bromide) อบดินก่อนปลูกมะเขือเทศ สารเคมีชนิดนี้ถูกห้ามจำหน่ายในท้องตลาดของประเทศสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี 2001 ทางเลือกใหม่ของการควบคุมโรคนี้คือใช้วิธีควบคุมโดยชีววิธี เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากแหล่งที่เชื่อถือได้ การใช้พันธุ์ต้านทานซึ่งวิธีนี้เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย พันธุ์ต้านทานที่ใช้ในทางการค้ามีอยู่หลายพันธุ์ เช่น Campbell 146, Homestead, Kokomo, Manalucie, CPC-2, Pearson, VF-6, Ohio W-R7, Ohio W-R25 และ Tippecanoe เป็นต้น (Agrios, 2005) บางครั้งการใช้พันธุ์ต้านทานอาจไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างสมบูรณ์ แต่การปลูกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ก็สามารถทำให้ได้ผลผลิตที่ดีได้ ข้อจำกัดของการใช้พันธุ์ต้านทาน คือ เชื้อก่อโรคสามารถพัฒนาไปเป็นเชื้อชนิดใหม่ ๆ อยู่เสมอ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ทันต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อเช่นกัน และปัจจุบันพบว่ายังไม่มีพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในทางการค้าเพื่อต้านทานต่อ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 (Larkin and Fravel, 1998)

การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microbes) ในดิน เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่มีศักยภาพวิธีหนึ่ง จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่รู้จักกันดีคือ เชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยเฉพาะไอโซเลตของ *T. harzianum*, *T. virens* และ *T. hamatum* นำมาใช้ควบคุมเชื้อโรคที่มากับดินและเมล็ดพันธุ์ นอกจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. แล้วยังมีรายงานการใช้เชื้อปฏิปักษ์อื่น ๆ เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด เช่น มีรายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas* spp. ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช นักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาพบว่า หลายสายพันธุ์ของ *Pseudomonas* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ได้หลายชนิด เช่น pyrolnitrin, pyoluteorin และ phenezine – 1 – carboxylate และ lytic enzymes เช่น chitinase และ β - 1, 3 glucanase ซึ่งมีรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nagarajkumar et al., 2004, Weller, 1988; Thomashow and Weller, 1988) Larkin และ Fravel (1998) ได้นำเชื้อราและแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ non-pathogenic *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens, Burkholderia cepacia* และ *Pseudomonas fluorescense* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคดังกล่าวได้ 35-100% ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อต่อต้าน นอกจากนี้ *Pseudomonas* บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตสาร siderophores ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช และส่งเสริมการเจริญของพืชโดยให้ธาตุเหล็กแก่พืช (Kloepper et al., 1986; Leong, 1986; Loper, 1988)

จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่า *Pseudomonas* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชและสามารถนำมาใช้บำรุงดินได้เนื่องจากส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas*

2.3.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp.

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีลักษณะเป็นรูปท่อน กรัมลบ (gram negative bacilli) มีขนาด 0.5-0.8 x 1.0-3.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagella บางสายพันธุ์เคลื่อนที่โดย lateral flagella อาศัยอย่างอิสระ (free living) พบได้ทั่วไปในบริเวณดินรอบๆรากพืช (rhizosphere) เจริญได้ดีใน differential media เชื้อในกลุ่มนี้ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลบวกกับการทดสอบออกซิเดส (oxidase test) และเป็นพวกที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเท่านั้น (strict aerobes) มีบางสายพันธุ์เป็น facultative anaerobe สามารถใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเลคตรอนในปฏิกิริยา denitrification บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุ (pigments) ได้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* สร้างรงควัตถุสีฟ้าไพโอไซยานิน (pyocyanin) และไพโอเวอดิน (pyoverdin) ซึ่งเป็นรงควัตถุฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) *P. fluorescens* ให้รงควัตถุสีเขียวฟลูออเรสเซนต์ แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่ให้รงควัตถุ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* จะอยู่ระหว่าง 35-37°ซ. อุณหภูมิบริเวณรอบรากพืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญทั้งต่อการ colonization ของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช และกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค มีรายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas* spp ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด

2.3.2 กลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชของ *Pseudomonas* spp.

เชื้อ *Pseudomonas* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัยอย่างมากในด้านการเกษตร เพื่อใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี ตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อ *Pseudomonas* spp. ควบคุมโรคเหี่ยวของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ขึ้นอยู่กับการสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ และสารปฏิชีวนะ เมื่อทำการศึกษาในสภาพเรือนทดลองจะไม่พบความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์ร่วมกันจะไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่เมื่อทำการจุ่มรากยูคาลิปตัสก่อนย้ายปลูก พบว่า *P. fluorescens* WCS417r สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ran et al., 2005)

การแยกเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* จากดินบริเวณรอบรากธัญพืช หญ้า และพืชหลายชนิด เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Microdochium nivale* สาเหตุโรคกล้าไหม้ของข้าวสาลี โดยทำการคลุกเมล็ดก่อนปลูกทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ด และลดอัตราการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tahsein et al., 2007) การควบคุมโรค Verticillium wilt ของต้นกล้าโอลีฟที่เกิดจากเชื้อ *Verticillium dahliae* ระดับห้องปฏิบัติการในโรงเรือนอนุบาลต้นกล้า โดย *Pseudomonas* 2 สายพันธุ์ คือ *P. fluorescens* และ *P. putida* ที่แยกได้จากบริเวณรากของต้นโอลีฟ พบว่า *Pseudomonas* ทุกสายพันธุ์สามารถ

สร้างสารสีเขียวไซเดอร์โรฟอร์ได้และบางไอโซเลทของ *P. fluorescens* สามารถผลิต salicylic acid หรือ hydrogen cyanide ได้ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. dahliae* บนอาหาร potato dextrose agar พบว่า *P. putida* มีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อ *P. fluorescens* ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญในสภาพเรือนทดลอง โดยการจุ่มรากต้นกล้าโอลีฟในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ก่อนย้ายปลูก พบว่า สามารถลดอัตราการเกิดโรคลงได้ 31-82 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี (treatment) ควบคุม (Mercado-Blanco et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากผิวใบและผลแอปเปิล สามารถควบคุมโรค apple gray mold ที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis mali* ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยว (Mikani et al., 2007) จากการศึกษาของนักวิจัยสรุปได้ว่า กลไกการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Pseudomonas* แบ่งออกเป็น 3 กลไก คือ

2.3.2.1 การแก่งแย่งแข่งขันและครอบครองพื้นที่ (competition)

กลไกหนึ่งของการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ คือการที่เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้รวดเร็วเพื่อครอบครองพื้นที่และแย่งอาหารเพื่อการดำรงชีพก่อนที่เชื้อโรคพืชจะเจริญ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตเร็วโดยใช้แหล่งอาหารจาก root exudate จึงทำให้บริเวณรอบรากพืชมีจำนวนประชากรของเชื้อ *Pseudomonas* มาก และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* สามารถสร้างโคโลนีหลังจากคลุกเมล็ดเพียง 1 วัน เท่านั้น (Weert et al., 2002) จึงทำให้เชื้อ *Pseudomonas* มีความสามารถสูงในการแก่งแย่งแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านการใช้อาหาร และแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะธาตุเหล็ก ซึ่งจัดเป็นธาตุอาหารที่มีปริมาณมากบนผิวโลก แต่โดยทั่วไปธาตุเหล็กจะอยู่ในรูปสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยาก หรือไม่สามารถละลายน้ำเลย เชื้อ *Pseudomonas* สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (0.5-1.5 กิโลดาลตัน) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อธาตุเหล็ก การจับธาตุเหล็กของสารไซเดอร์ฟอร์จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนในรูป ferric-siderophore complex เชื้อ *Pseudomonas* จะมี receptor ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ ferric-siderophore complex สามารถเข้าสู่เซลล์และปลดปล่อยธาตุเหล็กให้กับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* การผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์เพื่อจับธาตุเหล็กของเชื้อ *Pseudomonas* ทำให้บริเวณรอบรากพืชขาดธาตุเหล็ก ดังนั้นจึงป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืชเจริญแพร่ขยายพันธุ์ต่อไปได้

สภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็ก หรือมีธาตุเหล็กในปริมาณน้อยจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างสารไซเดอร์ฟอร์มากขึ้น ตัวอย่างเช่น เชื้อ *P. fluorescens* ATCC 17400 สามารถสร้างสารไซเดอร์ฟอร์ได้ 2 ชนิด คือ pyoverdine และ quinolobactin ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กจำกัด (Matthijs et al., 2007) pyoverdine เป็นสารไซเดอร์โรฟอร์ที่มีการศึกษากันมาก โดย *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์สามารถผลิต pyoverdine ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* spp. และ *Fusarium* spp. (Whipps, 2001) และในทางกลับกันการสร้างจะถูกยับยั้งเมื่อสภาพแวดล้อมมี

ปริมาณธาตุเหล็กมากขึ้น *Pseudomonas* ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าว สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อเติมธาตุเหล็กในรูป $FeCl_2$ ปริมาณ 1.36 ppm ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* จะไม่สามารถสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ได้ *P. putida* สามารถผลิตสารไซเดอร์ฟอร์ได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศ มีรายงานกล่าวว่า mutant ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. aeruginosa* จะสร้างสารไซเดอร์ฟอร์ได้น้อยจึงไม่สามารถป้องกันโรคเน่าคอดิน (damping off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* ได้ เชื้อ *Pseudomonas* แต่ละสายพันธุ์จะผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ได้แตกต่างกัน เช่น pyoverdine (pseudobactin), pyochelin, pyocyanin และ quinolobactin โดย wild type ของ *P. fluorescens* สามารถผลิตสารไซเดอร์ฟอร์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium debaryanum* โดยพิจารณาจาก inhibition zone ที่เกิดขึ้น แต่ mutant ของเชื้อ *P. fluorescens* ที่สามารถสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ 2 ชนิดคือ pyoverdine และ quinolobactin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. debaryanum* ได้ เนื่องจากไม่สามารถสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Bakker, 1987)

การแก่งแย่งธาตุเหล็กและคาร์บอนจะมีบทบาทต่อการสร้างคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) ของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยเชื้อ *Pseudomonas* สามารถดึงธาตุเหล็กในดินไปใช้ ทำให้เชื้อรา *F. oxysporum* ขาดธาตุเหล็กในการสร้างในการสร้างคลาไมโดสปอร์ ยังทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชขาดธาตุเหล็กจึงมีผลทำให้การเจริญเติบโตถูกยับยั้ง เชื้อ *P. fluorescens* ที่สามารถสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ได้ 2 ชนิด คือ pyoverdine และ quinolobactin ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กจำกัด ซึ่งสารดังกล่าวจะมีผลในการยับยั้งการสร้างโอโอสปอร์ (oospore) ของเชื้อ *Pythium* spp. (Matthijs et al., 2007) การใช้สารไซเดอร์โรฟอร์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* f.sp.*lini* สาเหตุโรคโคนเน่าของป่าน โดยใช้สารไซเดอร์โรฟอร์ในปริมาณ 50 ไมโครกรัม ใส่ลงไปในดินสามารถให้ผลในการยับยั้งเชื้อราได้เป็นอย่างดี สำหรับเชื้อ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้ พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizoctonia solani, Pythium* spp. และ *V. dahliae* นอกจากนี้สารไซเดอร์โรฟอร์ยังกระตุ้นให้พืชสร้างระบบการต้านทาน (induced systemic resistance) เช่น *P. fluorescens* WCS374 จะสร้าง pyoverdine ซึ่งกระตุ้นให้ผักกาดหัวต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองได้ (Leeman et al., 1996) ในทางกลับกันเมื่อทำการ mutant เชื้อ *P. aeruginosa* 7NSK2 ที่สามารถสร้าง salicylic acid หรือ pyocyanin จะทำให้เชื้อดังกล่าวไม่สามารถต้านทานเชื้อ *Botrytis cinerea* จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าสารไซเดอร์โรฟอร์ที่สร้างโดยเชื้อ *Pseudomonas* มีบทบาททั้งในด้านการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และกระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อม

2.3.2.2 การเป็นปรสิต (Parasitism)

เชื้อที่สามารถเจริญเบียดเบียนเชื้อสาเหตุโรคได้โดยอาศัยอาหารจากเชื้อสาเหตุโรคพืช เรียกว่า ปรสิต (parasite) โดยเชื้อดังกล่าวจะต้องสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช เอนไซม์จะถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์และขับออกมาภายนอกเพื่อกระบวนการย่อยสลาย เอนไซม์ย่อยสลาย เช่น ไคติเนส, เบตา- 1,3 กลูคาเนส, เซลลูเลส, ไลเปส และ โปรตีเอส เป็นต้น

เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินให้เป็นโมโนเมอร์ของไคติน คือ เอ็น- อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine: NAG) ไคตินเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมกันของ เอ็น- อะซิทิลกลูโคซามีน ด้วยพันธะเบตา- ไกลโคซิดิก (beta-1,4-glycosidic) (Felse and Panda, 1999) ไคตินเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรา และ exoskeleton ของพวกครัสทาเชียน (crustacean) และอาร์โทปอด (arthropods) ไคติเนส พบอย่างกว้างขวางในธรรมชาติ ทั้งแมลง พืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ เอนไซม์ไคติเนส ที่มีอยู่ในพืชจะทำหน้าที่ในระบบป้องกันตัวเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น fluorescent pseudomonad และ *Bacillus* spp. จะสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา และไส้เดือนฝอยได้ (Naosekpam et al., 2006) ซึ่ง fluorescent pseudomonad จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ (Viswanathan and Samiyappan, 2000) และสร้างเอนไซม์ไคติเนส ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* สาเหตุโรค Carnation wilt เชื้อ *P. fluorescens* สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ และเมื่อทำการศึกษาโปรตีนไคติเนส โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 43 กิโลดาลตัน และ 18.3 กิโลดาลตัน หลังจากการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และนำโปรตีนดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราพบว่าโปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Naosekpam et al., 2006)

เอนไซม์เบตา- 1,3 กลูคาเนส (beta-1,3 glucanase) เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการย่อยสลายโพลิเมอร์ของเบตา-1,3 กลูแคน (beta-1,3 glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas cepacia* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani, S. rolfsii* และ *Pythium ultimum* โดยการผลิตเอนไซม์เบตา- 1,3 กลูคาเนส (Fridlender et al., 1993) เชื้อ fluorescent *Pseudomonad* PGC2 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเบตา- 1,3 กลูคาเนส ได้สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.0 เป็นเวลา 6 วัน และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตา- 1,3 กลูคาเนส จะมีความสำคัญมากกว่าเอนไซม์ไคติเนสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *Phytophthora*

capsici เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. solani* และ *P. capsici* จะประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ เบตา-1,3 กลูแคนมากกว่าสารไคติน (Naveen et al., 2007; Nagarajkmar et al., 2004)

2.3.2.3 การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและปลดปล่อยออกมาในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช การสร้างสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัย สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ *Pseudomonas* เช่น ฟีนาซีน (phenazine) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* ความสนใจที่มีต่อสารฟีนาซีนนั้นจะเน้นที่สมบัติทางชีวภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารลดและควบคุมโรคต่างๆในพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เช่นในการศึกษาที่ผ่านมา phenazine-1-carboxylic acid (PCA) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. fluorescens* ต้านการเกิดโรค take-all ในรากข้าวสาลีที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Gaeumannomyces graminis* var. *fritici* และ phenazine-1-carboxamide (PCN) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. chlororaphis* ควบคุมโรครากเน่าในมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *F.oxysporum f.* sp. *radicis-lycopersici* สารออกฤทธิ์อื่น ๆ เช่น 2,4-diacetyploroglucinols, pyrrolnitrin และ pyoluteorin จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช

2.3.3 การนำเชื้อ *Pseudomonas* ไปใช้การควบคุมโรคพืช

การนำเอาเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ไปใช้ควบคุมโรคพืชนั้นจะมีกรรมวิธีที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละวิธีอาจมีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง การศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Pseudomonas* จึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ที่ดีควรมีคุณสมบัติเจริญเติบโตได้ดีทุกสภาวะแวดล้อม ตลอดจนการทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดี

ปัจจุบันยังไม่มีการผลิตหัวเชื้อ *Pseudomonas* ใช้ในเชิงการค้าภายในประเทศไทย แต่มีรายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas* เป็นหัวเชื้อเชิงการค้าในต่างประเทศ เช่น BlightBan A506 ผลิตจากเชื้อ *P. fluorescens* สามารถนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่เข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น อัลมอนด์ แอปเปิ้ล เชอรี่ มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ และลูกพีช เป็นต้น

จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่า *Pseudomonas* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช และสามารถนำมาใช้ในการบำรุงดินได้เนื่องจากส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.4. น้ำหมักชีวภาพ

ปัจจุบันประเทศไทยให้ความสำคัญกับการพัฒนาการเกษตรแบบยั่งยืนโดยอาศัยระบบเกษตรธรรมชาติเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพทั้งของผู้ผลิตและผู้บริโภค นอกจากนี้ยังต้องการลดปริมาณการใช้สารเคมี เพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทำให้คุณภาพชีวิตของคนไทยดีขึ้น น้ำหมักชีวภาพเป็นภูมิปัญญาของเกษตรกรไทยที่ได้รับความสนใจกันมากเพราะมีประโยชน์ในทางการเกษตร ทำได้ง่าย และใช้วัสดุเหลือทิ้งในครัวเรือนหรือที่มีในท้องถิ่นนั้น ๆ

น้ำหมักชีวภาพ หมายถึง สารละลายสีน้ำตาลเข้มที่เกิดขึ้นจากการนำเอาเศษวัสดุเหลือทิ้งจากพืชผัก สัตว์ ในท้องถิ่น มาหมักกับกากน้ำตาล และเกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่ติดมากับวัสดุหมัก ซึ่งในแต่ละท้องถิ่นจะมีการใช้วัตถุดิบ และกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน ทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป

2.4.1 คุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพ

ออมทรัพย์และคณะ, 2547. ได้รายงานคุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพไว้ดังนี้

2.4.1.1 คุณสมบัติทางเคมี

ความเป็นกรดด่าง (pH) มีความสัมพันธ์กับชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปน้ำหมักชีวภาพมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.5 – 5.6 ค่า pH ที่เหมาะสมกับพืชควรอยู่ในช่วง 6 – 7 ค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity :EC) เป็นตัวเลขแสดงให้ทราบถึงปริมาณความเข้มข้นของแร่ธาตุและสารประกอบอนินทรีย์ต่างๆที่ละลายอยู่ในน้ำหมักชีวภาพ ถ้ามีค่า EC สูงแสดงว่าน้ำหมักชีวภาพนั้นมีปริมาณแร่ธาตุละลายอยู่มาก ค่า EC ของน้ำหมักชีวภาพโดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 2 – 12 desicemen/meter (ds/m) ซึ่งที่เหมาะสมกับพืชควรจะอยู่ต่ำกว่า 4 ds/m

2.4.1.2 ความสมบูรณ์ของการหมัก

พิจารณาจากค่าความสัมพันธ์ของปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) และปริมาณไนโตรเจน (C/N ratio) น้ำหมักชีวภาพอาจมีค่า C/N ratio อยู่ระหว่าง 1/2 - 70/1 ซึ่งถ้าน้ำหมักชีวภาพมีค่า C/N ratio สูง เมื่อนำไปฉีดพ่นบนต้นพืชอาจแสดงอาการใบเหลืองเนื่องจากขาดธาตุไนโตรเจนได้ พบว่า C/N ratio ที่เหมาะสมต่อความต้องการของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 20/1

2.4.1.3 ธาตุอาหารพืช

น้ำหมักชีวภาพจากพืชมีทั้งธาตุอาหารหลักได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโปรตัสเซียม (K) และธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม (Ca) แมกเนเซียม (Mg) และกำมะถัน (S) พบว่าในน้ำหมักชีวภาพจากพืชมีปริมาณธาตุอาหารหลักได้แก่ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) 0.03 - 1.66 % ฟอสฟอรัส (total P_2O_5) มีตั้งแต่ไม่พบเลยจนถึง 0.4 % โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ (water soluble K_2O) 0.05-3.53 % แต่ถ้าใช้ปลาหมักพบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 1.06-1.70 % ฟอสฟอรัส 0.18-1.14 % โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ 1.0-2.39 %

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 02 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 248109
เลขเรียกหนังสือ

ปริมาณธาตุอาหารรองที่พบได้แก่ แคลเซียม 0.05 - 0.49 % ในน้ำหมักชีวภาพจากพืช และ 0.29-1.0 % ในน้ำหมักชีวภาพจากปลา ส่วนแมกนีเซียมและซัลเฟอร์ พบทั้งในน้ำหมักชีวภาพจากพืชและปลาปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 0.1- 0.37 %

ปริมาณธาตุอาหารเสริมได้แก่ เหล็ก มีปริมาณ 30-350 พีพีเอ็ม (ppm) ในน้ำหมักชีวภาพจากพืช และ 500-1,700 พีพีเอ็ม ในน้ำหมักชีวภาพจากปลา น้ำหมักชีวภาพทั้งจากพืชและปลาพบเกลือคลอไรด์มีปริมาณสูงถึง 2,000-11,000 พีพีเอ็ม แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และโมลิบดินัม มีปริมาณน้อยตั้งแต่ตรวจไม่พบเลย จนถึง 130 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ยังพบสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ฮิวมัส กรดอะมิโนหลายชนิด

2.4.1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators)

จากการสำรวจและรวบรวมน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรผลิตจำนวน 177 ตัวอย่างมาวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 3 กลุ่มคือ ออกซิน (auxins) กรดอินโดลอะซิติก (indoleacetic acid : IAA) จิบเบอเรลลิน (gibberellins) ไซโตไคนิน (cytokinins) และไคนีทิน (kinetin) พบว่าประมาณร้อยละ 90 ของตัวอย่างพบกรดอินโดลอะซิติก ในน้ำหมักชีวภาพจากสัตว์ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยสูงกว่าน้ำหมักชีวภาพจากพืช ส่วนน้ำหมักชีวภาพจากผลไม้ ปลา หอย มีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกสูงกว่าน้ำหมักชีวภาพที่ทำจากวัสดุหลักอื่น ๆ ส่วนซีอะทิน และไคนีทินพบทั้งน้ำหมักชีวภาพจากพืชและสัตว์ แต่พบในปริมาณน้อย

2.4.1.5 สารควบคุมแมลง

สารควบคุมแมลงที่มีสมบัติไล่แมลงที่พบในน้ำหมักชีวภาพ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแอลกอฮอล์ กลุ่มเบนซีนไดออล (benzene diol) กลุ่มฟีนอล (phenol) กลุ่มเอสเทอร์ (ester) จากการสำรวจและรวบรวมน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรผลิตจำนวน 180 ตัวอย่างมาวิเคราะห์สารควบคุมแมลงพบว่าน้ำหมักชีวภาพจากพืชผัก หรือผลไม้ พบสารกลุ่มเบนซีนไดออล และพบมากในกลุ่มพืชสมุนไพร เช่นน้ำหมักชีวภาพจากพืชสมุนไพรที่มีตะไคร้หอมจะได้สารสำคัญในกลุ่มแอลกอฮอล์คือ ซิโตรเนลลอล (citronellol) และเจอรานิออย (geraniol) สำหรับไล่แมลง

2.4.1.6 การควบคุมโรคพืช

น้ำหมักชีวภาพหลายสูตรมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ มีรายงานว่าน้ำหมักชีวภาพจากถั่วแขกผสมกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1 ความเข้มข้น 300 มล./น้ำ 20 ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ 100 %

2.4.1.7 จุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพมีทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียพบในสกุลบาซิลัส (*Bacillus*) กลุ่มแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) และกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) เป็นต้น เชื้อราเส้นใยพบในกลุ่มไฟโคมัยสิท (Phycomycetes) ได้แก่ *Mucor* เชื้อยีสต์พบในกลุ่ม *Saccharomyces* และ *Candida* เป็นต้น