



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สุขภาพพืช)

ปริญญา

สุขภาพพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา
สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Damping-off of Cucumber
Seedlings Caused by *Pythium aphanidermatum*

نامผู้วิจัย นางสาวณัฐสุดา คำยอด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มทววิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา
สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Damping-off of Cucumber
Seedlings Caused by *Pythium aphanidermatum*

โดย

นางสาวณัฐสุดา คำยอด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สุขภาพพืช)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณัฐสุดา คำยอด 2557: ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้น
กล้าแตงกวาสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สุขภาพ
พืช) สาขาสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
วรรณวิไล อินทนู, วท.ด. 74 หน้า

แยกเชื้อแบคทีเรีย 112 ไอโซเลต จากดินรอบราก 56 ไอโซเลต และจากใบแตงกวา 56 ไอโซเลต ด้วย
วิธีเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) บนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B
(KB) Thornston's medium (TH) และ yeast extract-malt extract agar (YM) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา
ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าระดับดิน
(damping-off) ของแตงกวาด้วยวิธี dual culture test บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ในห้องปฏิบัติการ
สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 13.75-55.28
เปอร์เซ็นต์ จำนวน 13 ไอโซเลต จึงนำไปทดสอบการควบคุมโรคเน่าระดับดินของแตงกวาในสภาพเรือนปลูก
พืชทดลอง ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 cfu/มิลลิลิตร นาน 15 นาที
ก่อนนำไปปลูกในดินผสมเชื้อโรค ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยแบคทีเรียไอโซเลต SDN-23 มี
เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูกที่ 14 วัน คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรค
และการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และพบแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 ช่วยให้เมล็ด
แตงกวามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 7 วันและมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 14 วัน ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี
metalaxyl 35 SD และลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแตงกวาเป็นเวลา 14 วันได้
จากนั้นคัดเลือกทั้ง 2 ไอโซเลต ทำเครื่องหมายเพื่อเป็นตัวตรวจเชื้อแบคทีเรียโดยให้ด้านทานสารปฏิชีวนะ
rifampicin ที่ความเข้มข้น 10 ppm พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 มี
ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีกว่าทุกไอโซเลต จึงพัฒนาเป็น
สูตรสำเร็จชนิดผงดิน ทดสอบในสภาพแปลงปลูก พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซ
เลต M3-SDN-9 และ M5-LBN1-5 ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูก 14 และ 28 วัน และลด
เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นกล้าแตงกวาที่มีอายุ 28 วัน ได้เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma*
harzianum สายพันธุ์ CB-Pin-01 เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ลดลงเมื่อ
เปรียบเทียบกรรมวิธีควบคุม ซึ่งการแช่เมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลต มีน้ำหนักผลผลิตของต้น
แตงกวาเทียบเท่ากับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

Natsuda Kumyod 2014: Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Damping-off of Cucumber Seedlings Caused by *Pythium aphanidermatum*. Master of Science (Plant Health), Major Field: Plant Health, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 74 pages.

Total of 112 isolates of bacteria were isolated from root zone soil (56 isolates), and leaves (56 isolates) of cucumber at Kamphaeng Sean District in Nakhon Pathom. Province by serial dilution on four media, including nutrient glucose agar (NGA), King's medium B (KB), Thornston's medium and yeast extract-malt extract agar (YM). The isolated bacteria were evaluated by dual culture test on potato dextrose agar (PDA) medium for the efficacy to inhibit mycelial growth of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of damping-off of cucumber seedling. Results showed that 13 isolates of bacteria effectively inhibited mycelial growth of *P. aphanidermatum* by 13.75-55.28%. Selected bacteria were further tested for the efficacy to control damping-off of cucumber seedlings under greenhouse condition by soaking seeds in bacterial cell suspension (10^8 cfu/ml) for 15 minutes before sowing in the pathogen infested soil. The results indicated that isolate SDN-23 was the most promising isolate which provided the highest percentage (86.67%) of survived seedlings after planting for 14 days. The efficacy of isolate SDN-23 was higher than the control (with pathogen) and seeds treated with metalaxyl 35 SD. The efficacy of antagonistic isolates SDN-9 and SDN-23 to provide the germination percentages of 7-day-old seedlings and survived seedlings after planting for 14 days were comparable to the use of metalaxyl 35 SD. These isolates also reduced populations of *P. aphanidermatum* in cucumber planting soil at 14 days after planting. Two selected isolates were developed as 10 ppm rifampicin antibiotic resistant markers. Results showed that M3-SDN-9 and M5-SDN-23 effectively to inhibited mycelial growth of *P. aphanidermatum*. They were developed as soil formulation for further testing under field condition. The isolate M3-SDN-9 and M5-SDN-23 increased the survived seedlings after planting for 14 days and reduced the percentages of post-emergence damping-off after planting for 28 days. Their efficacies were comparable to the use of *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01). The percentages of root colonized with *P. aphanidermatum* were reduced. The efficacy of these antagonistic bacteria to provide cucumber yield weights were comparable to the use of *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วรรณวิไล อินทนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ และอบรมสั่งสอน เรื่องคุณธรรมและจริยธรรม เรื่องการดำรงชีวิต ให้คำแนะนำ ดูแล เอาใจใส่ตลอดตั้งแต่เริ่ม การศึกษาจนกระทั่งสิ้นสุดของการทำวิทยานิพนธ์และกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.คณินดิษฐ์ เจริญวรารากร และรศ.ดร. วาริน อินทนา ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยการทดลอง ขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุน ห้องปฏิบัติการและวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวคำยอด ที่ให้แรงบันดาลใจ ความรักความอบอุ่น ให้คำสอนที่ล้ำค่าในการดำเนินชีวิต ตลอดจนสนับสนุนด้านการศึกษาตั้งแต่เยาว์วัยจนถึงปัจจุบัน และ ขอขอบคุณพี่ประทุม พี่อังคณา รื่นนุสสาร นายจาตุรงค์ ประทุมทอง นางสาวลลิตลักษณ์ ศรีถวิล และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืช ที่ให้มิตรภาพ สิ่งที่ดี รอยยิ้ม ความจริงใจ คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ ในการทำงานวิจัย และขอบคุณที่อยู่เคียงข้างในการใช้ชีวิตใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ครอบครัว ครูอาจารย์ ผู้ ประสาทวิชา ความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้สนับสนุนเป็นกำลังใจตลอดมาจนสำเร็จ การศึกษา

ณัฐสุดา คำยอด

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	71
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	74

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากและใบของ แตงกวา เมื่อแยกเชื้อด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate ด้วยการใช้อาหาร แยกเชื้อ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง	32
2	ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากและใบของแตงกวาการ ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ด้วยวิธี dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน	34
3	รัศมีโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> และความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) ของแบคทีเรีย ปฏิชีวนะบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน	35
4	ค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นแตงกวาที่รอดตาย 14 วัน หลังจากแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอย ของแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็น เวลา 15 นาที ก่อนปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง	39
5	ค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> และค่า ปริมาณ เชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ในดินหลัง ปลูกเป็นเวลา 14 วันในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง	44
6	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดั้งเดิมและแบคทีเรียปฏิชีวนะ พันธุ์กลายที่ต้านทาน rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm ในการยับยั้งการเจริญ ของเส้นใยเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน	49
7	ค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นแตงกวาที่ รอดตาย 14 และ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ด เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่พบเชื้อรา <i>Pythium</i> sp. และเชื้อสาเหตุโรคอื่นจากเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก เมื่อต้นแตงกวาอายุ 14 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง	56
9	ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง	57
10	ค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> และค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่อายุ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง	61
11	อิทธิพลของแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายต่อน้ำหนักผลผลิตของต้นแตงกวาเก็บผลผลิต 20 วัน ในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการโรคเน่าระดับดินและลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i>	30
2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้า แตงกวาในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อต้นกล้าแตงกวามีอายุที่ 14 วัน	41
3	การเข้าครองครองรากแตงกวาของ <i>Pythium aphanidermatum</i> ในสภาพเรือน ปลูกพืชทดลอง-บนอาหาร modified BNPR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	46
4	การตรวจนับปริมาณเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ในดินในสภาพเรือน ปลูกพืชทดลองบนอาหาร modified BNPR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47
5	รูปร่างเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลาย ทั้ง 3 ไอโซเลต	51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFU	=	จำนวนโคโลนีต่อหนึ่งหน่วย (colony forming unit)
g	=	กรัม (gram)
KB	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (King's medium B)
LBN	=	แบคทีเรียที่แยกได้จากใบในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธีการบดใบ
LWN	=	แบคทีเรียที่แยกได้จากใบในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธีการล้างใบ
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
NGA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose agar)
NGB	=	อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose broth)
nd	=	ไม่ได้ตรวจผล (not determind)
O.D.	=	ค่าความขุ่น (Optical density)
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
SDN	=	แบคทีเรียที่แยกมาจากดินในจังหวัดนครปฐม (soil dilution Nakhonpathom)
%	=	เปอร์เซ็นต์

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา
สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Damping-off of
Cucumber Seedlings Caused by *Pythium aphanidermatum*

คำนำ

แตงกวาเป็นพืชที่มีบทบาทต่อการค้าทั้งในและต่างประเทศ นิยมนำมารับประทานกันมาก ทั้ง เป็นผักสดและประกอบอาหารเช่น การนำไปแกงจืด ผัด หรืออาจแปรรูปเป็นแตงกวาดอง และมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ (สรานนท์, 2552) แตงกวาจึงเป็นผักเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เกษตรกรผู้ปลูกมักประสบปัญหาเรื่องโรคอยู่เสมอ โรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ของแตงกวาเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลต่อการปลูกแตงกวา ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* การเข้าทำลายของเชื้อแสดงอาการได้สองระยะคือ ระยะโรคเน่าของพืชก่อนโผล่พื้นดิน (Pre-emergence damping-off) และระยะโรคเน่าระดับดินหลังกล้าออกโผล่พื้นดินแล้ว (Post-emergence damping-off) เมื่อต้นกล้าแตงกวาถูกเชื้อเข้าทำลายจะแสดงอาการเหี่ยวเฉา น้ำบริเวณรากและลำต้นที่ใกล้กับระดับดิน ต้นกล้าแตงจะเริ่มตายก่อนที่จะเหี่ยว (Thomas *et al.*, 1998) การป้องกันโรคโดยการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคเน่าระดับดินส่งผลให้เชื่อมีการปรับตัวเพื่อต้านทานต่อสารเคมีประเภทดูดซึม ส่งผลให้เกิดสารตกค้างในสภาพแวดล้อม การควบคุมเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดการใช้สารเคมีและลดปัญหาสารเคมีตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม

การใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีโดยอาศัยจุลินทรีย์ปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. เชื้อรา *Gliocladium* sp. เชื้อแบคทีเรียเช่น *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด หรือมีกลไกต่างๆที่ขัดขวางกลไกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค ทำให้ปริมาณของเชื้อโรคที่มีอยู่ลดลงเมื่อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะได้มีโอกาสครอบครองเมล็ดหรือบริเวณรอบราก (rhizosphere zone) เพื่อป้องกันการเจริญเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อโรค หรือไม่ให้เชื้อโรคได้มีโอกาสผลิตสารปฏิชีวนะ หรือน้ำย่อยพวก hydrolytic enzymes หรือ

มวลชีวภาพของเชื้อโรค (จิระเดช, 2549) ดังนั้นการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือก
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวใบ และดินบริเวณรอบรากพืชที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับ
ดินในแปลงปลูกเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้ปลูกและผู้บริโภคทดแทนการ
ใช้สารเคมี



วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกได้จากดินบริเวณราก ใบของ
แตงกวาและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้คัดเลือกแล้วในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium*
aphanidermatum บนอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรค
เน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืช
ทดลอง
3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรค
เน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในแปลงปลูกพืช

การตรวจเอกสาร

แตงกวาเป็นพืชที่มีบทบาทต่อการค้าทั้งในและต่างประเทศ นิยมนำมารับประทานกันมาก ทั้งเป็นผักสดและประกอบอาหาร เช่น การนำไปแกงจืด ผัด หรืออาจแปรรูปเป็นแตงกวาดอง และมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ (ศรานนท์, 2552) จัดเป็นพืชผักที่อยู่ในตระกูลแตง (Cucurbitaceae) มีหลายชนิด ได้แก่ แตงกวา แตงร้าน ฟักทอง มะระ บวบ เป็นต้น (อนงค์, 2536) มีอายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น โดยใช้เวลาเพียง 30-45 วัน แตงกวาสามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด มีค่า pH ประมาณ 5.5-6.5 แต่จะชอบดินร่วนปนทรายและดินมีความชื้นพอเหมาะ มีการระบายน้ำดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส สภาพอุณหภูมิในประเทศไทยสามารถปลูกแตงกวาได้ตลอดปี แต่ช่วงที่ปลูกได้ดีที่สุดคือ ช่วงปลายฤดูฝน-ฤดูหนาว (จิรวัดน์, 2551)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวา

รากแตงกวาเป็นระบบรากแก้ว (tap root system) มีรากแขนงเป็นจำนวนมาก ลำต้นเป็นเถาไม่เลื้อยเป็นเหลี่ยม มีข้อยาว 10-20 เซนติเมตร ใบมีก้านยาว 5-15 เซนติเมตร ใบหยาบมีขนนุ่มใบ 3-5 มุม ใบแหลม ใบใหญ่แบบ palmate มีเส้นใบ 5-7 เส้น ลักษณะดอกของแตงกวาภายในต้นเดียวกัน ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอก ดอกมีสีเหลือง มีกลีบเลี้ยงสีเขียวและสีเหลืองอย่างละ 5 กลีบ รังไข่มีลักษณะกลมยาว 2-5 เซนติเมตร มีปมฐานของหนามและขนชัดเจน ส่วนของยอดเกสรตัวเมียมี 2-5 แฉก ส่วนดอกเพศผู้เป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ มีละอองเกสรตัวผู้ 3 อัน มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหมือนดอกเพศเมีย ผลมีลักษณะกลมยาวทรงกระบอก ความยาวผลระหว่าง 5-40 เซนติเมตร มีไส้ภายในผล ผลมีสีขาว เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้ม

วิธีการปลูกแตงกวา

1. การเตรียมดิน ก่อนปลูกแตงกวา ไถพรวนดินตากไว้ประมาณ 7-10 วัน เพื่อทำลายวัชพืช และศัตรูพืชบางชนิดที่อยู่ในดิน แล้วเตรียมแปลงขนาดกว้าง 1 เมตร ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ปรับโครงสร้างของดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต การเตรียมหลุมปลูกกำหนดระยะระหว่างต้นประมาณ 60-

80 เซนติเมตร ระหว่างแถวประมาณ 1 เมตร การใส่ปุ๋ยเคมีรองพื้นใช้สูตร 15-15-15 ในอัตรา 30-50 กิโลกรัมต่อไร่ อาจใช้ถุงพลาสติกคลุมดินเพื่อรักษาความชื้นในดิน ป้องกันการงอกของวัชพืช

2. การเตรียมพันธุ์ เป็นขั้นตอนที่สำคัญดังต่อไปนี้

2.1 คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ ควรนำไปคลุกสารเคมีป้องกันศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ด และก่อนใช้เมล็ดทุกครั้งควรทำการทดสอบความงอกของเมล็ดก่อนปลูก

2.2 การเตรียมดินเพาะกล้า อัตราส่วนดิน: ปุ๋ยคอก 3 ต่อ 1 และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 0.5 กิโลกรัมต่อต้นกล้า 1 ไร่ คลุกให้เข้ากันแล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกขนาด 6×10 เซนติเมตร

2.3 ทำการบ่มเมล็ด โดยนำเมล็ดบรรจุถุงพลาสติกที่เจาะรูพูนแร่ในสารละลายเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น แคปแทน ออโรไซค์ ผสม 5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร แช่เมล็ดนาน 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อราที่ผิวเมล็ด จากนั้นนำมาแช่น้ำ 4 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มในผ้าชุบน้ำ บรรจุอยู่ในถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่น บ่มในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง หลังจากรากงอกยาว 0.5 เซนติเมตร จึงนำไปเพาะ นำเมล็ดที่ได้บ่มไว้หยอดลงแต่ละถุง จำนวนถุงละ 1 เมล็ด แล้วใช้ดินผสมหยอดกลบประมาณ 1 เซนติเมตร

3. การดูแลรักษากล้า หลังจากหยอดเมล็ดแล้ว ต้องให้น้ำทันทีโดยวิธีการฉีดพ่นให้เป็นฝอยละเอียด ในช่วงฤดูร้อนควรจะให้วันละ 1 ครั้ง ถุงเพาะกล้าควรเก็บไว้ในที่แดดไม่จัดหรือมีการใช้วัสดุกันแสงไม่ให้มากกระทบต้นกล้ามากเกินไป เมื่อดันกล้ามีใบจริงประมาณ 3-4 ใบ จะอยู่ในระยะพร้อมที่จะย้ายปลูก

4. การปลูก พบว่ามีการปลูกทั้งวิธีการหยอดเมล็ดโดยตรงและเพาะกล้าก่อนแล้วย้ายปลูก การหยอดเมล็ดโดยตรงอาจมีความสะดวกในการปลูก แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองเมล็ด และจะต้องดูแลระยะเริ่มงอกในพื้นที่กว้าง ดังนั้นการใช้วิธีการเพาะกล้าก่อน มีข้อดีหลายประการ เช่น ประหยัดเมล็ดพันธุ์ ดูแลรักษาง่าย ต้นกล้ามีความสม่ำเสมอ ประหยัดค่าแรงงานในระยะกล้า เป็นต้น สำหรับการย้ายปลูกนั้น เตรียมหลุมปลูกในระยะที่กำหนด นำต้นกล้าย้ายลงในหลุม โดยการฉีกถุงพลาสติก

ที่ใช้เพาะกล้าออกแล้วย้ายลงในหลุมปลูก ช่วงเวลาที่จะย้ายกล้านั้นควรย้ายช่วงเวลาประมาณ 17.00 น. จะทำให้ต้นกล้าสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดียิ่งขึ้น

การปฏิบัติดูแลรักษาแตงกวา

การให้น้ำ หลังจากย้ายกล้าปลูกแล้ว ต้องให้น้ำทันที ระบบการให้น้ำนั้นอาจจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่ แต่ระบบที่เหมาะสมกับแตงกวา คือ การให้น้ำตามร่อง เพราะจะทำให้ลำต้น และใบไม่ชื้น ลดการลุกลามของโรคพืชทางใบ ช่วงเวลาการให้น้ำในระยะแรกควรให้ 2-3 วันต่อ ครั้ง และเมื่อต้นแตงกวาเริ่มเจริญเติบโตแล้วจึงปรับช่วงเวลาการให้น้ำให้นานขึ้น ควรให้น้ำกระจายในพื้นที่ให้สม่ำเสมอทั่วทั้งแปลง และตรวจดูความชื้นในดินไม่ให้สูงเกินไปจนกลายเป็นแฉะ เพราะจะทำให้รากเน่าได้

การใส่ปุ๋ย ระยะเตรียมดิน ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยหมัก อัตรา 1-2 ตันต่อไร่ และ ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 12-24-12 อัตราประมาณ 20-30 กิโลกรัมต่อไร่ เหมือนในระยะแตงกวา ออกดอก ส่วนหลังย้ายปลูกประมาณ 7 วัน ใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจน เช่น ยูเรีย หรือ แอมโมเนียซัลเฟต ในอัตราประมาณ 20 กิโลกรัมต่อไร่ (ศรานนท์, 2552)

ความสำคัญของเชื้อรา *Pythium* spp.

เชื้อรา *Pythium* spp. ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผักหลายชนิด กระหล่ำ กระเจี๊ยบ ผักบุ้ง มะเขือเทศ หน่อไม้ฝรั่ง แตงกวา (Grisarapndha, 1987) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ของกล้าพืช และ โรคโคนเน่า (foot rot) เป็นต้น ซึ่งเชื้อเข้าทำลายพืชอย่างรวดเร็วทำให้เมล็ดพืช ไม่งอก เมล็ดเน่า (seed rot), ต้นกล้าเน่าระดับดิน (seedling damping-off) และ รากเน่า (root rot) ในพืชหลายชนิด กล้าพืชมีลักษณะเป็นแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาล เซลล์พืชบวมและยุบตัวลง ความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรค พบการเข้าทำลายน้อยกับพืชที่มีอายุ จะพบการเกิดโรค บ่อยเมื่ออยู่ในแปลงเพาะกล้าหรือตายหลังจากที่ย้ายปลูก (วิชัย, 2546; George, 1997) สำหรับในประเทศไทยพบ 6 species ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคกับพืชผัก *P. deliense*, *P. aphanidermatum* และ *P. vexans* เกิดโรคกับเมล็ด และรากเน่า โคนเน่าระดับดิน และ *P. splendens* ทำให้เกิดโรครากเน่าและโคนเน่าของพริกไทยส่วนเชื้อรา *P. oligandrum* และ *P. sinense* ไม่ทำให้เกิดโรครุนแรงและไม่ทำให้เกิดโรค (อุบลและคณะ, 2525; Grisarapndha, 1987)

การจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Pythium* sp.

Kingdom Straminipilla

Division Eumycota

Subdivision Mastigomycotina

Class Oomycetes

Order Peronosporales

Family Pythiaceae

Genus *Pythium*

เชื้อรา *Pythium* spp. เป็นเชื้อรากลุ่มที่ใหญ่ที่สุดใน Family Pythiaceae ประกอบด้วย 92 species บาง species เป็น saprobe และอาศัยอยู่ในน้ำ ขณะที่บางพวกเป็น parasite แบบชั่วคราวของพืชและสัตว์ตัวเล็กๆ ที่อยู่ในน้ำ แต่ส่วนใหญ่เป็นพวกที่อาศัยอยู่ในดิน (soil inhabitant) ในดินที่แฉะ (วิชัย, 2546) เส้นใยไม่มีผนังกั้น (non-septate hypha) มีรูปร่าง 3 แบบคือ filamentous type, lobate inflated type และ spherical type มีความกว้างประมาณ 10 ไมครอน เจริญแตกกิ่งก้านได้ดี เกิด sporangia ปลายหรือกลางเส้นใย (terminal or intercalary) มีลักษณะเป็นแบบ inflated filamentous เป็นส่วนของเส้นใยที่บวมพองมักเกิดที่ปลายเส้นใยเป็นกลุ่ม

การเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

เชื้อรา *P. aphanidermatum* จะสร้างเส้นใยสีขาว เจริญแตกกิ่งก้านเกิด sporangia ที่ปลายหรือกลางเส้นใย (terminal or intercalary) มีลักษณะกลมรี งอกเป็น germ tube เข้าทำลายพืชได้ หรืองอกเป็นเส้นใยสั้นแล้วเกิด vesicle ซึ่งให้กำเนิด zoospores ภายใน เมื่อ zoospores ถูกปล่อยออกมาสามารถว่ายน้ำระยะหนึ่ง ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมจากนั้นเปลี่ยนเป็น encysted zoospores ที่ไม่มี flagella และเข้าทำลายพืชโดยงอกเป็น germ tube แทงเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช สปอร์ที่งอกและเข้าทำลายพืชไม่ได้อาจสร้าง vesicle ขึ้นใหม่ แล้วเกิด secondary zoospores อีกได้ในการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ เส้นใยจะสร้าง oogonia และ antheridia ผสมกันได้เป็น oospore งอกเป็นเส้นใยเจริญต่อไป และสามารถพักตัวหรืออยู่ข้ามฤดู หรือเจริญเป็น vesicle เพื่อกำเนิด zoospore ว่ายน้ำเข้าทำลายพืชได้ต่อไป การงอกของ oospore คล้ายกับการงอกของ sporangia ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการงอก ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส สปอร์จะงอกเป็น germ tube หากต่ำกว่า 10 - 18 องศาเซลเซียส จะสร้าง zoospores และเส้นใยที่งอกเป็นสปอร์มีโอกาสสัมผัสกับพืช

เชื้อสามารถสร้าง pectinolytic enzymes เพื่อย่อย pectins, proteolytic enzymes ย่อยสลาย protoplasts และ cellulolytic enzymes ย่อย cell walls ให้เซลล์พืชสลายตัวและยุบตัวลง จากการย่อยสลายของเอนไซม์ ทำให้เมล็ดและต้นกล้าพืชเน่าและตาย ก่อนที่จะตรวจพบเส้นใยของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช (จิระเดช, 2549; ศักดิ์, 2537; สมศิริ, 2529; George, 1997) เชื้อรา *P. aphanidermatum* ถือเป็นเชื้อราที่สำคัญที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชผักหลายชนิด ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโต (จิระเดช, 2549) เข้าทำลายกล้าพืชที่อุณหภูมิสูง 32-37 องศาเซลเซียส มีความกว้างของเส้นใย 2-8 ไมโครเมตร sporangia จะสร้างเส้นใยแบบ lobulate แตกกิ่งก้านไม่สม่ำเสมอ vesicles มีลักษณะกลมและมีขนาดเล็กกว่า zoospores ส่วน oogonia มีลักษณะกลมพื้นผิวเรียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16-34 ไมโครเมตร antheridia สามารถเข้าจับกับ oogonia แบบ intercalary และ hypogynous ได้เป็น oospore ซึ่งมีความกว้าง 12-18 ไมโครเมตร (Thomas *et al.*, 1998; Yong nian, 1989) บาดแผลปรากฏใต้ดินและบริเวณลำต้นเชื่อมติดกับผิวดินหรือโคนต้นกล้าพืช (Susan, 1992)

ลักษณะการเข้าทำลายของโรคเน่าระดับดิน แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะตามอายุและระยะการเจริญเติบโตของพืช คือ

1. Pre- emergence damping-off หรือ seed rot อาการของโรคเกิดเนื่องจากเชื้อสาเหตุ เข้าทำลายเมล็ดหรือกล้าพืชส่วนที่อยู่ใต้ดินหรือระดับดิน หากดินนั้นมีเชื้อสาเหตุอยู่และสภาพแวดล้อมเหมาะสม เมล็ดจะอ่อนนุ่ม เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหี่ยวยุบและเน่า ถ้าเป็นต้นกล้าอ่อน เซลล์พืชจะถูกทำลายได้ง่าย เมื่อเชื้อราเข้าทำลายที่ส่วน hypocotyl และยอด (plumule) จุดที่เชื้อเข้าทำลายเกิดแผลช้ำน้ำสีค่อนข้างดำ แผลขยายใหญ่ขึ้น ทำให้ต้นอ่อนเน่าตายอย่างรวดเร็ว จึงไม่มีต้นกล้าโผล่เหนือดินให้เห็น

2. Post- emergence damping-off หรือ Seedling damping-off ต้นอ่อนที่โผล่พ้นดินแล้วถูกเชื้อเข้าทำลาย ปกติเชื้อจะเข้าทำลายที่รากแต่บางครั้งเข้าทำลายลำต้นหรือโคนต้นกล้าที่อยู่ระดับดินและใต้ดิน บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายเกิดเป็นแผลช้ำน้ำ ขยายใหญ่ขึ้นเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว รอบลำต้น ต้นกล้าจะหักพับลงในขณะที่ใบยอดยังเขียวอยู่ ต่อมาส่วนยอดจะเฉาและแห้งตายคล้ายถูกน้ำร้อน ต้นกล้าในแปลงเพาะจะแห้งตายเป็นหย่อมๆ โรคระบาดได้รวดเร็ว (สมศิริ, 2529 และ จิระเดช, 2549)

สาเหตุสำคัญของโรคเมล็ดเน่าและโรคเน่าระดับดินของพืชส่วนใหญ่ในประเทศไทยคือ *Pythium aphanidermatum* และ *P. deliense* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายพืชอยู่ในช่วง 25-36 องศาเซลเซียส ความชื้นสูง (Sinclair, 1982)

การเกิดโรคกล้าไหม้ของพืช เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *P. myriotylum* และ *P. ultimum* ในประเทศอเมริกาและตอนใต้ของประเทศแคนาดา ภายใต้อุณหภูมิที่สูงและเกิดความชื้นในพื้นที่กว้างใน 24-48 ชั่วโมง สามารถทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ (Couch, 1974) ส่วน zoospore ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เมื่อพักตัวจะสร้าง germ tube และสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืชภายในระยะเวลา 30 นาที หลังจากปลูกเชื้อที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ส่วนเส้นใยจะสร้าง appressorium และเมื่อเส้นใยเข้าไปเจริญในเนื้อเยื่อพืช ขบวนการเกิดโรคในเส้นใยจะเกิดขึ้นในเวลาเท่าๆกัน ไม่ว่าจะเป็นการปลูกเชื้อด้วย zoospore หรือเส้นใยที่เจริญแล้วจะสามารถทำให้พืชเกิดโรคได้รุนแรงกว่า oospore และเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานๆ หลายเดือนจะลดความรุนแรงของโรคลง ถ้าเชื้อที่แยกได้จากต้นพืชที่เป็นโรคใหม่ๆ เมื่อนำไปปลูกเชื้อบนพืชจะก่อให้เกิดอาการของโรคภายในเวลา 2-3 วัน (พงศเทพ, 2522; ภิญโญ, 2517) การเข้าทำลายพืชของ oospore สามารถทำให้เกิดโรคเน่าระดับดินของพืชต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ถ้าสูญเสียระดับของคาร์บอนภายใน oospore 25 เปอร์เซ็นต์ โดยสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของ oospore เกิดขึ้นมากที่สุดถ้าในวัสดุปลูกมีระดับความสามารถในการใช้น้ำในพืช (water-saturated soil) เท่ากับ 0 Kpa และที่ -1 Kpa นอกจากนี้ที่ระดับ -10 Kpa oospore จะไม่สูญเสียความสามารถในการเกิดโรค (Mondal and Hyakumachi, 2000)

การควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) และเชื้อราสาเหตุโรค

1. ก่อนปลูกควรปรับปรุงดินด้วยปูนขาวถ้าดินเป็นกรด และใส่ปุ๋ยอินทรีย์
2. ไม่ควรใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ใกล้โคนต้น
3. ควรปรับปรุงสภาพดินให้ร่วนซุย และไม่มีน้ำขังแฉะ
4. กำจัดเชื้อราในแปลงเพาะกล้า โดยใช้ไอน้ำร้อนและสารเคมีควบคุมเชื้อรา metalaxyl หรือ mancozeb พ่นหรือราดลงดิน ก่อนหว่านเมล็ดพืช
5. ทำลายต้นพืชที่เป็นโรค
6. ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., เชื้อรา *Gliocladium* sp. เชื้อแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis* (นิตยา, 2534 และจิระเดช, 2549)

การควบคุมโดยวิธีทางเคมี

การป้องกันและกำจัดโรคเน่าระดับดินอาจทำการฉีดพ่นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพ ไว้ป้องกันก่อนถึงฤดูกาลที่โรคจะระบาด หรือสภาพดินฟ้าอากาศเริ่มจะเหมาะสมต่อการเกิดโรค ก็สามารถช่วยป้องกันกำจัดโรคได้ทัน (อนงค์, 2536)

Suhas *et al.* (1991) รายงานว่าการใช้สารเคมี flutolanil ร่วมกับการใช้สารเคมี metalaxyl เพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizoctonia* spp. และ *Pythium* spp. ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวา สารเคมีติดไปกับผิวเมล็ด เป็นการป้องกันโรคก่อนลงปลูกในแปลง ช่วยให้เมล็ดแตงกวาออกและไม่เป็นโรค Hickman (1998) ทดลองนำดินแตงกวาปลูกลงดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการตากแดด อบด้วย methyl bromide และราดสาร metalaxyl พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคเน่าระดับดินของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้

Locke *et al.* (1983) พบว่าสารเคมี metalaxyl เมื่อนำมาคลุกเมล็ด snapbean (*Phaseolus vulgaris*) สามารถลดการเกิดโรคไหม้ที่เกิดจาก *Pythium ultimum*, *P. aphanidermatum* และ *P. myriotylum* ได้ ส่วนการคลุกเมล็ดมะเขือเทศก่อนปลูกด้วย ethazol กับ thiophanate methyl หรือ fenaminosulf ร่วมกับ magnesium silicate สามารถควบคุมโรคเน่า ซึ่งเกิดจาก *P. aphanidermatum* ได้ดี

สำหรับในประเทศไทยการใช้ metalaxyl ร่วมกับ mancozeb และ captan คลุกเมล็ดพืชก่อนปลูก สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *Pythium* spp. ได้ (Grisarapndha, 1987) การใช้ metalaxyl ให้ผลดีในการควบคุมโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp. ดังนั้นจึงมีการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่ง (Sanders *et al.*, (1984;1987) พบว่าการใช้ metalaxyl ติดต่อกันเป็นเวลา 3 ปี ทำให้เชื้อรา *Pythium* spp. สาเหตุโรคไหม้ของหนุ่ยที่ปลูกในสนามกอล์ฟเกิดความต้านทานขึ้น

การเข้าทำลายของโรคเน่าระดับดินอาจทำให้ประสิทธิภาพของรากพืชในการดูดซับปุ๋ยและแร่ธาตุอาหารลดลงจนกระทบต่อความสมบูรณ์ แข็งแรงและการให้ผลผลิตของพืช เชื้อรา *Pythium* spp. เป็นสาเหตุที่ทำให้ปลายรากพืชถูกทำลาย เกษตรกรจึงไม่สามารถเห็นลักษณะอาการของโรคได้ เกษตรกรส่วนใหญ่จึงทุ่มเทการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อพยายามฟื้นฟูสภาพดินพืชที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งมักไม่ประสบความสำเร็จ เพราะพืชไม่สามารถตอบสนองต่อปุ๋ยได้ เนื่องจากระบบรากส่วนใหญ่ถูกทำลายโดยเชื้อโรคแล้ว การจัดการ โรคพืชจึงเป็นแนวทางที่สำคัญแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มผลผลิต

ของพืชได้ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ช่วยปกป้องระบบรากพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค (จิระเดช, 2549)

การควบคุมโดยชีววิธี

ในธรรมชาติมีปรากฏการณ์ตามธรรมชาติที่สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) จุลินทรีย์มีการดำเนินชีวิตและการสืบพันธุ์เพื่อความอยู่รอด เช่นเดียวกับเชื้อสาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดเจริญอยู่บนผิวพืชเพื่อปกป้องเชื้อโรคพืชที่จะเข้าทำลาย เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรียที่เจริญและตั้งรกรากอยู่บนผิวรากพืชสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชในดิน บางชนิดสามารถแพร่กระจายอยู่ในดินเพื่อทำลายส่วนสืบพันธุ์หรือโครงสร้างที่ใช้ขยายพันธุ์ หรือเพื่อความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อโรคพืช ทั้งในรูปแบบปรสิต (parasite) หรือซาโปรไฟต์ (saprophyte) (จิระเดช และคณะ, 2546) เช่น เพ็ญภัก (2552) แยกแบคทีเรียจากรากผักกาดหอม 5 ชนิดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ด้วยวิธี tissue transplanting ได้แบคทีเรียทั้งหมด 96 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ด้วยวิธี Dual culture พบแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในช่วง 13.0-64.7 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ พัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ 100 ppm โดยยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในระยะกล้าได้ และพบทุกไอโซเลตสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าของผักกาดหอมกรีนคอส ในระดับโรงเรือนโดยไอโซเลต RO15 และ BH15 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอมซึ่งปลูกในระบบที่ไม่มีเชื้อโรคได้

จุฑารัตน์ (2554) ได้คัดเลือกเชื้อรา 24 ไอโซเลต เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต และยีสต์ 8 ไอโซเลต จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบของ 90 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น ด้วยวิธี Dual culture test พบว่าเชื้อราสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 0-55.67 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยวิธี spot inoculation พบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 6 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 41.64-64.15 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 6 ไอโซเลต และสายพันธุ์กล้วย 6 ไอโซเลต เพื่อควบคุมโรค

แอนแทรคโนสบนผลองุ่น พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคผลองุ่น 74.30-93.42 เปอร์เซ็นต์

นพรัตน์ (2546) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Gliocladium virens* แยกได้จากดินธรรมชาติ และรากพืช จำนวน 101 ไอโซเลต และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต จำนวน 18 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชดิน 4 ชนิด เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคน้ำเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคน้ำเน่าระดับดินของกระเจี๊ยบเขียว เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคน้ำเน่าระดับดินของคะน้า และเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรคเน่าของกล่ำส้มเขียวหวาน ทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อรา *G. virens* isolate GV74 และ GV16M01 (สายพันธุ์กลาย) สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ดีทั้ง 4 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 4 ชนิด ที่ (72.95-100 เปอร์เซ็นต์) และ (76.63-97.47 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนการทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลอง ด้วยวิธีการแช่เมล็ดพืช (งมรากส้มเขียวหวาน) ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *G. virens* พบว่าเชื้อรา *G. virens* isolate GV57 สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii*, *R. solani* และ *P. parasitica* เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี carboxin (Vitavax 75 WP), metalaxyl (Metalaxyl 25 WP) และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-PIN-01

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีโดยอาศัยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในดินได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., เชื้อรา *Gliocladium* sp. เชื้อแบคทีเรียเช่น *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด หรือมีกลไกต่างๆ ที่ขัดขวางกลไกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรคซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หรือเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ดังนี้ (จิระเดช, 2549; นิพนธ์, 2553)

- การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis)

จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic compounds) ที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคพืชได้ สารประกอบอาจเริ่มตั้งแต่การผลิตไฮยาไนด์ (HCN) ไปจนถึงเอนไซม์ต่างๆ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารปฏิชีวนะประกอบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* และ *Gliocladium* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นต้น เชื้อรา *Trichoderma koningii* และ *T. harzianum* ควบคุมโรค (Damping-off) ของพืชซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pythium ultimum* ด้วยการคลุกเมล็ดก่อนปลูก

ลงดิน โดยเชื้อรา *T. koningii* และ *T. harzianum* ส่งเสริมการงอกของเมล็ด ได้เท่ากับ 48% และ 44% ตามลำดับ และ *T. koningii* สร้างสาร organic acids ส่วน *T. harzianum* สร้าง polysaccharides และ polyhydroxy alcohols ในปริมาณสูง ทำให้ยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อโรค (Nelson *et al.*, 1987) จากการศึกษาของ Intana *et al.* (2003) พบว่า *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) สามารถสร้าง pentyl pyrone และ oxazole ที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อรา *Pythium* spp. และควบคุมโรคเน่าระดับดินของแตงกวาได้

- การแข่งขัน (Competition)

ความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อโรคนับเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยส่วนใหญ่จะพบการแข่งขันกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคพืชโดยตรง บริเวณแผลที่เชื้อโรคเข้าทำลาย (infection court) เพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคพืช และบางกรณีพบการแข่งขันใช้อาหาร เพื่อหยุดยั้งการเพิ่มปริมาณ หรือการขยายพันธุ์และการสืบพันธุ์ของเชื้อโรค รวมถึงเชื้อแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Pseudomonads* เข้าครอบครองรากได้ และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ (PGPR) นอกจากยับยั้งเชื้อโรคพืชได้แล้วช่วยทำให้การเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้นในสภาพที่ปราศจากเชื้อโรคครบถ้วน

การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* ในการยับยั้งการงอก sporangia ของเชื้อรา *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นโรคเน่าระดับดินของฝ้าย เนื่องจากการแก่งแย่ง fatty acid ผลิตโดยเมล็ดและรากของพืช ทั้งนี้เพราะการงอกของเชื้อรา *P. ultimum* ต้องการ การกระตุ้นจาก linoleic acid และสารที่จับจากเมล็ดฝ้าย ดังนั้นสายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* ถูกลดการใช้ fatty acid แทนสายพันธุ์เดิม ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์กลายไม่สามารถใช้ linoleic acid จึงไม่สามารถยับยั้งการงอกของ sporangia ของเชื้อโรค (Van Dijk and Nelson, 2000)

- การเป็นปรสิต (Parasitism)

การเป็นปรสิตต่อเชื้อโรคพืชเป็นกลไกที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใช้ในการยับยั้งโรคพืชในรูปแบบง่าย เริ่มตั้งแต่การสัมผัสหรือเจริญอยู่แนบชิดกัน (attachment) ตามด้วยการดูดซับธาตุอาหารจากเชื้อโรค จนถึงขั้นที่เส้นใยเชื้อโรคพืชเกิดการเหี่ยวสลาย (lysis) เช่น เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนส (β -1,3 และ β -1,4-glucanase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีผลในการย่อย

ผนังเซลล์ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และควบคุมโรคเน่าระดับดินของแตงกวา (Intana, 2003; Intana *et al.*, 2003) Migheli *et al.* (1998) transform เชื้อรา *T. longibrachiatum* ด้วย extra copies ของ *egl1* gene ซึ่งควบคุมการผลิต β -1,4 endoglucanase ปรากฏว่า transformants ที่ได้รับการสร้างขึ้นหรือจากการชักนำให้แสดงบทบาทของเอนไซม์ยับยั้งโรคได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อใช้คลุกเมล็ดแตงกวาซึ่งปลูกในดินที่มีเชื้อรา *P. ultimum*

- การยับยั้งความรุนแรงของเชื้อโรค (Inhibition of virulence mechanism)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (virulence factor) และความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (pathogenicity) ของเชื้อโรคพืชมักเกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ (toxins) เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T39 ควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ยับยั้งการงอกและการยืดขยายตัวของ germ tube ของโคนิเดียเชื้อรา *B. cinerea* ยังสามารถลดการสร้าง และลดกิจกรรมของ pectolytic enzyme ของเชื้อโรคเมื่อครบ 3 วัน หลังปลูกเชื้อช่วยเพิ่มการสะสมของผลิตภัณฑ์จาก pectic enzyme เช่น oligogalacturonides น้ำตาลเหล่านี้กระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืชทำให้เกิดความรุนแรงของโรคลดลง (Zhang *et al.*, 1996)

- การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induce disease resistance)

เป็นกลไกที่ปัจจุบันกำลังมีผู้ให้ความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อราหรือแบคทีเรียโดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค (avirulent) ไปแล้วสามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวกันของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชตระกูลแตง (cucurbit) จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้าง tomatine แล้วปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

- การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (induction of resistance in plant)

การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้รับความสนใจถึงความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* หรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma* ในการชักนำให้พืชต้านทานโรคได้ ดวงใจ, (2548) ศึกษาโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชักนำให้แตงกวาด้านทานต่อโรครากเน่าสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยใช้เทคนิคการแยกรากออกเป็น 2 ด้าน (split-root technique) จากการนำแตงกวาแยกรากเป็น 2 ด้าน มากระตุ้นรากด้านหนึ่งด้วยการปลูกเชื้อรา *T. harzianum* และใส่น้ำนิ่งมาเชื้ออีกด้านหนึ่งของแตงกวาด้านเดียวกัน พบว่าเมื่อกระตุ้นรากแตงกวาด้านหนึ่งด้วย *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 เป็นเวลา 7 วัน ก่อนปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในรากแตงกวาด้านหนึ่งของต้นแตงกวาด้านเดียวกัน สามารถชักนำความต้านทานโดยลดการเกิดโรคเน่าได้ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ลดจำนวนเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในการเจริญครอบครองรากแตงกวา และมีค่าน้ำหนักสดของรากและใบ ความสูงต้น และความยาวรากของแตงกวาเพิ่มมากขึ้น

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off)

จิระเดช และคณะ (2555) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคกล้าเน่ายุบของข้าวได้ 43.34-47.62% และสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วยอัตรา 1.02-1.11 ชั่วโมงต่อวัน ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 8 สายพันธุ์ ใช้ในการทดสอบยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 1.85-5.55% คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกล้าเน่ายุบของข้าวในระดับเรือนปลูกพืช ทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยแช่เมล็ดข้าว 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปบ่ม 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปลูกในดินที่มีเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ BB165 สามารถเจริญครอบครองผิวเมล็ดข้าว เพิ่มเปอร์เซ็นต์รอดตายจากโรคกล้าเน่ายุบได้ เมื่อกำลังข้าวอายุ 21 และ 30 วัน

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ของผักกาดหอม ในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus mycoides* FL17 เกล็ดแป้งสูตร 3 มีดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุด (25.17 เปอร์เซ็นต์) ขณะกรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เกิดโรคสูงสุด (91.67 เปอร์เซ็นต์) จาก

การใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus mycoides* FL17 เกล็ดแป้งสูตร 3 20 กรัม (ไม่บ่มเชื้อ) ต่อสารละลายธาตุอาหาร 50 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนรากลดลงมากที่สุด (82.29 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งการใช้ชีวภัณฑ์ทุกครั้งมีการเปลี่ยนสารละลาย (ทุก 7 วัน) ช่วยลดการเกิดโรครากเน่าได้ 61.39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอมได้ โดยมีน้ำหนักสดของต้นผักกาดหอมเพิ่มขึ้น 84.61 เปอร์เซ็นต์ (จารุวรรณ, 2556)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จากลำต้นแตงกวาและการพิสูจน์โรค

1.1 การแยกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จากลำต้นแตงกวา

นำลำต้นแตงกวาที่แสดงอาการของโรคเน่าระดับดิน มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี Tissue transplanting method โดยตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้วกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนที่ผิวด้วยการแช่ในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืน จากนั้นนำไปวางบนอาหาร Modified BNPR (Chamswarn et al., 1986) บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง potato dextrose agar (PDA) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

1.2 การพิสูจน์โรค ตามวิธีของ Koch (Koch's postulation)

เลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ตัดชิ้นวันเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำเชื้อไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer รุ่น ULTRA-TURREXT 25 ในอัตรา 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) ต่อน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 800 มิลลิลิตร หยดเส้นใยแวนดอย (mycelia suspension) 1 มิลลิลิตร ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ลงในดินอบฆ่าเชื้อที่บรรจุอยู่ในกระถางขนาด 4 นิ้ว ก่อนปลูกด้วยเมล็ดแตงกวาที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้วด้วย 10% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืน ตรวจสอบอาการโรคและแยกเชื้ออีกครั้งก่อนนำไปทดสอบ ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหารที่อายุ 24 ชั่วโมงและศึกษาการเจริญของเส้นใยอายุ 48 ชั่วโมง โดยจำแนกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วยวิธี water culture ด้วยการตัดชิ้นวันอาหาร ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ขนาด 1×1 เซนติเมตร วางในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าจานละ 3-4 ชิ้น ใส่ น้ำนิ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมชิ้นวัน เปลี่ยนน้ำทุกๆ 24 ชั่วโมง เก็บไว้ที่มีดประมาณ 3 วัน นำมาตรวจคุณลักษณะของเชื้อราได้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจำแนกชนิดของเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยใช้ monograph ของ Plaats-Niterink (1981)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากและจากผิวใบแตงกวา

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากของแตงกวา

เก็บดินส่วนที่ติดอยู่กับรากของแตงกวาจากแปลงปลูกใน ค่ำบลห้วยขวาง อำเภอ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและไม่ปรากฏอาการของโรค มาแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ด้วยวิธีการ Surface Soil Dilution Plate (SSDP) บนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และThornston's medium (TH) เตรียมตัวอย่างดินจากแปลงมาผึ่งให้แห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงให้ละเอียด ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ flask ที่มีน้ำนิ่งมาเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดออกจากดิน เจือจางดิน (Serial dilution) ก่อนใช้ปิเปตดูดดินแขวนลอยที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ย้ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารไปแยกเชื้อให้ได้เป็น single colony หรือเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย ใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยว แล้วนำไป streak บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) แล้วย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (slant) NGA slant เก็บไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากใบของแตงกวา

2.2.1 วิธีการบดใบ

แยกเชื้อแบคทีเรียจากใบด้วยการนำใบแตงกวามาล้างด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อ ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดใบในโกร่งให้ละเอียด 1 กรัม ต่อน้ำนิ่งมาเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทำให้เจือจาง ดูดสารแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ได้แก่ อาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA), King's medium B (KB) และThornston's medium (TH) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์ ย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.2.2 วิธีการล้างใบ

นำใบแดงกว่า 1 กรัม ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ vortex mixture ทำให้เชื้อจาง นำไปหยดลงบนอาหารอาหาร nutrient glucose agar (NGA), King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) เกลี่ยให้ทั่วอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อบริสุทธิ์และเก็บในหลอดอาหารเลี้ยงที่ 10 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ

เตรียมแบคทีเรียปฏิบัฏในรูปแบบเซลล์แขวนลอย โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NGA เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ใช้ loop ขนเชื้อด้วยเปลวไฟกวาดเชืบนอาหาร ใส่ลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ vortex mixture ปรับเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อ มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer วัดค่าความทึบแสง optical density (O.D.) ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (นิชากร, 2553)

3.2 การเตรียมเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

เลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ใช้ใบมีดฆ่าเชื้อตัดชิ้นไว้ในจานเลี้ยงเชื้อผสมกับน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออัตรา 1 จาน ต่อ 800 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer เพื่อใช้เส้นใยปั่นแขวนลอย (mycelial suspension) เป็น inoculum ใส่ลงดินในกระถาง

3.3 การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

เลี้ยงหัวเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 บริสุทธิ์ชนิดผงแห้ง นำไปเพิ่มปริมาณเชื้อบนปลายข้าวสุกที่หุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า อัตราข้าว 3 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน ตักข้าวเมื่อยังร้อนใส่ถุงพลาสติกทึบร้อนขนาด 8×12 นิ้ว ประมาณ 250 กรัมต่อถุง พับปากถุงรอให้ข้าวอุ่นจึงดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงข้าวแล้วรัดยางปิดปากถุงให้แน่น บีบข้าว

ในถุงและเขย่าเบาๆ เพื่อให้เชื้อกระจายทั่วถุงข้าว แล้วใช้ปลายเข็มเจาะบริเวณปากถุงประมาณ 15-20 ครั้งต่อถุง กระจายข้าวให้ทั่วถุงพลาสติก ดึงถุงขึ้นเพื่อให้มีอากาศเข้าไปในถุงและถุงพลาสติกไม่แนบติดกับข้าวเพื่อให้อากาศถ่ายเทเหมาะกับการเจริญของเชื้อ ก่อนนำไปวางในที่มืดแสงสว่าง ไม่ร้อน และไม่ถูกแสงแดด เมื่อครบ 2 วัน ขยี้ถุงข้าวอีกครั้งเพื่อให้เส้นใยกระจายทั่วทั้งถุง บ่มเชื้ออีก 4-5 วัน จนได้เชื้อสดที่สร้างสปอร์สีเขียว (จี้ระเคซ และ วรณวิไล, 2545) ล้างสปอร์ออกจากผิวเมล็ดข้าว จนได้น้ำสปอร์สีเขียวเข้ม แล้วกรองเอาน้ำสปอร์ด้วยกระชอนหรือมุ้งไนลอนตาถี่ในอัตราเชื้อสดบนข้าว 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 200 ลิตรก่อนนำสปอร์แขวนลอยที่ได้ไปแช่เมล็ด

3.4 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

เตรียมวัสดุอาหารสำหรับเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วยดินร่วนผสมกับสารอาหาร เมล็ดพืชบด ธัญพืชผง โปรตีนผง คลุกเคล้าให้เข้ากัน ใส่ น้ำลงไปเล็กน้อยให้ความชื้น แล้วนำดินไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เลี้ยงในอาหาร NGB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาใส่ในดินผสมสารอาหารที่เตรียมไว้ โดยใช้อัตราเชื้อ 10 มิลลิลิตรต่อดินผสมสารอาหาร 300 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันบ่มไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปผึ่งลมให้แห้ง เพื่อให้ความชื้นในผงดินลดลงจนมีค่าไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (วัดความชื้น โดย Moisture meter จำหน่ายโดยบริษัท Sartorius) แล้วนำไปทดลองต่อไป

4. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากและจากผิวใบแดงกวาในการเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* บนอาหาร PDA ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ก่อนตัดเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางลงบนอาหาร PDA ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยลงไฟฟ้าเชื้อตะเซลล์ของแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาปลูกบนอาหารที่มีเชื้อรา *P. aphanidermatum* ตรงข้ามกันในแนวกากบาท 4 จุด โดยเชื้อราสาเหตุโรคห่างจากแบคทีเรียทดสอบ 3 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) และวัดรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่ออกมาจากจุดศูนย์กลางทุกวัน เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่วางเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ

คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรค เปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ($P=0.05$)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

R_1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัฏบางชนิดที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* จากวิธี dual culture test มาเตรียมให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำเมล็ดแตงกวาพันธุ์ลูกผสมพาวเวอร์-ซี มากำจัดเชื้อที่ผิวเมล็ดแตงกวาด้วย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ นำเมล็ดไปแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ สารเคมี metalaxy 35% SD (อัตราการใช้สารเคมี 7 กรัม ต่อเมล็ดแตงกวา 1 กิโลกรัม) และสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (เตรียมจากการใช้เชื้อสด 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 200 ลิตร) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในกระถางที่มีดินอบฆ่าเชื้อ 350 กรัมต่อกระถาง กระถางละ 5 เมล็ด โดยกลบเมล็ดแตงกวาลงดินลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร เป็นแนวกากบาท จากนั้นใส่เส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ที่ 1 มิลลิลิตร ระหว่างช่องว่างการปลูกเมล็ดโดยไม่ให้เชื้อสัมผัสกับเมล็ดแตงกวาโดยตรง

การทดลองประกอบด้วย 17 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ (Completly Randommized Design, CRD)

กรรมวิธีที่ 1 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในน้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (-Py)

กรรมวิธีที่ 2 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในน้ำเปล่า ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (+Py)

กรรมวิธีที่ 3 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35% SD

กรรมวิธีที่ 4 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

ชนิดสด

กรรมวิธีที่ 5 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-3

กรรมวิธีที่ 6 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-8

กรรมวิธีที่ 7 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9

กรรมวิธีที่ 8 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-15

กรรมวิธีที่ 9 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23

กรรมวิธีที่ 10 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-32

กรรมวิธีที่ 11 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-35

กรรมวิธีที่ 12 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-36

กรรมวิธีที่ 13 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-38

กรรมวิธีที่ 14 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-42

กรรมวิธีที่ 15 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN1-1

กรรมวิธีที่ 16 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN1-9

กรรมวิธีที่ 17 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN1-3

5.1 บันทึกผลการเกิดโรคเน่าระดับดิน (Damping-off)

ตรวจนับจำนวนต้นกล้าแตกงาที่ออกหลังปลูก 7 วัน และจำนวนต้นแตกการอดตายที่ 14 วัน หลังจากปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*

5.2 ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

สุ่มรากแตกงาหลังปลูกที่ 14 วัน กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น โดยนำรากแตกงามาล้างผ่านน้ำไหลให้สะอาด แช่ในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร modified BNPR เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณการครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

5.3 ตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในดิน

สุ่มดินหลังจากการปลูกแตงกวาเป็นเวลา 14 วัน กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ตรวจสอบปริมาณของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate (SSDP) โดยชั่งดิน 1 กรัม ผสม 0.1 % water agar (WA) 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ก่อนหยดดินแขวนลอยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified BNPRa ใช้แท่งแก้วเกลี่ยทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ล้างผิวน้ำอาหารด้วยน้ำไหลเพื่อเอาดินออกไปก่อนตรวจสอบปริมาณโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เทียบเป็นหน่วยโคโลนีต่อกรัม (cfu/g)

6. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

6.1 การทำเครื่องหมายให้แบคทีเรียต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ มาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เพื่อติดตามตรวจสอบปริมาณประชากรของแบคทีเรีย โดยแต่ละเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไป streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 1 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารดังกล่าว มา streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้เกิดความคงตัว และเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะขึ้นเป็น 5 และ 10 ppm ตามลำดับ (จิรัสสา, 2547)

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการอีกครั้งตามวิธีในข้อ 4 และคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในแปลงปลูกพืชต่อไป

6.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง (culture filtrate) ที่ได้จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin และมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการมาเตรียมเป็นสารกรองโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร/จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นกวาดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) ในอัตราแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตรต่อ NGB 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ($OD_{600} = 0.2$) นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NGB ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultra Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทดสอบ (พราวมาศ, 2550)

นำสารกรองที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc method โดยตัดเชื้อราสาเหตุโรคด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำชิ้นกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรและผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคไว้แล้ว 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท แต่ละจุดห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 3 เซนติเมตร หยดสารกรองปริมาตร 0.03 มิลลิลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรอง บันทึกผลการทดลองโดยวัดรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่ออกมาจากจุดศูนย์กลางทุกวันเป็นเวลา 3 วัน คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) หรือวัดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone)

6.4 การทดสอบแกรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาทดสอบแกรมของแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NGA ศึกษาคุณลักษณะ รูปร่าง การสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทดสอบแกรมด้วย 3 % KOH และการย้อมสี (Suslow, 1982)

7. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพแปลงปลูกพืช

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อรา *P. aphanidermatum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ M3-SDN-9 M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งมีการทำเครื่องหมายติดตาม (ตามวิธีการในข้อ 6) มาทดสอบในสภาพแปลงปลูกพืช นำเมล็ดแตงกวาพันธุ์ลูกผสมพาวเวอร์-ซี มากำจัดเชื้อที่ผิวเมล็ดแตงกวาด้วย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืน เชื้อ นำเมล็ดไปแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ สารเคมี metalaxy 35% SD (อัตราการใช้สารเคมี 7 กรัม ต่อเมล็ดแตงกวา 1 กิโลกรัม) และสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (เตรียมจากการใช้เชื้อสด 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 200 ลิตร) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปลูกลงในแปลงทดลองสี่เหลี่ยมขนาดความกว้าง 100 เซนติเมตร ยาว 500 เซนติเมตร โดยกลบเมล็ดแตงกวาลงดินลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร หลุมละ 1 เมล็ด ปลูกแปลงละ 10 เมล็ด ในแต่ละหลุมห่างกันขนาดความกว้าง 70 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร โดยทุกกรรมวิธีไม่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (-Py)

การทดลองประกอบด้วย 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 แปลง แปลงละ 10 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCB)

กรรมวิธีที่ 1 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในน้ำเปล่า โดยไม่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (-Py)

กรรมวิธีที่ 2 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35% SD

กรรมวิธีที่ 3 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

ชนิดสด

กรรมวิธีที่ 4 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายชนิดผงสายพันธุ์ SDN-9

กรรมวิธีที่ 5 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายชนิดผงสายพันธุ์ SDN-23

กรรมวิธีที่ 6 = กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายชนิดผงสายพันธุ์ LBN1-5

7.1 บันทึกผลการเกิดโรคน้ำระดับดิน (Damping-off)

ตรวจนับจำนวนต้นกล้าแตงกวาที่ออกหลังปลูก 7 วัน และตรวจนับจำนวนต้นแตงกวา รอดตายที่ 14 และ 28 วัน หลังจากปลูกเมล็ดแตงกวาในแปลงปลูก

แยกเชื้อรา *Pythium* sp และเชื้อราสาเหตุโรคอื่น จากเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก ที่มีอายุ 14 วัน ด้วยการกำจัดเชื้อบนผิวเมล็ดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.525 เปอร์เซ็นต์ 2-3 นาที ล้างด้วยน้ำ นิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ นำเมล็ดตรวจสอบบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจดูชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคบนเมล็ดแตงกวา คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อราสาเหตุโรคอื่น ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อรา } Pythium \text{ sp.} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่พบเชื้อรา } Pythium \text{ sp. (กรรมวิธี)}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่ไม่งอก (กรรมวิธี)}} \times 100$$

คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน ตามวิธีการ ของ (Cubeta and Echandi, 1991)

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Disease incidence} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดโรค (ชำ)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ไม่เกิดโรค (ชำ)}} \times 100$$

7.2 ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เชื้อรา *Trichoderma harzianum* CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิปักษ์บนรากแตงกวา

สุ่มรากแตงกวาหลังปลูกที่ 28 วัน กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ชิ้น โดยนำรากแตงมาล้าง ผ่านน้ำไหลให้สะอาด แช่ในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำ นิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วาง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified BNPR สำหรับเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหารNGA ผสมสาร ปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และMartin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจนับ ปริมาณการครอบครองราก

7.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เชื้อรา *Trichoderma harzianum* CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดิน

กลุ่มดินในแปลงปลูก 28 วัน กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัวอย่าง ตรวจนับปริมาณของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate (SSDP) โดยชั่งดิน 1 กรัม ผสม 0.1 % water agar (WA.) 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ปล่อยไว้ประมาณ 30 นาที ก่อนหยดดินแขวนลอยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified BNPR สำหรับเชื้อรา *P. aphanidermatum* และชั่งดิน 1 กรัม ผสมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดดินแขวนลอยปริมาณ 1 มิลลิลิตร บนอาหาร NGA ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลาย และ Martin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นับปริมาณโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เทียบเป็นหน่วยโคโลนีต่อกรัม (cfu/g)

7.4 ชั่งน้ำหนักผลผลิตของต้นแตงกวา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากการทดลอง โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows V. 11.5 ตามแผนการทดลองแบบ CRD ซึ่งการทดลองในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และแผนการทดลองแบบ RCB ในสภาพแปลงปลูกพืช

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ เรือนปลูกพืชทดลองและแปลงปลูกพืชทดลอง
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด
นครปฐม

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน พฤษภาคม พ.ศ.2554-พฤษภาคม พ.ศ.2557

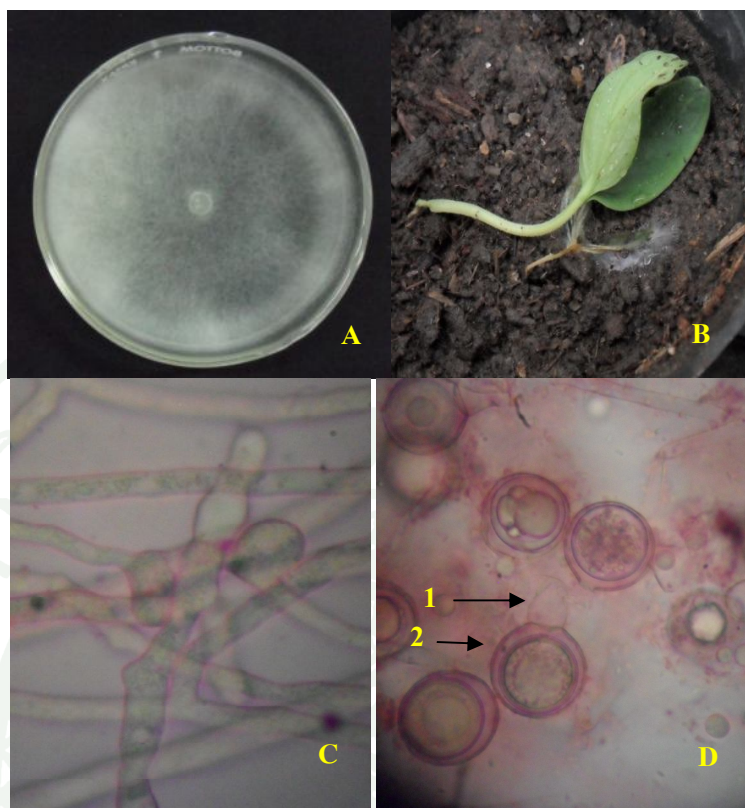


ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จากลำต้นแตงกวาและการพิสูจน์โรค

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าระดับดินของลำต้นแตงกวา ที่มีลักษณะเป็นแผลน้ำเน่าบริเวณโคนต้น โดยวิธี tissue transplanting method บนอาหาร Modified BNPRa พบว่ามีเชื้อเจริญออกมาจากโคนต้นที่หักพับลงในขณะที่ใบยังเขียวอยู่ เส้นใยมีลักษณะสีขาว พูเจริญได้เร็วเต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 1-A) ในสภาพแวดล้อมมีความชื้นสูง โคนต้นแสดงอาการเน่าเป็นแผลสีน้ำตาล และพบเส้นใยสีขาวเจริญอยู่บริเวณลำต้นและใบที่ติดกับวัสดุปลูก (ภาพที่ 1-B) เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีลักษณะใส แดกแขนงได้ดี ไม่มีผนังกันตามขวาง ภายในของเส้นใย สร้าง sporangium (ภาพที่ 1-C) แบบ lobate และสร้าง oospore แบบ pleotric จากลักษณะดังกล่าวเปรียบเทียบกับลักษณะในคู่มือของ Plaats-Niterink (1981) เชื้อราที่แยกได้เป็น *P. aphanidermatum* (ภาพที่ 1-D)

จากการนำเชื้อราที่แยกได้ไปพิสูจน์การเกิดโรค ตามวิธีการของ Koch's postulation โดยการปลูกเมล็ดแตงกวาพันธุ์ลูกผสมพาวเวอร์-ซี ลงดินลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตรลงในกระถางที่มีดินอบฆ่าเชื้อ กลบเมล็ดแตงกวาก่อนใส่เส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ลงไป พบว่าหลังจากปลูกเชื้อโรคเป็นเวลา 7-14 วัน ต้นกล้าแตงกวาเกิดแผลน้ำเน่า บริเวณโคนต้นและหักพับลง เมื่อดึงรากขึ้นมาพบว่ารากเป็นสีน้ำตาลดำ เน่าเปื่อย และเมื่อนำโคนต้นที่แสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งบนอาหาร Modified BNPRa พบว่ามีเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เจริญออกมาจากโคนต้นที่แสดงอาการ มีลักษณะเช่นเดียวกันกับเชื้อราที่ได้ปลูกเชื้อลงไป



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคน้ำระดับดินและลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

- A. เส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- B. เส้นใยสีขาวเจริญอยู่บริเวณลำต้นและใบที่ติดกับวัสดุปลูก
- C. รูปร่างของsporangium ของเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- D. การเข้าจับกันของ antheridia (1) กับ oogonia (2)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบราก (root zone soil) และจากใบของแตงกวา

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบราก ด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate (SSDP) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA), King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) แบคทีเรียจากดินรอบรากทั้งหมด 56 ไอโซเลต และใบของแตงกวาทั้งหมด 56 ไอโซเลต จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ nutrient glucose agar (NGA), King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) จากตารางที่ 1 พบแบคทีเรียจากดินรอบรากและจากใบของแตงกวาได้รวมทั้งหมด 112 ไอโซเลต โดยการแยกจากดินรอบรากบนอาหาร NGA, KB และ TH พบแบคทีเรีย 36 13 และ 7 ไอโซเลต ตามลำดับ ส่วนการแยกจากใบแตงกวาบนอาหาร NGA, KB และ TH พบแบคทีเรีย 27 18 และ 11 ไอโซเลต ตามลำดับ สาเหตุที่แยกแบคทีเรียจากดินรอบรากและจากใบพืช ด้วยเหตุผลที่คาดว่าจะได้พบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดซึ่งเจริญอยู่บนผิวพืชเพื่อทำหน้าที่ปกป้องเชื้อโรคพืชที่จะเข้าทำลาย เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรียที่เจริญและตั้งรกรากอยู่บนผิวรากพืชสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชในดินบางชนิดและเจริญแพร่กระจายอยู่ในดินเพื่อทำลายส่วนสืบพันธุ์หรือโครงสร้างที่ใช้ขยายพันธุ์ของเชื้อโรคในดิน (จิระเดช และคณะ, 2546) เช่นเดียวกับที่ Paulitz *et al.* (1992) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณรอบรากแตงกวามาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอก zoospore ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยพบ 93 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ และอีก 35 ไอโซเลต ลดการงอกของ zoospore ได้ ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ zoospore ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมถึง 50 เปอร์เซ็นต์

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกจากดินหรือจากใบพืชอาจพบ แตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะการแยกเชื้อจากดินซึ่งเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์ได้มากมายหลายชนิดอาหารที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อจึงควรเป็นอาหารจำเพาะ (วิชัย, 2549) ที่มีคุณสมบัติสามารถคัดเลือกเชื้อที่เราต้องการให้เจริญได้ แต่เชื้ออื่นเจริญเติบโตไม่ได้ หรือเจริญได้น้อย หรือทำให้เราสามารถแยกเชื้อต่างชนิดกันออกจากกันได้ โดยอาศัยคุณสมบัติบางประการ (นิพนธ์, 2533) การแยกแบคทีเรียในครั้งนี้จึงเลือกใช้อาหารที่มีความจำเพาะหรือเป็นอาหารที่มีความสามารถแยกเชื้อต่างชนิดกันออกจากกันได้ เช่น บนอาหาร King's medium B (KB) แยกได้ 31 ไอโซเลต ซึ่งมีโอกาสเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อ *Pseudomonas* spp. วิชัย (2549) กล่าวว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B (KB) เป็นอาหารที่เหมาะสมในการแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. บางกลุ่มสร้างเมือกสี กล้วยจากสารเรืองแสงที่สร้างและละลายอยู่ในอาหารนี้ เมื่อภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต Rankin and Paulitz (1994) กล่าวว่าเชื้อ *P. fluorescens* และ *P. corrugata* ลดการงอกและการเคลื่อนที่ของ

zoospore ของเชื้อรา *Pythium* sp. ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าของแตงกวาในระบบการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ได้

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากและใบของแตงกวาเมื่อแยกเชื้อด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate ด้วยการใช้อาหารแยกเชื้อ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรีย	
	แยกเชื้อจากดิน ^{1/}	แยกเชื้อจากใบ ^{2/}
NGA ^{3/}	36	27
KB ^{4/}	13	18
TH ^{5/}	7	11
Total	56	56

^{1/} เก็บดินรอบรากของแตงกวาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH)

^{2/} เก็บใบแตงกวาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH)

^{3/} NGA = nutrient glucose agar

^{4/} KB = King's medium B

^{5/} TH = Thornston's medium

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 112 ไอโซเลต จากดินรอบราก 56 ไอโซเลต และจากใบแดงกวา 56 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วยวิธี dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในระดับห้องปฏิบัติการ (วิธีการตาม 4) จึงได้เลือกเชื้อทดสอบจำนวน 61 ไอโซเลตที่มีแนวโน้มว่าจะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ ด้วยการสังเกตว่าเชื้อราสาเหตุโรคมีการยุบตัว หรือไม่สามารถเจริญคลุมทับไปบนโคโลนีของเชื้อ

ทดสอบได้ นำมาทดสอบอีกครั้ง พบว่าแต่ละไอโซเลตของเชื้อทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในช่วง 0-20, 21-40 และ 41-60 พบแบคทีเรียจำนวน 49 7 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์โดยการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแดงกวาด้วยวิธี dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน พบแบคทีเรีย 13 ไอโซเลต ที่มีแนวโน้มยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ ด้วยการสังเกตว่าเชื้อราสาเหตุโรคยุบตัว หรือไม่สามารถเจริญคลุมทับไปบนโคโลนีของเชื้อทดสอบได้ โดยมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 13.75-55.28 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีที่สุด คือ LBN1-9, SDN-23 และ SDN-3 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 55.28, 51.38 และ 50.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไอโซเลตที่มีความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) คือ SDN-32, SDN-36, SDN-35 และ LBN1-9 โดยมีความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเท่ากับ 0.44, 0.18, 1.19 และ 1.66 เซนติเมตร ตามลำดับ ไอโซเลต SDN-3, SDN-23 และ LBN1-9 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) โดยที่เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคยุบตัวหรือไม่สามารถเจริญคลุมทับไปบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ เช่นเดียวกับที่ จิรัสสา (2546) ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 24 ไอโซเลตจากทั้งหมด 210 ไอโซเลต โดยอาศัยการที่แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ทำให้เกิด inhibition zone หรือ clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในขณะที่ วราภรณ์ (2545) ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* 2 รูปแบบ คือการสร้างปฏิชีวนะสารออกมายับยั้งการเจริญทำให้เกิด inhibition zone หรือ clear zone และแบคทีเรียที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้เชื้อ

A. brassicicola เจริญได้น้อย และการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อทดสอบการควบคุมโรคบนผลองุ่น ได้อาศัยหลักเกณฑ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และความกว้างของบริเวณยับยั้งเช่นกัน (จุฑารัตน์, 2554)

ตารางที่ 2 ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากและใบของแตงกวา
ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ของเส้นใยเชื้อรา <i>P.</i> <i>aphanidermatum</i> ^{1/}	ไอโซเลต (จำนวนไอโซเลต)
0-20	SDN-1, SDN-2, SDN-4, SDN-5, SDN-6, SDN-7, SDN-10, SDN-11, SDN-12, SDN-13, SDN-14, SDN-16, SDN-17, SDN-18, SDN-20, SDN-21, SDN-22, SDN-24, SDN-25, SDN-26, SDN-27, SDN-28, SDN-29, SDN-30, SDN-31, SDN-33, SDN-34, SDN-37, SDN-40, SDN-41, SDN 42, LWN1-1, LWN1-2, LWN1-4, LWN1-5, LWN2-1, LWN2-5, LBN1-2, LBN1-3, LBN1-4, LBN1-6, LBN1-7, LBN1-8, LBN1-10, LBN2-1, LBN2-2, LBN2-3, LBN2-4, LBN2-5 Total = 49
21-40	SDN-8, SDN-9, SDN-32, SDN-35, SDN-36, SDN-38, LWN1-3 Total = 7
41-60	SDN-3, SDN-15, SDN-23, LBN1-9, LBN1-1 Total = 5

^{1/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. aphanidermatum* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
คำนวณจาก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค = $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$
 R_1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม
 R_2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

ตารางที่ 3 รัศมีโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) ของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	รัศมีโคโลนีของเชื้อรา <i>P. aphanidermatum</i> ^{1/} (ซม.)	ความกว้างบริเวณ ยับยั้ง ^{2/} (Clear zones) (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อรา <i>P.</i> <i>aphanidermatum</i> ^{3/} (%)
SDN-3	3.71	0.00	50.79 ^{4/} ab
SDN-8	6.83	0.00	24.45 d
SDN-9	6.76	0.00	22.08 d
SDN-15	4.65	0.00	47.36 b
SDN-23	3.85	0.00	51.38 ab
SDN-32	5.28	0.44	40.56 c
SDN-35	5.21	1.19	40.83 c
SDN-36	5.58	0.18	37.50 c
SDN-38	5.39	0.00	40.14 c
SDN-42	7.58	0.00	13.75 e
LWN1-3	6.83	0.00	16.52 e
LBN1-1	4.88	0.00	39.99 c
LBN1-9	3.80	1.66	55.28 a
Control	4.50	-	-
C.V. (%)			41.18

^{1/} รัศมีของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* วัดจากกึ่งกลางของโคโลนีถึงปลายเส้นใย (เซนติเมตร) ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ หลังจากวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 3 วัน

^{2/} บริเวณการยับยั้ง (%) คำนวณได้จาก

$$\text{บริเวณการยับยั้ง} = (D_1 - D_2/2) \times 100$$

D_1 คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

D_2 คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 3 (ต่อ)

^{3/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. aphanidermatum* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
คำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

R_1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

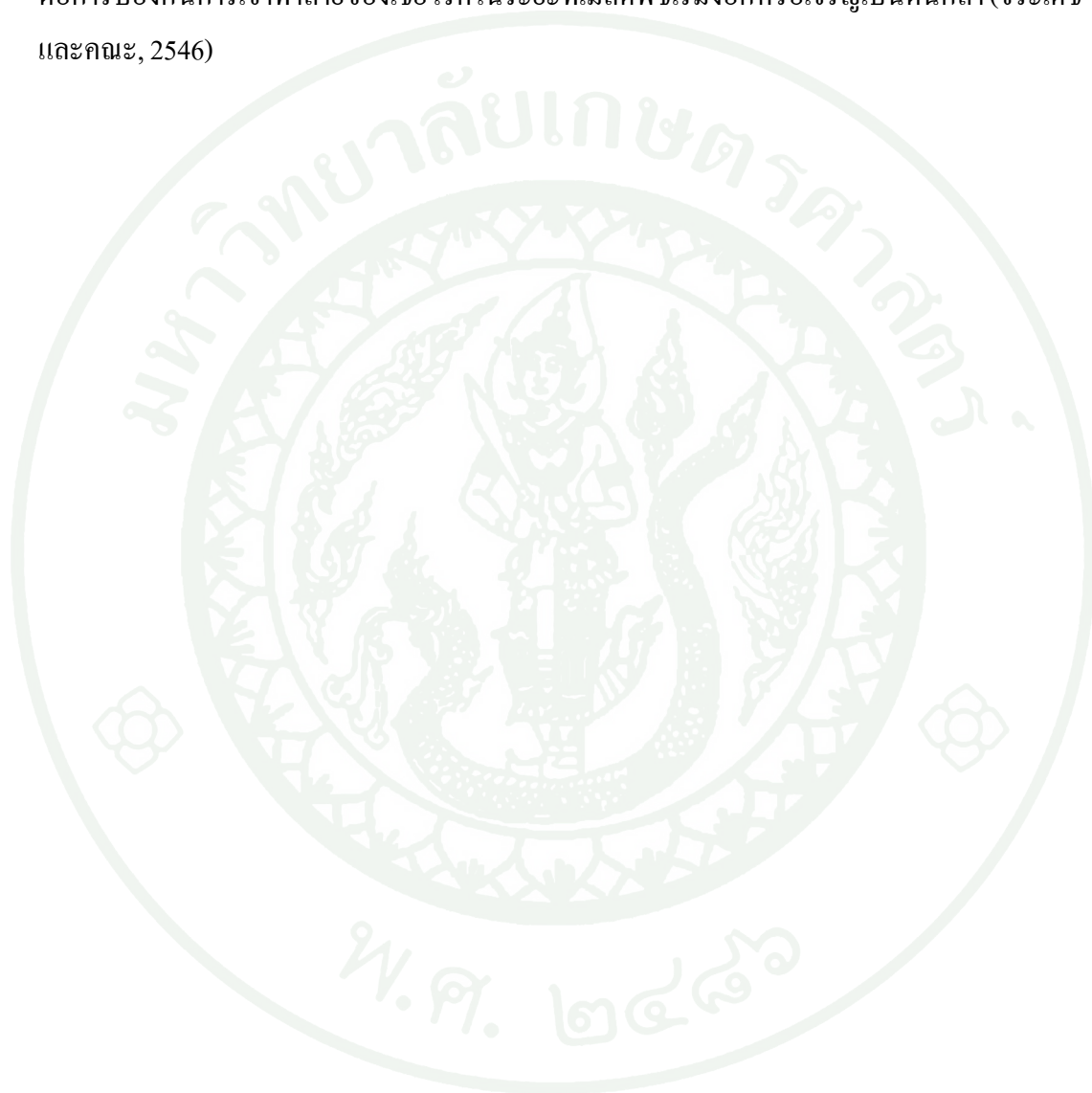
^{4/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความหมายแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($P = 0.05$)

4. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพจำนวน 13 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวาในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยนำเมล็ดแตงกวามาแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ สารเคมี metalaxyl 35 SD และสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในกระถาง พบว่าจากการตรวจนับจำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 มีค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน สูงที่สุดเท่ากับ 85 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรคถึง 112.5 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD รองลงมาคือกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SDN-3 และ SDN-8 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 7 วัน เท่ากับ 55.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรคและการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 7 วัน เท่ากับ 40.00 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ส่วนการตรวจนับจำนวนต้นแตงกวารอดตายที่ 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูกที่ 14 วัน 86.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรคถึง 550.19 เปอร์เซ็นต์ และสูงกว่าการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรคพบต้นรอดตายเพียง 13.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SDN-3, SDN-8 และ SDN-9 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูกที่ 14 วัน 46.67, 40.00 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD ส่วนกรรมวิธีที่ไม่มีต้นรอดตายเลยคือกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SDN-35, SDN-42, SDN-32 และ LBN1-1 (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 2) จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 ก่อนปลูกลงดินที่มีเชื้อสาเหตุโรค มีเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้าแตงกวาหลังปลูกที่ 7 วัน สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 จะสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดได้แล้ว ยังพบว่าช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูกที่ 14 วัน ได้เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้

สารเคมี metalaxyl 35 SD อีกด้วยจากการนำเมล็ดแตงกวาแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ก่อนปลูกลงดินส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นกล้า แตงกวาสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อาจเป็นเพราะการคลุกเมล็ดพืชหรือการแช่เมล็ด ช่วยให้จุลินทรีย์ ปฏิปักษ์อยู่ใกล้ หรือสัมผัสกับส่วนของพืชที่จะถูกเข้าทำลายโดยเชื้อโรคพืชมากที่สุด จึงเป็นผลดี ต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคในระยะที่เมล็ดพืชเริ่มงอกหรือเจริญเป็นต้นกล้า (จิระเดช และคณะ, 2546)



ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตกงาที่งอกหลังปลูก 7 วัน และเปอร์เซ็นต์จำนวนต้น
แตกงาที่รอดตาย 14 วัน หลังจากแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิภูมิ
เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืช
ทดลอง

กรรมวิธี (ไอโซเลต/สายพันธุ์)	เปอร์เซ็นต์การงอก 7 วัน (%)		เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 14 วัน (%)	
Control (-Py) ^{1/}	52.50 a-c ^{2/}	-	86.67 a ^{2/}	-
Control (+Py) ^{3/}	40.00 a-c	-	13.33 ef	-
metalaxyl 35 SD	50.00 a-c	(+25.00%) ^{4/}	66.67 ab	(+400.15%) ^{4/}
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	40.00 a-c	(0.00%)	33.33 c-e	(+150.04%)
SDN-3	55.00 a-c	(+37.50%)	46.67 bc	(+250.11%)
SDN-8	55.00 a-c	(+37.50%)	40.00 cd	(+200.08%)
SDN-9	85.00 a	(+112.50%)	40.00 cd	(+200.08%)
SDN-15	35.00 b	(-12.50%)	6.67 f	(-49.96%)
SDN-23	70.00 ab	(+75.00%)	86.67 a	(+550.19%)
SDN-32	45.00 a-c	(+12.50%)	0.00 f	(-100.00%)
SDN-35	30.00 bc	(-25.00%)	0.00 f	(-100.00%)
SDN-36	35.00 bc	(-12.50%)	6.67 f	(-49.96%)
SDN-38	35.00 bc	(-12.50%)	20.00 d-f	(+50.04%)
SDN-42	45.00 a-c	(+12.50%)	0.00 f	(-100.00%)
LWN1-3	35.00 bc	(-12.50%)	20.00 d-f	(+50.04%)
LBN1-1	40.00 a-c	(0.00%)	0.00 f	(-100.00%)
LBN1-9	25.00 bc	(-37.50%)	6.67 f	(-49.96%)
C.V. (%)	63.99		75.40	

^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (-Py)

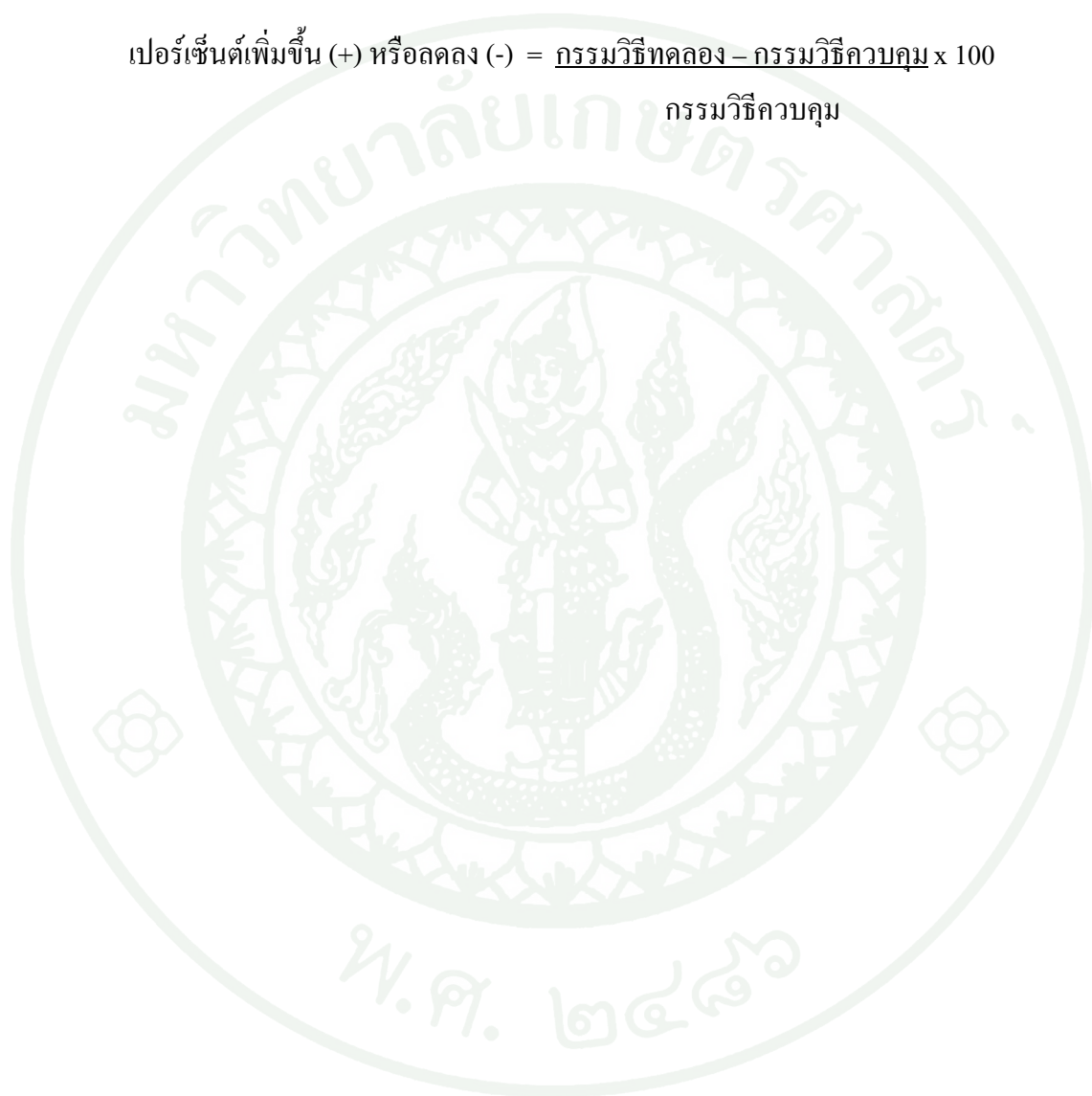
^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

^{3/} กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (+Py) ในรูปเส้นใยแขวนลอยอัตรา
1 งาน ต่อ 800 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4 (ต่อ)

^{4/} เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$





ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อต้นกล้าแตงกวามีอายุที่ 14 วัน

- A. กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (-Py)
- B. กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (+Py)
- C. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35% SD
- D. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-3
- E. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9
- F. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23

5. การเจริญครอบครองรากแตงกวาของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และการตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในดินในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SDN-8 และ SDN-23 พบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียง 23.30 และ 41.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SDN-38 มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เท่ากับ 48.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรคมิเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 3) ในกรณีนี้คล้ายกับผลการทดลองของ เพ็ญภัก (2552) ที่พบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากผักกาดหอมของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในกรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อโรคพบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงที่สุด (86.7 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต SDN-3, SDN-8, SDN-9 SDN-23, SDN-35 และ SDN-38 ลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแตงกวาในเวลา 14 วัน ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล 35 SD (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 4)

ในกรณีที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรค เป็นไปได้ว่าการทดลองโดยแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก มีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้ควบคุมโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดและเชื้อโรคพืชในดิน โดยการใช้อาหารที่เมล็ดปลดปล่อยออกมา ทำให้ไม่พอเพียงสำหรับเชื้อโรคพืชในดินที่จะใช้ดำเนินกิจกรรมเพื่อก่อให้เกิดโรคได้ เช่น ไม่เกิดโรคเมล็ดเน่า (seed decay) หรือโรคเน่าของพืชก่อนโผล่พ้นดิน (pre-emergence damping-off) ตลอดจนป้องกันการเกิดโรคเน่าระดับดินหลังกล้างอกโผล่พ้นดินแล้ว (post-emergence damping-off) แบคทีเรียปฏิปักษ์อาจช่วยป้องกันโดยการเจริญครอบคลุมผิวรากพืช เพื่อป้องกันการเจริญเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อโรค หรือไม่ให้เชื้อโรคได้มีโอกาสผลิตสารปฏิชีวนะ หรือน้ำย่อยพวก hydrolytic enzymes (จิระเดช, 2549) จากเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากและปริมาณของเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีค่าต่ำนั้น อาจเพราะแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารกับเชื้อโรคพืชเพื่อหยุดยั้งการเพิ่มปริมาณ หรือการขยายพันธุ์และการสืบพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช (จิระเดช, 2549) เช่น การทดลองของ Van Dijk and Nelson (2000) พบว่าแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* ยับยั้งการงอก sporangia ของเชื้อรา *Pythium ultimum* โรคเน่าระดับดินของฝ้าย เนื่องจากการแก่งแย่ง fatty acid ซึ่งผลิตโดย

เมล็ดและรากของพืช และแบคทีเรียปฏิปักษ์บางชนิด เช่น *Bacillus subtilis* *Streptomyces* spp. และ *Pseudomonas fluorescens* เมื่อคลุกเมล็ดพืชแล้วเชื้อสามารถเจริญต่อไปยังราก แล้วเจริญไปแทนที่หรือแย่งพื้นที่บนรากพืช จนสามารถเจริญครอบครองผิวรากไว้ได้ (จิระเดช, 2549) ดังนั้นการที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-8 และ SDN-23 สามารถครอบครองรากได้ ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่ำ

จากผลการทดลองแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในระดับห้องปฏิบัติการและในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์บางไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. aphanidermatum* ให้ผลไม่สอดคล้องกันกับในระดับห้องปฏิบัติการและในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เช่น แบคทีเรียไอโซเลต LBN1-9 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในระดับห้องปฏิบัติการ สูงคือ 55.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปทดสอบในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ต่ำ คือ มีเปอร์เซ็นต์ดินแตกวารอดตายที่ 14 วัน เพียง 6.67 เปอร์เซ็นต์ หรือในกรณีของแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในระดับห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 22.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปทดสอบในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองมีประสิทธิภาพในการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำกว่าที่ 7 วัน สูงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแตงกวาในเวลา 14 วัน ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล 35 SD ได้ เหตุที่เป็นเช่นนี้เป็นไปได้ว่าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองมีสภาพแวดล้อมอื่นๆ หลายปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย หรือความสามารถในการควบคุมโรคและยับยั้งโรค ทำให้ผลการควบคุมโรคของเชื้อสาเหตุโรคไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ดี คือแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 ที่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตงกวาที่ 7 วัน และยังสามารถลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแตงกวาในเวลา 14 วัน ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล 35 SD ได้อีกด้วย ซึ่งความสามารถดังกล่าวแสดงถึงแนวโน้มของความสำเร็จที่จะนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปผลิตชีวภัณฑ์เชื้อชนิดผงเพื่อควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจาก *P. aphanidermatum* ในสภาพแปลงปลูกพืชต่อไป

ตารางที่ 5 ค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และค่าปริมาณ เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในดินหลังปลูกเป็นเวลา 14 วันในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี (ไอนุโซเลต/สายพันธุ์)	การเจริญครอบครองรากของ เชื้อรา <i>P. aphanidermatum</i> ^{1/} (%)		ปริมาณเชื้อรา <i>P.</i> <i>aphanidermatum</i> ^{2/} (CFU/g)
Control (-Py) ^{3/}	0.00 d ^{4/}	-	0.00 e ^{4/}
Control (+Py) ^{5/}	100.00 a	-	3000.00 a
metalaxyl 35 SD	28.67 cd	(-71.33%) ^{6/}	0.00 e
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	38.00 b-c	(-62.00%)	333.30 de
SDN-3	100.00 a	(0.00%)	0.00 e
SDN-8	23.30 cd	(-76.70%)	0.00 e
SDN-9	86.67 ab	(-13.33%)	0.00 e
SDN-15	100.00 a	(0.00%)	1500.00 b
SDN-23	41.00 b-d	(-59.00%)	0.00 e
SDN-32	nd ^{7/}	-	666.70 c-e
SDN-35	nd	-	0.00 e
SDN-36	100.00 a	(0.00%)	166.70 de
SDN-38	48.00 a-d	(-52.00%)	0.00 e
SDN-42	nd	nd	830.00 cd
LWN1-3	70.00 a-c	(-30.00%)	330.00 de
LBN1-1	nd	-	996.70 bc
LBN1-9	76.00 a-c	(-24.00%)	2966.70 a

^{1/} เปอร์เซนต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค โดยวางรากจำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Modified BNPR

^{2/} ปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน นำดินมาทำ dilution plate บนอาหาร Modified BNPR

^{3/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (-Py)

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

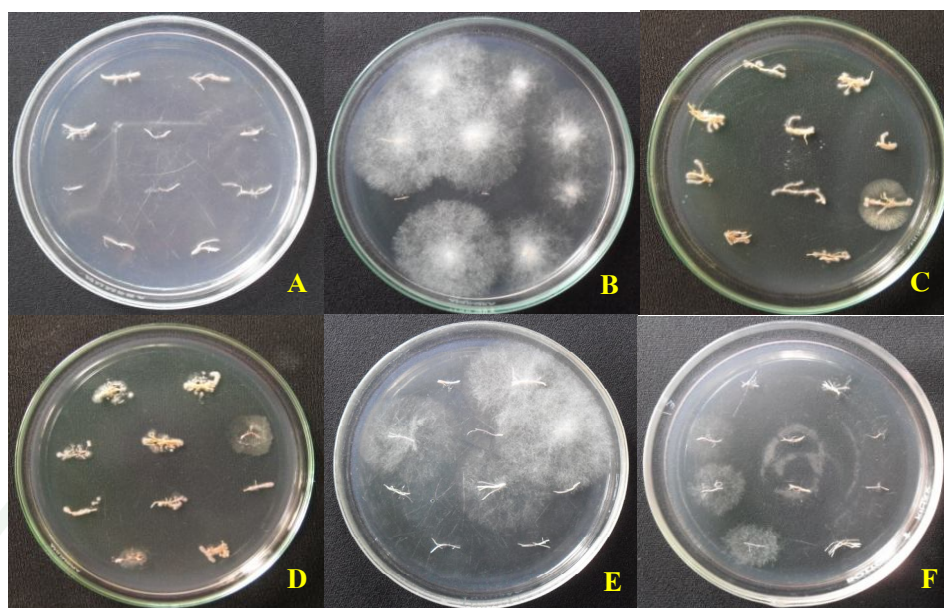
ตารางที่ 5 (ต่อ)

^{5/} กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (+Py) ในรูปเส้นใยแขวนลอยอัตรา 1 จาน ต่อ 800 มิลลิลิตร

^{6/} เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของการเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้โดย

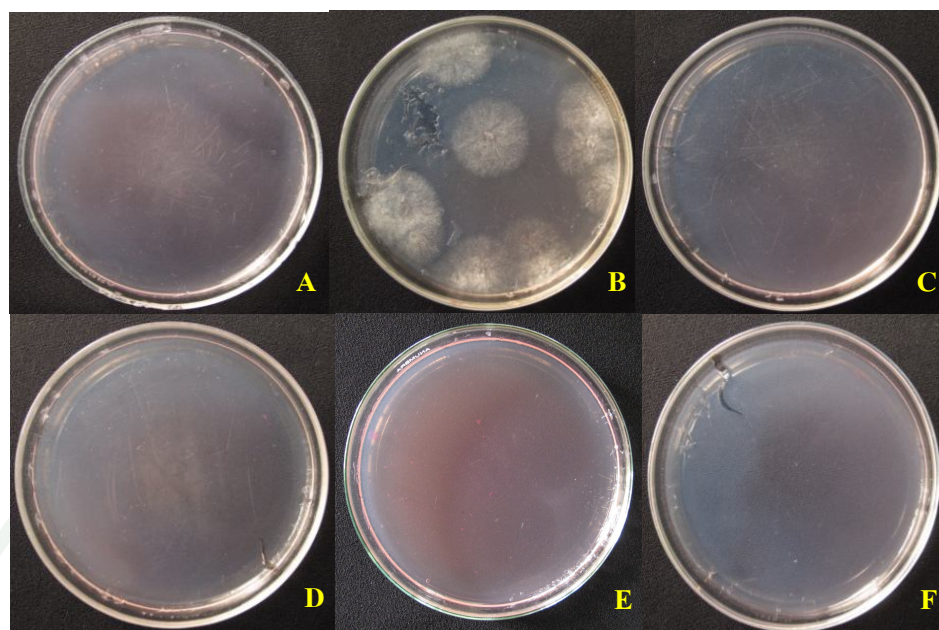
$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

^{7/} nd = non-Determined (ไม่ได้ตรวจสอบ)



ภาพที่ 3 การเข้าครองกรงรากแตงกวาของ *Pythium aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง บนอาหาร modified BNPR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- A. กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (-Py)
- B. กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (+Py)
- C. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35% SD
- D. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-8
- E. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9
- F. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23



ภาพที่ 4 การตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในดินในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองบนอาหาร modified BNPR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- A. กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (-Py)
- B. กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (+Py)
- C. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35 SD
- D. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-8
- E. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9
- F. กรรมวิธีที่แซมเมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23

6. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน ที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 7 วันและมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 14 วัน ได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และสามารถลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแตงกวาเป็นเวลา 14 วัน ได้อีกด้วย นำทั้ง 2 ไอโซเลตไปทำเครื่องหมายเพื่อเป็นติดตามเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้น 10 ppm ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M1-SDN-9, M2-SDN-9 และ M3-SDN-9 แบคทีเรียสายพันธุ์กลาย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-23-WT สายพันธุ์ดั้งเดิม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* น้อยกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ และสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin คือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย โดยมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีกว่าทุกไอโซเลต (ตารางที่ 6) ไปพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผง เพื่อนำไปทดสอบในสภาพแปลงปลูกพืชต่อไป

เมื่อนำสารกรองของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc method พบว่าสารกรองของแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายทั้งสามไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้

หลังการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ภายใกล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายทั้ง 3 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยติดสีน้ำเงินของ crystal violet และมีปฏิกิริยาแบบลบไม่เกิดสารเหนียวยึดเมื่อใช้ 3% KOH มีการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ ติดสีเขียวของ malachite green ในแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ส่วนในแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 ไม่มีการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ โดยไม่ติดสีเขียวของ malachite green (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ดั้งเดิมและแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ดัดแปลง rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	รัศมีโคโลนีของเชื้อรา <i>P. aphanidermatum</i> ^{1/}	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>P. aphanidermatum</i> ^{2/} (%)
Control ^{3/}	4.50	-
SDN-9-WT ^{4/}	6.76	22.08 b ^{5/}
M1-SDN-9 ^{6/}	3.00	66.67 a
M2-SDN-9	2.95	67.22 a
M3-SDN-9	2.75	69.45 a
C.V. ^{7/} (%)	-	5.68
SDN-23-WT	3.85	51.38 c
M1-SDN-23	2.60	71.11 a
M2-SDN-23	2.58	71.39 a
M3-SDN-23	2.73	69.72 a
M4-SDN-23	3.25	63.89 b
M5-SDN-23	2.48	72.50 a
M6-SDN-23	2.53	71.94 a
M7-SDN-23	2.68	70.28 a
M8-SDN-23	2.55	71.67 a
M9-SDN-23	2.60	71.39 a
M10-SDN-23	2.60	71.11 a
C.V. ^{7/} (%)	-	3.64

^{1/} รัศมีของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* วัดจากกึ่งกลางของโคโลนีถึงปลายเส้นใย (เซนติเมตร)
^{2/} ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ หลังจากวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 3 วัน

ตารางที่ 6 (ต่อ)

^{2/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. aphanidermatum* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
คำนวณจาก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค = $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$

R_1 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในงานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในงานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

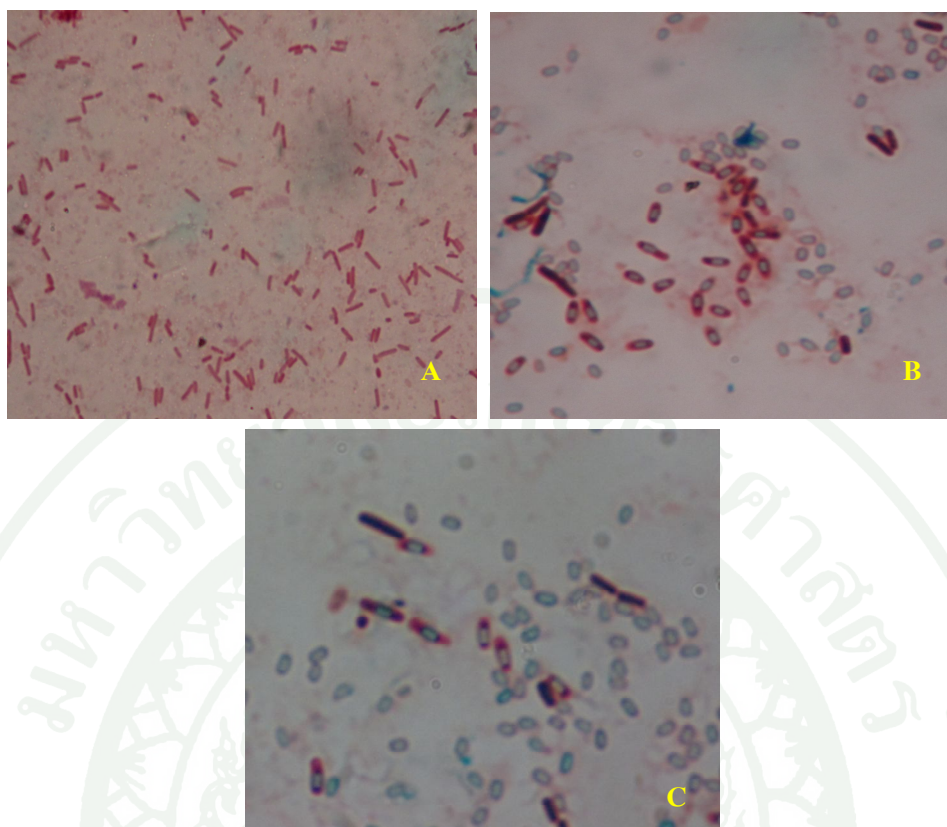
^{3/} กรรมวิธีควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (เชื้อรา *P. aphanidermatum*)

^{4/} WT = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม

^{5/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความหมายแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($P = 0.05$)

^{6/} M = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย (mutant) ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm

^{7/} C.V. (%) แสดงของแต่ละไอโซเลตนั้นเพื่อเป็นการเปรียบเทียบกันในระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm (M)



ภาพที่ 5 รูปร่างเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ก้นตุ๋นกลาย
ทั้ง 3 ไอโซเลต

- A. เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ก้นตุ๋นกลายไอโซเลต M3-SDN-9
- B. เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ก้นตุ๋นกลายไอโซเลต M5-SDN-23
- C. เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ก้นตุ๋นกลายไอโซเลต M5-LBN 1-5

7. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายบางชนิดที่ได้คัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพแปลงปลูกพืช

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลาย 3 ไอโซเลต คือ M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 มาใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลาย ไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีที่สุด เท่ากับ 69.45 และ 72.50 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต M5-LBN1-5 ได้รับจากนางสาววลัยลักษณ์ ศรีถวิล ที่ทดสอบพบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของต้นกล้าแตงกวาสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยที่ไอโซเลต M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังจากปลูกแตงกวาเป็นเวลา 14 วัน เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และมีความยาวรากสูงกว่ากรรมวิธีอื่น และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 38.52 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลต มาพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผงเพื่อทดสอบในสภาพแปลงปลูกพืช

จากการแช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน เท่ากับ 56.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมคิดเป็น 70.03 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วัน เท่ากับ 93.33 และ 96.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 28 วัน เท่ากับ 83.33 และ 93.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (คิดเป็น 19.04 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD ส่วนกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลาย ไอโซเลต M5-SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 28 วัน เท่ากับ 76.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเพียง 53.33 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 9.53 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. เมื่อต้นแตงกวาอายุ 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี

metalaxyl 35 SD และกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ส่วนเปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อสาเหตุโรคอื่น พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 พบเชื้อสาเหตุโรคอื่นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD เชื้อสาเหตุโรคอื่นเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ในกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายไอโซเลต M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 3.70 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลต รองลงมาคือกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-23 และ M3-SDN-9 ซึ่งเท่ากับ 8.33 และ 12.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลงเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคถึง 39.28 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเท่ากับ 13.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาที่งอกหลังปลูก 7 วัน ของทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแตงกวาหลังปลูก 14 และ 28 วัน อาจเป็นไปได้ว่าสภาพอากาศในช่วงที่ปลูกนั้นเป็นช่วงอากาศหนาวเย็นไม่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดแตงกวา เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (จิรวัดน์, 2551) แต่อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลาย ช่วยให้เปอร์เซ็นต์การงอกหลังปลูกที่ 7 วัน และมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วัน เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การนำเมล็ดแตงกวาแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะก่อนปลูกลงดินส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นกล้าแตงกวาสูงขึ้น เพราะการคลุมเมล็ดพืชหรือการแช่เมล็ด ช่วยให้จุลินทรีย์ปฏิชีวนะอยู่ใกล้ หรือสัมผัสกับส่วนของพืชที่จะถูกเข้าทำลายโดยเชื้อโรคพืชมากที่สุด จึงเป็นผลดีต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคในระยะที่เมล็ดพืชเริ่มงอกหรือเจริญเป็นต้นกล้า (จิระเดช และคณะ, 2546)

นิชากร (2553) รายงานว่า การแช่เมล็ดข้าวในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย ในน้ำผสมด้วยผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปปลูก พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต KP07 ชนิดผง มี

เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดคือ 99.12 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากรรมวิธีใช้เมล็ดดี (98.27 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้การใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อเมล็ดแดงกว่าก่อนปลูกช่วยทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกหลังปลูก 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 และที่ 28 วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะว่าการแช่เมล็ดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ช่วยลดการเกิดโรคเมล็ดเน่าและโรคเน่าระดับดินลงได้มาก ใช้ธาตุอาหาร เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน รอบๆ ผิวเมล็ดกับเชื้อโรค เชื้อรา *Trichoderma* แย่งและอาจจะมีการเป็นปรสิตหรือการสร้างปฏิชีวนสารยับยั้งเชื้อโรคอีกด้วย (จิระเดช, 2549) เช่น การใช้ *T. virens* ในรูปสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือใช้ผงเชื้อรา *T. virens* อัตรา 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเมล็ด คลุกเมล็ดแดงกว่าก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อโรค พบว่าช่วยให้แดงกวมมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใช้เชื้อปฏิชีวน และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl หรือการใช้เชื้อรา *T. virens* สายพันธุ์ GI-13 คลุกเมล็ดข้าวโพดสาเหตุจากโรค สามารถควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium ultimum* *P. arrhenomanes* และ *Fusarium graminearum* ได้และช่วยให้มีจำนวนต้นรอดตายเพิ่มขึ้น ความสูงและน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น ช่วยให้การเกิดโรครากเน่าลดลง เมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีควบคุมเชื้อราและจุลินทรีย์ปฏิชีวนอื่นๆ (Mao *et al.*, 1997) นอกจากการแช่เมล็ดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และการแช่ด้วยผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนทั้งสามไอโซเลต ช่วยให้เมล็ดแดงกวมมีเปอร์เซ็นต์การงอกและต้นรอดตายที่สูงแล้ว ยังช่วยลดการเกิดโรคของต้นกล้าแดงกวมเมื่ออายุ 28 วัน ได้ดีอีกด้วย อาจเป็นเพราะเชื้อมีคุณสมบัติในการแข่งขันการใช้อาหารบนผิวเมล็ดทำให้เมล็ดไม่ถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย ส่งผลให้พืชมีความแข็งแรง เกิดโรคลดลง เช่น จารุวรรณ (2556) รายงานว่าการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *P. aphanidermatum* ของผักกาดหอม ในระบบไฮโดรโปนิกส์ได้ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus mycoides* FL17 เกล็ดแป้งสูตร 3 มีดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุด (25.17 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เกิดโรคสูงสุด (91.67 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งช่วยลดการเกิดโรครากเน่าได้ 61.39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอมได้โดยทำให้น้ำหนักสดของต้นผักกาดหอมเพิ่มขึ้น 84.61 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับที่ Malin *et al* (2000) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์กลาย 5-2/4 สามารถควบคุมโรคเน่าของต้นกล้ามันฝรั่งสาเหตุจาก *Pythium ultimum* ได้ ช่วยลดการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค มีการสร้างปฏิชีวนสาร 2,4 -diacetylphloroglucinol ยับยั้งเชื้อโรค และสามารถป้องกันการเกิดโรคกับต้นกล้ามันฝรั่งได้สูง สอดคล้องกับที่ พรหมมาศ (2548) ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนบริเวณรากพืช (rhizobacteria) โดยการแยกแบคทีเรียจากบริเวณเขตรากพืช (rhizosphere) ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบ NFT แล้วนำไปคัดเลือกความสามารถในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Pythium myriotylum* และทดสอบประสิทธิภาพในการ

ควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่อายุ 3 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะมีแนวโน้มลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้

ตารางที่ 7 ค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นกล้าแทงกวางที่งอกหลังปลูก 7 วัน และเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นแทงกวางที่ รอดตาย 14 และ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ด เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี (ไอโซเลต/สายพันธุ์)	เปอร์เซ็นต์การงอก 7 วัน (%)	เปอร์เซ็นต์ต้น รอดตาย 14 วัน (%)	เปอร์เซ็นต์ต้น รอดตาย 28 วัน (%)
Control ^{1/}	33.33 b ^{2/}	96.67 a ^{2/}	70.00 b ^{2/}
metalaxyl 35 SD	26.67 b (-19.98%) ^{3/}	56.67 ab (-41.38%) ^{3/}	53.33 c (-23.81%) ^{3/}
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	70.00 a (+110.02%)	93.33 a (-3.46%)	93.33 a (+33.33%)
M3-SDN-9	56.67 a (+70.03%)	93.33 a (-3.46%)	83.33 ab (+19.04%)
M5-SDN-23	40.00 b (+20.01%)	83.33 a (-13.80%)	76.67 b (+9.53%)
M5-LBN1-5	56.67 a (+70.03%)	96.67 a (0.00%)	93.33 a (+33.33%)
C.V. (%)	15.78	8.69	10.93

^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เป็นดินในแปลงปลูกธรรมชาติ

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

^{3/} เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด และต้นรอดตาย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อสาเหตุโรคอื่น จากเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก เมื่อต้นแตงกวาอายุ 14 วัน หลังจากแช่เมล็ด เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี (ไอโซเลต/สายพันธุ์)	เปอร์เซ็นต์ต้นตาย ที่ 14 วัน	เปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อ รา <i>Pythium</i> sp. ^{1/}	เปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อ สาเหตุโรคอื่น ^{1/}
Control ^{2/}	3.33 b ^{3/}	0	100
metalaxyl 35 SD	43.33 a	0	100
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	6.66 b	50	50
M3-SDN-9	6.66 b	50	50
M5-SDN-23	3.33 b	0	100
M5-LBN1-5	16.66 b	0	100
C.V. (%)	56.46		

^{1/} เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่พบเชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อสาเหตุโรคอื่น ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อรา } Pythium \text{ sp.} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่พบเชื้อรา } Pythium \text{ sp. (กรรมวิธี)}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่ไม่งอก (กรรมวิธี)}} \times 100$$

^{2/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เป็นดินในแปลงปลูกธรรมชาติ

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม วิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

ตารางที่ 9 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี (ไอโซเลต/สายพันธุ์)	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ที่ 28 วัน ^{1/}
Control ^{2/}	39.28 a ^{3/}
metalaxyl 35 SD	13.33 b (-66.06%) ^{4/}
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	0.00 b (-100.00%)
M3-SDN-9	12.50 b (-68.17%)
M5-SDN-23	8.33 b (-78.79%)
M5-LBN1-5	3.70 b (-90.58%)

^{1/}เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Disease incidence} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดโรค (ซ้ำ)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ไม่เกิดโรค (ซ้ำ)}} \times 100$$

^{2/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เป็นดินในแปลงปลูกธรรมชาติ

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตาม วิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

^{4/} เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จำนวนได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

8. การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายบนรากแตงกวาในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน (Damping-off) ที่เกิดจาก

เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพแปลงปลูกพืช

เมื่อนำรากแตงกวาที่มีอายุ 28 วัน วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified BNPRa เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่ำกว่าทุกกรรมวิธี และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเจริญครอบครองรากของ กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองราก เท่ากับ 65.55, 58.34 และ 59.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองราก เท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) จากค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ของกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 200.03 เปอร์เซ็นต์ นั้นอาจเป็นเพราะสารเคมีที่ใช้มีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ลดลง เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้เพิ่มหรือเติมสารเคมีลงในดินมี เพียงแต่ใช้สารเคมีเพื่อแช่เมล็ดแตงกวาก่อนปลูกเท่านั้น เป็นผลทำให้สารเคมีไม่สามารถควบคุมโรคได้เมื่อต้นแตงกวามีอายุมากขึ้น 28 วัน ถ้ามีการใส่สารเคมีเพิ่มเติมในช่วงเวลา 7 หรือ 14 วัน อาจช่วยลดการเกิดโรคเน่าระดับดินที่บริเวณรากพืชได้

จากการศึกษาการเจริญครอบครองรากของ แบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองราก เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเจริญติดไปกับรากพืช แข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรค ทำให้สามารถครอบครองผิวรากได้ ดังที่จิระเดช (2549) กล่าวว่า การควบคุมโรคส่วนใหญ่ที่ใช้วิธีการคลุกเมล็ดด้วยจุลินทรีย์ก่อนปลูกก็เพื่อให้จุลินทรีย์ได้มีโอกาสครอบครองเมล็ดหรือบริเวณรอบๆ ราก (rhizosphere zone) ก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าไปสู่ราก แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นิยมใช้คลุกเมล็ด หรือขึ้นส่วนของพืช เช่น แบคทีเรีย *B. subtilis* *Streptomyces* spp. และ *P. fluorescens* บางกรณีเมื่อมีการคลุกเมล็ดหรือขึ้นส่วนของพืชแล้วเชื้อสามารถเจริญต่อไปยังราก แล้วเข้าเจริญแทนที่หรือแย่งที่บนรากพืช ซึ่งปกติจะเป็นที่อาศัยของ

จุลินทรีย์ประจำถิ่นทั่วไป จนสามารถเจริญครอบครองบริเวณส่วนใหญ่ไว้ได้ โดยเฉพาะบริเวณ ปลายราก เช่นการทดลองของ เพ็ญศักดิ์ (2552) ที่นำแบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมโรคเน่าของ ผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่าแบคทีเรีย ปฏิชีวนะสามารถครอบครองบริเวณผิวรากบริเวณด้านนอกและผิวด้านในได้ดีทุกกรรมวิธี เช่น ไอโซ เลต GC14, R015 และ FL17 มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากเท่ากับ 93.3, 86.7 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ส่วนการตรวจนับปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิชีวนะในดิน ไม่พบเชื้ออยู่ในดิน อาจเพราะสภาพแวดล้อมมีผลต่อการเจริญ ของเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ อากาศ แหล่งอาหาร โครงสร้างดิน และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เป็นต้น เชื้อรา และแบคทีเรีย บางชนิดสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เช่น ทนอุณหภูมิความชื้น สูงได้ บางชนิดยังทนต่อการแข่งขันหาอาหาร หรือทนต่อการเป็นศัตรูของสิ่งมีชีวิตอื่น ได้ทั้งที่เป็น พวกตัวห้ำ และตัวเบียน หรือจุลินทรีย์ในดินอาจมีกลไกการแข่งขัน (competition) การเป็นปรสิต (parasitism) การสร้างสารพิษหรือสารปฏิชีวนะ (antibiosis) เป็นต้น เพื่อต่อสู้ในการใช้อาหาร บริเวณรากพืช ซึ่งในดินมีกิจกรรมหรือกระบวนการต่างๆ เกิดขึ้นมากมายและมีความสัมพันธ์กัน อย่างซับซ้อน ระหว่าง พืช จุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อม (จิระเดช, 2549 และ นิพนธ์, 2533) หรือ อาจเป็นเพราะช่วงที่ปลูกนั้นอุณหภูมิไม่คงที่เมื่อเริ่มปลูกเกิดอุณหภูมิต่ำ และอุณหภูมิเริ่มสูงขึ้นใน เวลาถัดมา (เพิ่มอุณหภูมิในแต่ละเดือน) เพราะเชื้อรา *P. aphanidermatum* เข้าทำลายกล้าพืชที่ อุณหภูมิสูง 32-37 องศาเซลเซียส (Thomas *et al.*, 1998; Yong Nian, 1989)

นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองครั้งนี้เมื่อทดสอบการควบคุมโรคในสภาพเรือน ปลูกพืชทดลอง พบปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดิน เพราะในการทดลองได้ใส่เชื้อรา *P. aphanidermatum* ลงไปในดิน เพื่อทดสอบการควบคุมโรคของแบคทีเรียปฏิชีวนะ แต่ในขณะที่การ ทดลองในสภาพแปลงปลูกพืช ไม่ได้ใส่เชื้อสาเหตุโรค จึงไม่พบปริมาณเชื้อร่วมกับปัจจัย สภาพแวดล้อมในสภาพแปลงปลูกพืชทดลองนั้นมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าในเรือนปลูกพืช ทดลอง แต่ในสภาพแปลงปลูกพืช มีปริมาณเชื้อสาเหตุโรคจำนวนหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดโรคเน่า ระดับดินได้ จากผลการตรวจการเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* (ตารางที่ 10) ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิชีวนะนั้น ใช้เพียงแค่แช่เมล็ดก่อน ปลูกลงดิน เชื้อสามารถติดไปกับผิวรากได้แต่ที่ไม่พบในดินอาจเป็นเพราะประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิชีวนะ มีไม่มากพอที่จะอาศัยอยู่ตามดินปลูก เพราะเชื้อต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อดำรงชีพในดินได้ ซึ่งการทดลองนี้ไม่ได้ใส่

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพิ่มเติมนอกจากเชื้อแบคทีเรียที่แช่เมล็ดแตงกวาก่อนปลูกลงดินเท่านั้น ถ้าใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพิ่มเติมอาจพบเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในดินก็เป็นได้

เมื่อนำผลผลิตแตงกวาไปชั่งน้ำหนัก พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต M5-SDN-23 มีน้ำหนักของผลผลิตที่สูงกว่าทุกกรรมวิธี คือ 1.15 และ 1.03 กิโลกรัม ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีน้ำหนักของผลผลิตเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl 35 SD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อสาเหตุโรคน้ำหนักของผลผลิตเท่ากับ 0.7 กิโลกรัม (ตารางที่ 11)

จากการบันทึกผลผลิตของแตงกวา ในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง พบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แช่เมล็ดแตงกวานั้น ช่วยให้มีน้ำหนักของผลผลิตสูง อาจเป็นเพราะแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 สามารถเพิ่มต้นรอดตาย (ตารางที่ 7) ลดการเกิดโรค (ตารางที่ 9) และมีเปอร์เซ็นต์การเจริญกรอบครองรากสูง (ตารางที่ 10) ทำให้ต้นแตงกวาอาจมีรากเพิ่มมากขึ้นด้วย เมื่อมีรากมากต้นแตงกวาก็สามารถดูดธาตุอาหารจากดิน ส่งผลให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 จะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชแล้ว ยังสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และการสร้างดอกของพืชอีกหลายชนิด ไม้ดอกไม้ประดับที่ปลูกในกระถางพืชผักต่างๆ กล้าไม้ผลที่เพาะด้วยเมล็ด ตลอดจนกิ่งปักชำ และพืชหัวโดยเพิ่มขนาดและความสูงของต้น น้ำหนักของต้นพืชทั้งต้น น้ำหนักของหัว ตั้งแต่ 10-60% (จิระเดช และคณะ, 2546)

ตารางที่ 10 ค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่อายุ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกลงในแปลงปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี (ไอโซเลต/สายพันธุ์)	การเจริญครอบครองราก ของเชื้อรา <i>P.</i> <i>aphanidermatum</i> ^{1/} (%)	การเจริญครอบครองรากของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ^{1/} (%)
Control (-Py) ^{2/}	3.33 a ^{3/}	0.00 b ^{3/}
metalaxyl 35 SD	10.00 ab (+200.3%) ^{4/}	0.00 b
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	0.00 b (-100.00%)	66.67 a
M3-SDN-9	0.00 b (-100.00%)	65.55 a
M5-SDN-23	0.00 b (-100.00%)	58.34 a
M5-LBN1-5	3.00 b (-9.91%)	59.44 a
C.V. (%)		36.72

^{1/} เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวางรากจำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Modified BNPRAs สำหรับเชื้อราสาเหตุโรค และ บนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นที่ 10 ppm สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนอาหาร Martin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum*

^{2/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (-Py)

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

^{4/} เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของการเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรค เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

ตารางที่ 11 อิทธิพลของแบคทีเรียปฏิชีวนะพันธุ์กลายต่อน้ำหนักผลผลิตของต้นแตงกวาเก็บผลผลิต 20 วันในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี	น้ำหนัก (กก.)
Control (-Py) ^{1/}	0.7 b ^{2/}
metalaxyl 35 SD	0.8 ab
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	1.15 a
M3-SDN-9	0.95 ab
M5-SDN-23	1.03 a
M5-LBN1-5	0.99 ab
C.V. (%)	20.29

^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (-Py)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

สรุป

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากได้ 56 ไอโซเลต จากใบแดงกว่า 65 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 121 ไอโซเลต แต่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคนำระดับดินของต้นกล้าแดงกว่าบนอาหาร PDA ได้ดีเพียง 13 ไอโซเลต โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 13.75-55.28 เปอร์เซ็นต์ จึงได้คัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพในเรือนปลูกพืชทดลอง ด้วยการแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SDN-9 และ SDN-23 ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 7 วัน และมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 14 วัน เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และสามารถลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในดินหลังจากปลูกแดงกว่าเป็นเวลา 14 วันได้ เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลตไปทำเครื่องหมายโดยการพัฒนาให้แบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้น 10 ppm พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีกว่าทุกไอโซเลต จึงนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรสำเร็จชนิดผง เพื่อทดสอบในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN1-5 ไปทดสอบในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-LBN1-5 ช่วยให้เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายหลังการปลูก 14 และ 28 วัน เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 อีกทั้งลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นกล้าแดงกว่าที่มีอายุ 28 วัน ได้เทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

นอกจากนี้เมื่อนำรากแดงกว่าที่มีอายุ 28 วัน วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified BNPRa เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่ำกว่าทุกกรรมวิธี และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลต สามารถเจริญครอบครองรากแดงกว่าได้ และมีน้ำหนักผลผลิตของต้นแดงกว่าเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD และการแช่เมล็ดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จารุวรรณ บัวสุวรรณ. 2556. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ของผักกาดหอม ซึ่งปลูกด้วยระบบไฮโดรโพนิกส์แบบ NFT. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรครากเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 40 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทนู, วิวัฒน์ เสือสะอาด, โกศล เจริญสม, นิพนธ์ ทวีชัย, ทิพย์ดี อรรถธรรม และอรพรรณ เกินอาษา. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. คลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 323 หน้า.
- จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทนู, พรามาส เจริญรักษ์ และนพดล สอดแสงอรุณงาม. 2555. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคกล้าเน่ายุบของกล้าข้าว. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 10: การอารักขาพืชไทยในสถานะโลกร้อน, เชียงใหม่.
- จิรวัดน์ ภูเสริมภูมิ. 2551. ผักกินผล. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ. 20-23 หน้า
- จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2546. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จุฑารัตน์ เพชรแก้ว. 2554. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสขององุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดวงใจ เสรีโพนุลย์ทรัพย์. 2548. การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดในต้นแตงกวาที่ได้รับการชักนำด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิชากร แซ่ตั้ง. 2553. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและลดโรคเมล็ดต่างของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

นิตยา สุวรรณรัตน์. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราขึ้นดำ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นพรัตน์ มีนาโพธิ์. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Gliocladium virens* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พงศ์เทพ เต่าประยูร. 2522. การศึกษาโรคเน่าและรากเน่าของมะละกอในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2548. ศักยภาพของแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium myriotylum* ในระบบ NFT, ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7: อารักขาพืชเพื่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม. โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว, เชียงใหม่.

เพ็ญภักดิ์ เสาวภาคย์. 2552. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เจริญครอบครองรากในการควบคุมโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภิญโญ จักรอิสราพงศ์. 2517. การศึกษาโรคโคนเน่าของกล้วยาสุบที่เกิดจากเชื้อ *Pythium*

aphanidermatum (edson) fitzp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วรารณ บุญเกิด. 2550. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus*

spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิชัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ. 351 หน้า.

วิชัย โฉมรัตน์. 2549. บทปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 174 หน้า.

ศรานนท์ เจริญสุข. 2552. คู่มือการเกษตร ผักสวนครัว. ส่งเสริมอาชีพธุรกิจ เพชรกะรัต, กรุงเทพฯ.

108 หน้า.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมศิริ แสงโชติ. 2529. โรคพืชเบื้องต้นและบทปฏิบัติการ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนงค์ จันทศรีกุล. 2536. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. ไทยวัฒนาพานิช,

กรุงเทพฯ. 126 หน้า.

อุบล คือประโคน. 2525. การแยกเชื้อจำแนกชนิดและความสามารถของเชื้อรา *Phytophthora* spp.

และ *Pythium* spp. ต่อการเกิดโรคโคนเน่าและรากเน่าของพริกไทย. รายงานผลการ

ค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2525. สาขาวิทยาไมโค, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการ

เกษตร, กรุงเทพฯ.

- Arwiyanto, T., K. Sakata, M. Goto, S. Tsuyamu and Y. Takikama. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 60: 288-294.
- Chamswarn, C., P. Leeprasert, and S. Chantana - o - tan. 1985. Population assessments of soil borne plant pathogens, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. in soil and their correlation to disease incidence on intercropping system. In **Cropping Programmes KU- ACNARP**. Fact. of Agri., Kasetsart Univ., Bangkok, Thailand. 80 P.
- Couch, H. B. 1974. **Diseases of Turfgrasses**. 2nd edn. Krieger Pub. Co., Melbourne, Florida, 348 pp.
- Cubeta, M. A. and E. Echandi. 1991. Biological control of *Rhizoctonia* sp. and *Pythium* sp. damping-off of cucumber. **Biological control** 1, 227-236.
- George, N. A. 1997. **Plant Pathology**. Academic Press, London, San Diego, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. 266-270 P.
- Grisanapundha, N. 1987. ***Pythium* species from crucifer planted soil and their pathogenicity**. M.S.Thesis, Kasetsart Univ., Bangkok Thailand.
- Hickmam, G. W, and T. J. Michailides. 1998. Control option for greenhouse cucumber damping-off disease. **Journal-of-Vegetable-Crop-Protection** 4: 45-48.
- Intana, W., C. Chamswang, W. Intanoo, C. Hongprayoon and K. Sivasithamparam. 2003. Use of mutant strains for improved efficacy of *Trichoderma* for controlling cucumber damping-off. **Thai J. Agric. Sci.** 37: 429-439.

- Intana, W. 2003. **Selection and development of *Trichoderma* spp. For high glucanase, antifungal metabolites producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by *Pythium* spp.** Ph.D. Dissertation. Kasetsart University, Bangkok. 202 pp.
- Locke, J. C., G. C. Papavizas, J. A. Lewis, R. D. Lumsden and J. G. Kantzen. 1983. Control of *Pythium* blight of snap beans by seed treatment with systemic fungicides. **Plant Dis.** 67: 974-97.
- Malin, H., B.T. Alsanius and P.T. Sundin. 2000. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the Suppression of damping-off in tomato seedlings. **Biological Control** 19: 1-8.
- Mao, W., J.A. Lewis, P.K. Hebbbar and R.D. Lamsden. 1997. Seed treatment with a fungal or bacteria antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. **Plant Dis.** 81: 450-454.
- Migheli, Q., L. Gonzalaz-Candelas, L. Dealessi, A. Camponogara and D. Ramon-Vidal. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the beta-1,4-endoglucanase gene *eglI* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. **Phytopathology** 88: 673-677.
- Mondal, S. N. and M. Hyakumachi. 2000. Soil factors affecting carbon loss and pathogenicity of oospores of *Pythium aphanidermatum*. **Soil Biol. Biochem.** 32: 111-118.
- Nelson, E. B., Harman, G. E. and Nash, G. T. 1987. Enhancement of *Trichoderma*-Induced Biological Control Pre-emergence Damping-off of Peas. **Geneva**. NY. USA.

- Paulitz, T. C., Anas, O. and Fernando, D. G. 1992. Biological control of Pythium damping-off by seed-treatment with *Pseudomonas putida*: relationship with ethanol production by pea and soybean seeds. **Biocontrol Sci. Technol.** 2: 193-201.
- Plaats-Niterink, A.J. vander. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Stud. **Mycologia**. 21:242 P.
- Rankin, L. and Paulitz, T.C. 1994. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of Pythium root rot of greenhouse cucumber in hydroponic culture. **Plant Dis.** 78: 447-451.
- Sanders, P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control Pythium blight on turfgrass in Pennsylvania. **Plant Dis.** 68: 776-777.
- Sanders, P.L. 1987. Failure of metalaxyl to control Pythium blight on Kentucky golf courses. (Abstr.) **Phytopathology** 68: 776-777.
- Sinclair, J. B. (ed.) 1982. **Compendium of Soybean Diseases**. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 104 P.
- Suhas, R. G., Sumner, D. R. and Phatak, S. C. 1991. Stand and yield of cucumber seeded with fungicides in various tillage systems. **Plant Pathology and Horticulture**. Tifton, Georgia, USA.
- Susan Isaac. 1992. **Fungal-Plant Interactions**. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 114 P.
- Suslow, T.V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of Sugar beet: Effects of seed application root colonization on yield. **Phytopathology** 72: 199-206.

Thomas, A. Z., D. L. Hopkins and C. E. Thomas. 1998. Compendium of Cucurbit Diseases. **The American Phytopathological Society**, USA.

Van Dijk, K. and E. B. Nelson. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 5340-5347.

Yong-nian , Y. U. and M. A. Guo-zhong. 1989. The genus *Pythium* in China. International **Academic Publishers**, China. 21-22 P.

Zhang, W., W. A. Dick and H. A. Hoitnik. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. **Phytopathology** 86: 1066.



สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้หลังจากเตรียมเสร็จให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง (ปอกเปลือกแล้ว)	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

2. Nutrient glucose agar (NGA) (Schaad, 1980)

Beef extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

3. Water agar (WA 0.1 %)

Agar	1.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

4. Martin's medium (Johnson and Curl, 1972)

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
Bacto Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

Rose Bengal red (1%)	0.032	กรัม
----------------------	-------	------

Streptomycin	1	กรัม
--------------	---	------

* ละลาย Rose Bengal ในน้ำก่อนผสมกับสารอื่น จากนั้นค่อยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ส่วน Streptomycin เติวก่อนเทอาหาร ในขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

5. Modified BNPR (Chamswarn *et al.*, 1985)

Mycostatin	0.5	มิลลิลิตร
Ampicillin	500	มิลลิกรัม
Benomyl (Benlate 50% WP)	0.02	กรัม
PCNB (75%WP)	0.025	กรัม
Rifampicin	0.01	มิลลิกรัม
Rose Bengal	0.005	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร ผสมสาร 40 มิลลิลิตร เติมน้ำในอาหาร PDA ขณะอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส 360 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทั่วก่อนเทในจานเลี้ยงเชื้อ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวณัฐสุดา คำยอด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2552 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ประสบการณ์การทำงาน	คุณครู โรงเรียนกรพิทักษ์ศึกษา
ประชุมวิชาการ/ผลงาน	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> สาเหตุโรคเน่าระดับดินของ ต้นกล้าแตงกวา ในการประชุมวิชาการอารักขาพืช แห่งชาติ ครั้งที่ 11 วันที่ 26-28 พฤศจิกายน 2554 เขื่อนทราคอนเวนชันเซ็นเตอร์ จังหวัดขอนแก่น