รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

ชื่อแผนงานวิจัย: วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สูงเชิงพาณิชย์

ชื่อโครงการวิจัย: โครงการวิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

ชื่อกิจกรรม: สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

ชื่อการทดลองที่: การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริก

Screening of *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. for control Root-knot nematodes in Chili

หัวหน้าการทดลอง: นายวีรกรณ์ แสงไสย์ สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผู้ร่วมงาน: นายไตรเดช ข่ายทอง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางธิติยา สารพัฒน์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวรุ่งนภา ทองเครง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ: โรครากปมของพริกเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* Chitwood มีการระบาดให้เห็นในพริกทุกสายพันธุ์ ความรุนแรงแตกต่างกันตามสายพันธุ์พริก การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและต่อเนื่อง โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำพวกแบคทีเรียมาใช้ควบคุมการเกิดโรค เก็บตัวอย่างดินจากแปลงพริกจาก 3 จังหวัด ได้แก่ หนองคาย สกลนคร และนครพนม ได้ตัวอย่างดินจำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง นำดินที่เก็บรวบรวมได้มาปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย แยกเชื้อแบคทีเรียและจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นได้เชื้อทั้งหมด จำนวน 100 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. จำนวน 50 ไอโซเลต เชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. จำนวน 50 ไอโซเลต ทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B30 สามารถสร้างเอนไซม์ protease และเอนไซม์ chitinase ได้ดีที่สุด นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* พบว่า culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 และ B43 ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยปมได้ดีที่สุด คือ 98.19 และ 97.99 เปอร์เซ็นต์ ส่วน culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต S8 และ S13 ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 88.17 และ 87.33 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบในโรงเรือนทดลองโดยใช้ cell suspension $1x10^9$ cfu/ml และ culture filtrate ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราที่ใช้ 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 ควบคุมการเกิดโรคปมจากไส้เดือนฝอยปมได้ดีที่สุด 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการบ่งชี้ชนิดเชื้อ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้เป็นแนวทาง

ในการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลต B37 ไปทดสอบการควบคุมโรครากปมของพริกในสภาพไร่เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแวดล้อมจริง

Abstract: Root gall disease caused by root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) one of the most destructive pests of a wide range of crops, nematodes are one of the most important pests in chilli crop. Biological control by using bacterial antagonists has attracted much interest as an alternative strategy to chemical methods of controlling plant pathogens. Biological control becomes more familiar due to its environmental compatibility and non-toxic nature. Bacterial strains have been found to be antagonistic to plant-parasitic nematodes. While, very few biocontrol products are currently commercially available and methods for the biological control of plant-parasitic nematodes are still under discovering and searching. Bacteria were isolated from soils collected from chilli growing areas in Nong Khai, Sakhon Kakhon and Nakhon Phanom isolated 50 of *Bacillus* spp. and 50 of *Streptomyces* spp. Subsequently, the top 6 isolates from each bacteria isolate such as *Bacillus* B37, B43 and B45 for *Streptomyces* S8, S13 and S33 which were most effective in reducing the egg hatching of *M. incognita* in 100% culture filtrate was 80-90%. As a culture filtrate, activities of protease of *Bacillus* spp. could be detected at a highly significant different level among the bacteria isolates. ,however, low chitinase activity was detected. For *Streptomyces* both enzyme activities were not detected. From the soils, 3 isolates of *Bacillus* spp. and 3 isolates of *Streptomyces* spp. antagonistic to *M. incognita* were obtained in laboratory. In green house, grow chilli in the pots and egg nematode inoculated after that drench 6 effective bacterial in the pots every week. The isolates that were most effective in controlling root gall disease were 80-90%, Identified were *Bacillus subtillis* (isolate B37), *Bacillus subtillis* (isolate B43) and *Bacillus amyloliquefaciens* (isolate B45) for *Streptomyces canus* (isolate S8), *Streptomyces diastaticus* (isolate S13) and *Streptomyces albus* (isolate S33).

คำนำ: ปัญหาที่สำคัญของการปลูกพริก คือ ศัตรูพืช ส่วนใหญ่พบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพริก เช่น เพลี้ยไฟ ไรพริก และโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุต่างๆ เช่น เชื้อ ไวรัส แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ, 2552) โรครากปมของพริกเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* Chitwood มีการระบาดให้เห็นในพริกทุกสายพันธุ์ ความรุนแรงแตกต่างกันตามสายพันธุ์พริก โดยระบาดสูงสุดในพริกสายพันธุ์อ่อนแอ มีรายงานการระบาดรุนแรงใน อ.ม่วงสามสิบ จ.อุบลราชธานี ในปี 2549 ทำให้ผลผลิตพริกเสียหายถึง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นับว่าเป็นศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เพราะเมื่อมีไส้เดือนฝอยรกปมเข้าสู่รากพริกในระยะกล้าเพียงตัวเดียว ภายใน 20 วัน จะเพิ่มปริมาณประชากรในดิน 400-500 ตัว แล้วกลับเข้ามาทำลายระบบรากและ

ขยายพันธุ์ต่อเนื่องทันที เมื่อต้นพริกอายุ 3 เดือน ไส้เดือนฝอยจะมีวงจรชีวิตรวม 3 ชั่วอายุ เกิดความเสียหายต่อพริก (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, 2550)

การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมทำได้หลายวิธี เช่น การเขตกรรม การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่อนข้างส่งผลกระทบต่อการเกิดพิษตกค้างในระบบนิเวศ เนื่องจากการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมนั้นต้องใช้วิธีราดหรือโรยสารเคมีลงดินเป็นหลัก การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและต่อเนื่อง โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จำพวกเชื้อราหรือแบคทีเรียมาใช้ควบคุม การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์ปฏิปักษ์กลุ่มที่มีการศึกษากันมาก คือแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช ซึ่งหลายชนิดนอกจากสร้างสารที่มีคุณสมบัติส่งเสริมหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช แล้วยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชรวมทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โดยมีกลไกการควบคุมใน 4 ลักษณะ คือ 1) ผลิตสารทุติยภูมิ เช่น สารพิษหรือสารปฏิชีวนะ ยับยั้งการฟักไข่หรือทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 2) ย่อยสลายสารที่ขับออกมาจากบริเวณรากพืช ซึ่งมีผลต่อพฤติกรรมการเคลื่อนที่เข้าหารากพืช 3) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดเข้าไปเจริญอยู่ภายในตัวไส้เดือนฝอยแล้วดูดกินของเหลวภายในลำตัว ทำให้ไส้เดือนฝอยอ่อนแอและตายในที่สุด และ 4) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม (ยุวดี ชูประภาวรรณ, 2559) แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เช่น การใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* spp. และเชื้อรา *Arbuscular mycorrhizae* โดยใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ที่เข้าทำลาย ส้ม มะเขือเทศ มันฝรั่ง และพริกได้ Rajendran et al., (2001) หรือการใช้เชื้อ *P. fluorescens* และ *B. subtilis* ควบคุมประชากรของ *M. incognita* ที่ทำลายถั่ว chickpea รวมทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโตและยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้ (Khan et al., 2001) Prakob และคณะ (2009) นำเชื้อ *B. subtillis* และ *Pseudomonas aeruginosa* มาใช้แบบเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับสารชีวภัณฑ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมโรครากปมผักสลัด ในพื้นที่สูงในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและสภาพแปลง พบว่า เชื้อปฏิปักษ์ลดประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในดินปลูกได้ รัตติกาล (2556) ทดสอบใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*–PR87 สามารถผลิตสาร secondary metabolite ในการยับยั้งการฟักไข่และการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนระยะที่สอง ที่ระดับความเข้มข้น 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้จำนวนเฉลี่ยของ J2 ต่อ 5 กลุ่มไข่ คือ 37. 67, 6.67 และ 3.33 ตัว ตามลำดับเปรียบเทียบกับการฟักไข่ในน้ำมีตัวอ่อน J2 เฉลี่ย 136.33 ตัว ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่ทำให้ตัวอ่อน J2 ตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 48 ชั่วโมง คือความเข้มข้น 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ผลการวิจัยในสภาพโรงเรือน พบว่าการใช้เชื้อ *Streptomyces*- PR87 ทุกรูปแบบช่วยลดการเกิดโรครากปมมะเขือเทศและลดจำนวนไข่ต่อระบบรากของมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบลดการเกิดโรครากปมได้ 46.80 เปอร์เซ็นต์ และลดจำนวนไข่ต่อระบบรากได้ 37.36 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ซึ่งแยกได้มาจากดินบริเวณรอบรากพืช มาทดสอบประสิทธิภาพการ

ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริก ทดสอบในระบบห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง เมื่อได้เชื้อที่มีศักยภาพจึงจะนำไปทดลองเพื่อขยายผลในระดับแปลงทดลองต่อไป

วิธีดำนินการ

-อุปกรณ์

1) ตัวอย่างดินจากจังหวัดหนองคาย สกลนคร และนครพนม
2) ตะแกรงกรองสำหรับแยกไส้เดือนฝอย
3) กระถางพลาสติก
4) เมล็ดพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท
5) จานเลี้ยงเชื้อ
6) ขวดรูปชมพู่
7) กล้องสเตอริโอ
8) กล้องจุลทรรศน์
9) ตู้บ่มเชื้อ
10) เครื่องเขย่า
11) ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ
12) ชุดสารทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
13) สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
14) สารเคมีสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์
15) วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับเก็บข้อมูล และ บันทึกข้อมูล

-วิธีการ

1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. และจากดินบริเวณรากพริก

1.1 การเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพริก สำรวจและเก็บตัวอย่างรากพริกและดินรอบรากพริก โดยเก็บเฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการของโรครากปม ในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมในเขตพื้นที่จังหวัดจังหวัดหนองคาย สกลนคร และนครพนม เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพริกจากแปลงปลูกพริก โดยเก็บดินบริเวณรอบรากต้นพริกที่สุขภาพดีไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 45 ตัวอย่าง

1.2 การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพริก นำตัวอย่างดินบริเวณรากพริกที่เก็บมามาแยกแบคทีเรีย โดยชั่งดินจำนวน 10 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตรเขย่าบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายดินมาทำให้เจือจางด้วยวิธี Ten fold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}- 10^{-8} จากนั้นนำสารละลายดิน 0.1 มิลลิลิตรของความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} และ 10^{-8} มากระจายบน อาหาร

Trypticase soy agar (TSA) สำหรับแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และอาหาร Arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) *Streptomyces* spp. ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตาม วิธีการของ Holt et al.(1994) และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปม

2.1 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) บริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) 1 กลุ่ม เลือกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ที่มีกลุ่มไข่สมบูรณ์จากรากของพริกที่เก็บมาจาก จังหวัด หนองคาย สกลนคร และนครพนม ซึ่งเป็นพื้นที่การระบาดของโรครากปม นำตัวเต็มวัยเพศเมียจำแนกชนิดโดยวิธี ตัดริ้วรอยย่นส่วนก้น (Perineal pattern) เพื่อยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมเป็น *M. incognita* ส่วนของกลุ่มไข่ทำการเขี่ยกลุ่มไข่ให้ฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปลูกเชื้อในพืชอาศัย ได้แก่ กล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 20 วัน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ดูแลพืชเป็น เวลา 60 วัน ได้ระบบรากของพืชอาศัยเป็นปุ่มปมจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย จากนั้นแยกกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยจากรากของมะเขือเทศพันธุ์สีดา นำมาเขย่าในสารละลาย 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที และนำไปปลูกเชื้อในมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว เพื่อเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *M. incognita* ให้พอเพียงต่อการทดสอบ และ maintain เพื่อการใช้ตลอดการทดลอง

2.2 การเตรียมกล้าพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท นำเมล็ดพริกเพาะในกระดาษทิชชู ชุ่มน้ำเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเมล็ดพริกงอก นำไปเพาะในดินพีทมอสที่บรรจุในภาชนะชนิด 104 หลุม จำนวน 1-2 เมล็ด/หลุม เมื่อใบจริงงอก 1 คู่ ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ด/ต้น และใส่ปุ๋ยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนได้กล้าพริกอายุ ครบ 30 วัน

2.3. การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* นำรากพริกระยะที่ไส้เดือนฝอยสร้างไข่เป็นกลุ่ม (egg mass) มาเขย่าใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที กลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยจะหลุดออกจาก gelatinous matrix ที่หุ้มไข่ จากนั้นนำไข่ไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอย จากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวน 5,000 ฟอง/น้ำ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์และมีตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ภายในไข่

2.4 การ inoculate ไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* ย้ายต้นกล้าอายุ 30 วัน ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ของพริกปลูกในดินชนิดร่วนปนทราย (อัตราส่วน 50 : 50) กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว จากนั้นทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. incognita* โดยใช้ไข่ที่เตรียมจากข้อ 3 จำนวน 5,000 ฟอง/ต้น ที่บริเวณรากพืช ดูแลพืชปลูกโดยใส่ปุ๋ย 4-5 ครั้ง จนอายุครบ 60 วันหลังปลูกเชื้อ

3.ทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

3.1 เอนไซม Protease นำ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช NA และ culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ในอาหาร AGMA ที่ผสม 1% gelatin ที่ละลายใน 0.1 M Phosphate

buffer, pH 7.0 เปน medium ในการทดสอบเจาะวุ่นให้เปนหลุมด่วย cork borer ขนาดเส่นผาศูนยกลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมตอจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นนำสวน culture filtrate หยอดลงในหลุมจำนวน 40 ไมโครลิตรตอหลุม บมไว่ที่อุณหภูมิห่องเปนเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการราดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ($(NH_4)_2SO$) ที่อิ่มตัวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีวงใสรอบหลุมวุ้นที่หยอด culture filtrate แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ protease ออกมาย่อย protein บันทึกผลจากการเกิดวงใส

3.2 เอนไซม Chitinase นำ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช่ NA และ culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ทดสอบในอาหาร AGMA ผสม 2.4% colloidal chitin pH 6.0 เป็น medium ในการทดสอบ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วน culture filtrate หยอดลงในหลุม จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยการราด 0.1% Congo red ให้ท่วมอาหารถ้ามีวงใสรอบหลุมวุ้นที่หยอด culture filtrate แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin บันทึกผลจากการเกิดวงใส

4.ทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม ในห้องปฏิบัติการ

เตรียม culture filtrate เชื้อ *Bacillus* เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 1 วัน และเตรียม culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* เลี้ยงในอาหารเหลว AGMB นาน 7 วัน นำมากรองเอาส่วน culture filtrate (รัตติกาล, 2556) เตรียมกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม ตามวิธีการของ McSorley, 2008 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักออกจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมคัดเลือกกลุ่มไข่ที่มีขนาดเท่ากัน จำนวน 1 กลุ่มไข่ แช่ลงใน culture filtrate เชื้อ *Bacillus* ความเข้มข้น 50% และ 100% culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ความเข้มข้น 50% และ 100% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร/จานปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับอาหาร NB, AGMB และน้ำปลอดเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนไข่ที่ไม่ฟัก และ J2 ที่ฟักออกจากไข่ภายใต้กล้องสเตอริโอ

5.ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ในเรือนทดลอง

การทดลองนี้เป็นการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักไข่ของ *M. incognita* ในระดับห้องปฏิบัติการ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากปมของพริกในโรงเรือนทดลอง

5.1 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* นำรากพริกระยะที่ไส้เดือนฝอยสร้างไข่เป็น กลุ่ม (egg mass) มาเขย่าใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที กลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย

จะหลุดออกจาก gelatinous matrix ที่หุ้มไข่ จากนั้นนำไข่ไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอย จากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวน 5,000 ฟอง/น้ำ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์และมีตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ภายในไข่ การ inoculate ไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* ย้ายต้นกล้าอายุ 30 วัน ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ของพริก ปลูกในดินชนิดดินผสมทรายและปุ๋ยคอก (1:2:1) ปลอดเชื้อ กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว จากนั้นทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. incognita* โดยใช้ไข่ที่เตรียมจากข้อ 3 จำนวน 5,000 ฟอง/ต้น ที่บริเวณรากพืช ดูแลพืชปลูกโดยใส่ปุ๋ย 4-5 ครั้ง จนอายุครบ 60 วันหลังปลูกเชื้อ

5.2 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม 3 อันดับแรก เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 1-2 วัน สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. อายุ 5 วัน) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ดวยความเร็ว 5000 รอบตอนาที เปนเวลา 10 นาที แยกตะกอนของเชื้อออกเพื่อนำมาทำเปน cell suspensions เพื่อไวทดลองตอไป นำสวนน้ำใส (supernatant) ที่ไดไปกรองผานเยื่อกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร การเตรียม cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. นำ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาปรับระดับความเขมขนใหมีระดับความเขมขน 10^9 เซลลตอมิลลิลิตร โดยนำสารแขวนลอยของเชื้อปรับปริมาณโดยใชคาการดูดกลืนแสง OD_{600nm} เทากับ 1 สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. และ OD_{600nm} เทากับ 10 สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. (Xiao, Kinkel and Samac, 2002)

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 15 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ราดก้นหลุมด้วย อะบาเม็กติน 1.8 % EC อัตราส่วน 30 มล./น้ำ 20 ลิตร ปริมาตร 50 มล.

กรรมวิธีที่ 2 cell suspension *Bacillus* ไอโซเลทที่ 8

กรรมวิธีที่ 3 cell suspension *Bacillus* ไอโซเลทที่ 13

กรรมวิธีที่ 4 cell suspension *Bacillus* ไอโซเลทที่ 33

กรรมวิธีที่ 5 culture filtrate *Bacillus* ไอโซเลทที่ 8

กรรมวิธีที่ 6 culture filtrate *Bacillus* ไอโซเลทที่ 13

กรรมวิธีที่ 7 culture filtrate *Bacillus* ไอโซเลทที่ 33

กรรมวิธีที่ 8 cell suspension *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 37

กรรมวิธีที่ 9 cell suspension *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 43

กรรมวิธีที่ 10 cell suspension *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 45

กรรมวิธีที่ 11 culture filtrate *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 37

กรรมวิธีที่ 12 culture filtrate *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 43

กรรมวิธีที่ 13 culture filtrate *Streptomyces* ไอโซเลทที่ 45

กรรมวิธีที่ 14 Healthy control

กรรมวิธีที่ 15 Disease control

คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.จากการทดสอบยับยั้งการฟักไข่ดีที่สุดมาทดสอบกับต้นกล้าพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท อายุ 30 วัน ที่มีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอ ย้ายมาปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่บรรจุดินผสมทรายและปุ๋ยคอก (1:2:1) ปลอดเชื้อ และเติมไข่ไส้เดือนฝอย จำนวน 5,000 ไข่/กระถาง โดยราดก้นหลุมต้นกล้าด้วยอะบาเม็กติน 1.8 % EC อัตราส่วน 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ปริมาณ 50 มล. ราดโคนต้นกล้าพริกที่ใช้ culture filtrate และ cell suspension จำนวน 50 มิลลิลิตร ราดโคนต้นทุก 7 วัน จำนวน 9 ครั้ง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ตรวจสอบการเกิดโรครากปม หลังย้ายปลูก 60 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease severity) ที่เกิดขึ้นกับระบบรากโดยแบ่งเป็น 0-5 rating ตามวิธีของ Chun-HAO jiang (2018) ดังนี้

0 = 0 - 10% galled root

1 = 11 - 20% galled root

2 = 21 - 50% galled root

3 = 51 - 80% galled root

4 = 81 - 90% galled root

5 = 91 - 100% galled root

$$\text{Disease severity} = \left[\sum \frac{\text{the number of root} - \text{knot disease plants in this index} \times \text{disease index}}{\text{total plants investigated} \times \text{highest root} - \text{knot diseaseindex}}\right] \times 100\%.$$

ตรวจนับจำนวนไข่/ระบบรากในแต่ละกระถาง วัดความสูงของต้น ชั่งน้ำหนักสดของต้นและราก

6.การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

6.1 สัณฐานวิทยา

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาศึกษาลักษณะโคโลนีบน อาหาร NA และอาหาร AGMA ตามลำดับ บมที่อุณหภูมิห้อง เปนเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. และ 5-7 วัน สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี รูปรางและขนาด ของเซลล การผลิตสปอร ภายใต้กล้องจุลทรรศน

6.1.1.คุณสมบัติการติดสีแกรม

การทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรมนำเชื้อแตละไอโซเลตมาเกลี่ยเปนผิวบาง (smear) บนแผนสไลดที่สะอาดปลอยให้แหง จากนั้นตรึงดวยความร้อนโดยผานเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมด้วยสารละลาย crytal violet ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกเบาๆด้วยน้ำไหล หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมและทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้ง ล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ จนเหลือสีจางๆ ล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้ง ย้อมทับด้วย safranin O เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้งและปล่อยให้แห้งสนิทในอากาศ นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของ เลนสวัตถุ 100 เทา เชื้อแบคทีเรียชนิดกรมบวกจะติดสีมวงของ crystal violet และแบคทีเรียชนิดแกรมลบจะ ติดสีแดงของ safranin

6.1.2. การศึกษาการสร้างสปอร์

นำเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA มีอายุ 5 วันขึ้นไปมาเกลี่ยเปนผิวบาง (smear) บนแผนสไลดที่สะอาดปลอยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผานเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมด้วย 5% malachite green ทิ้งไว้นาน 45 วินาที นำกระจกสไลด์อังด้วยไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้แผ่นสไลด์เย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาด นำสไลด์มาย้อมด้วยสารละลาย 0.5% safranin O เป็นเวลา 1 นาทีล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้ง และทิ้งให้แห้งในอากาศก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสปอร์ของเชื้อจะติดสีเขียว ส่วนเซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดง

6.2 คุณสมบัติชีวเคมี

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป api 50® CHB

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมาทดสอบเพื่อจำแนกชนิดด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB โดยทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ให้บริสุทธิ์ (pure culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปวัดค่าความขุ่นให้ได้เท่ากับ 2.0 McFarland จึงดูดเชื้อในปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในช่องที่บรรจุสารชีวเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ซึ่งมีจำนวน 50 ช่อง บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจผล และตรวจสอบชนิดของเชื้อที่แยกได้โดยใช้โปรแกรม สำเร็จรูป APICHB version 4.0 (BioMerieux, France) เว็บไซต์ http//www.apiwep.biomerieux.com/servlet/Identify

6.3 วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดไดมาเพิ่มปริมาณในสวนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ บริเวณ 16S rDNA ดวยวิธี PCR โดยใช ไพรเมอร (B-K1/F, 5´-TCACCAAGGCRACGATGCG-3´) และ(B-K1/R1, 5´-CGTATTCACC GCGGCATG-3´) (Wu, Walker, Hornitzky and Chin, 2006) ผสมสวนประกอบตาง ๆ ที่ใชในปฏิกิริยาดังนี้ genomic DNA 0.25 ไมโครลิตร, 5X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, B-K1/F primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, B-K1/R1 primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl2 1.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรใหได 25 ไมโครลิตร ดวยน้ำกลั่นฆาเชื้อ นำไปเขาเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 25 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ เชื้อ *Streptomyces* spp. ใชไพรเมอร STR1F (5´-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3´) และ STR1530R (5´-AAGGAGAT CCAGCCGCA3´) (พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550) ผสมสวนประกอบตาง ๆ ที่ใชในปฏิกิริยาดังนี้ genomic DNA 0.25 38 ไมโครลิตร, 5X PCR buffer 4 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 1.6 ไมโครลิตร, STR1F primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, STR1530R primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl2 1.2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร ปรับปริมาณใหได 20 ไมโครลิตร ดวยน้ำกลั่นฆาเชื้อ นำไป

เข้าเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศา เซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 31 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจวิเคราะหการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5 เปอรเซ็นต agarose gel ใน 1X TBE ภายใตกระแสไฟฟา 100 โวลต 30 นาที และนำผลิตภัณฑ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด (sequence) โดยการสงไปยัง Macrogen Service Center Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี จากนั้นนำขอมูลลำดับนิวคลีโอไทดที่ไดไปตรวจสอบกับขอมูลลำดับนิวคลีโอไทด ที่มีการศึกษาและเป นฐานข อมูลสาธารณะของ GenBank ในเว็บไซด http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทดแตละไอโซเลตและจาก GenBank มาวิเคราะหความ สัมพันธทาง พันธุกรรมจากคาความแตกตางทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW จากทางเว็บไซด http://align.genome.jp3

-เวลาและสถานที่

- ระยะเวลา เริ่มต้นการทดลอง ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562
- สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างดินจากแปลงพริกที่เก็บรวบรวมจาก 3 จังหวัด ได้แก่ หนองคาย สกลนคร และนครพนม ได้ตัวอย่างดินจำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ AGMA จำแนกเชื้อเบื้องต้นได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 100 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. จำนวน 50 ไอโซเลต เชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. จำนวน 50 ไอโซเลต

การทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ดีหลายไอโซเลต ทั้งความเข้มข้น culture filtrate 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดย culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 และ B43 สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 96.20 และ 96.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 98.19 และ 97.99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) สามารถนำไปทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในโรงเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ดีหลายไอโซเลต ทั้งความเข้มข้น culture filtrate 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดย culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต S13 และ S31 สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 79.53 และ

66.60 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต S8 และ S13 สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 88.17 และ 87.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) สามารถนำไปทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในโรงเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ protease พบว่า เชื้อไอโซเลต B30 สร้างได้ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 50.00 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต B45 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 32.5 มิลลิเมตรและไอโซเลต S6 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 25.0 มิลลิเมตรซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ

การสร้างเอนไซม์ chitinase พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต B30 และ B37 สร้างได้ดีที่สุดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์วงใส เท่ากับ 20.00 และ17.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเอนไซม์มีความเกี่ยวของกับการยับยั้งการฟกไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม เมื่อพิจารณาจากองคประกอบของเปลือกไขไสเดือนฝอยรากปมที่มีอยู่ 3 ชั้น คือ vitelline, chitin และ lipid layers (Terefe et al., 2009) จึง เปนไปไดที่ใน culture filtrate จะมีสารในกลุมเอนไซม chitinase หรือ lipase (ภาพที่ 3)

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดใน ปี 2561 พบว่า ประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. มีผลต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ไอโซเลต B37 B43 และ B45 (ภาพที่ 1) ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. คือ ไอโซเลต S8 S13 และ S33 จึงนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมไปจำแนกเพื่อบ่งชี้ชนิด (ภาพที่ 2)

ผลการบ่งชี้ชนิดโดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ สีขาวถึงสีครีม ผิวไม่มันวาว จากการทดสอบคุณสมบัติการติดสีแบบแกรม พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนตรง (rod shaped) สร้างเอ็นโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ (ภาพที่ 4-6)เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50® CHB พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถใช้แหล่งคาร์บอน L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-Mannose, D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Cellobiose, D-trehalose, D-Saccharose ได้ เมื่อนำผลการทดสอบไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าตรงตามลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis* ของ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (ภาพที่ 7-9)

จากการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี PCR ขนาดจำเพาะยีนที่บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่า คู่ไพรเมอร์และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายได้ หลังจากนำผลผลิต PCR นำตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,114 bp บนแผ่นเจล (ภาพที่ 10) ซึ่งเป็นขนาดที่จำเพาะตรงตามยีนที่บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

จากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA นำลำดับเบสมา Alignment ด้วย โปรแกรม ClustalW เพื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบสในยีนเดียวกัน พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 คือ *Bacillus subtilis* มีความคล้ายคลึง 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต B43 คือ *Bacillus subtilis* มีความคล้ายคลึง 99 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลต B45 คือ *Bacillus amyloliquefaciens* มีความคล้ายคลึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11-13)

ผลจาก โปรแกรม ClustalW แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ซึ่งผลที่ได้ สอดคล้องกันกับยีน 16S rDNA หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสยีน 16S rDNA ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining (ภาพที่ 14) โดย เชื้อไอโซเลต B37 และ B43 คือ *Bacillus subtilis* พบว่า มีความใกล้ชิดทางสายพันธุกรรมกัน ส่วน ไอโซเลต B45 คือ *Bacillus amyloliquefaciens*

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียเชื้อ *Streptomyces* spp. มีลักษณะคล้ายเส้นใย สร้างเส้นใยที่แตกแขนงได้แบบเดียวคล้ายเชื้อรา โดยเรียกว่า mycelium โดยเชื้อจะสร้างเส้นใย aerial mycelium และเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหาร substrate mycelium สร้าง conidia บน conidia aerial mycelium ซึ่งชูขึ้นบนผิวของโคโลนีจะพัฒนาเป็น sporophores ที่จะมี nuclei หลายอัน และเกิดการสร้างผนังกั้น conidia เป็นสายยาว และมีลักษณะหลากหลายทั้ง sporophores และ conidia มักมีสีต่างๆ กัน (ภาพที่ 15 และ 16)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp. พบว่า เชื้อ *Streptomyces* spp. จะให้ปฏิกิริยาบวก กับ Glyceral D-Glucose D-Fuctose Maniol NAcetyl glucosamine Amygdaline Salicine D-Fucose และ ให้ปฏิกิริยาลบ กับ L-Fucose (ตารางที่ 5)

จากการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. ผลการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม ขนาดจำเพาะของยีนที่บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. พบว่า เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายได้ หลังจากนำผลผลิต PCR นำตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 bp บนแผ่นเจล (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นขนาดที่จำเพาะตรงตามยีนที่บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp.

จากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA นำลำดับเบสมา Alignment ด้วย โปรแกรม ClustalW เพื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบสในยีนเดียวกัน พบว่า เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต S8 คือ *Streptomyces canus* มีความคล้ายคลึง 97 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต S8 ไอโซเลต S13 คือ *Streptomyces diastaticus* มีความคล้ายคลึง 95 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลต S33 คือ *Streptomyces albus* มีความคล้ายคลึง 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 18-20)

ผลจาก โปรแกรม ClustalW แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ซึ่งผลที่ได้ สอดคล้องกันกับยีน 16S rDNA หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree

ของเชื้อแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสยีน 16S rDNA ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining โดยเชื้อไอโซเลต S8 คือ *Streptomyces canus* ไอโซเลต S13 คือ *Streptomyces diastaticus* มีความใกล้ชิดทางสายพันธุกรรมกัน ส่วน ไอโซเลต S33 คือ *Streptomyces albus* (ภาพที่ 21)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริกในสภาพเรือนทดลอง โดยราดต้นพริก เปรียบเทียบการราดต้นพริกด้วย culture filtrate และ cell suspension โดยราดบริเวณโคนต้นพริกทุก 7 วันเป็นเวลา 9 ครั้ง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสังเกตการเจริญเติบโตของต้นพริกและการเกิดโรครากปม โดยพบว่า ต้นพริกกรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate และ cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับต้นพริกได้ โดยกรรมวิธีที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตกับพริกได้ดีที่สุดคือ กรรมวิธีที่ใช้ cell suspension *Bacillus* ไอโซเลต B45 เพิ่มการเจริญเติบโตของพริกด้าน น้ำหนักสด คือ 85.96 กรัม น้ำหนักรากสด คือ 14.56 กรัม และความสูง คือ 80.20 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ cell suspension *Bacillus* B37 น้ำหนักสด คือ 77.80 กรัม น้ำหนักรากสด คือ 14.23 กรัม และความสูง คือ 80.40 เซนติเมตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ได้ราดเชื้อ น้ำหนักสด คือ 60.74 กรัม น้ำหนักรากสด คือ 10.44 กรัม และความสูง คือ 60 เซนติเมตร (ตารางที่ 6)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริกในสภาพเรือนทดลอง ด้วยวิธีราดโคนต้นพริกด้วย culture filtrate และ cell suspension โดยราดบริเวณโคนต้นพริกทุก 7 วันเป็นเวลา 9 ครั้ง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสังเกตการเจริญเติบโตของต้นพริกและการเกิดโรครากปม โดยพบว่า ต้นพริกกรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate และ cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. สามารถควบคุมการเกิดโรครากปมได้ดีในทุกไอโซเลตของทั้งสองเชื้อ กรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate *Bacillus* spp. ไอโซเลต 43 สามารถความคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด มีประชากรไส้เดือนเดือนฝอยเฉลี่ยเหลือเพียง 2.8 รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate *Bacillus* spp. ไอโซเลต 43 และ กรรมวิธีที่ใช้ cell suspension *Streptomyces* spp. ไอโซเลต 37 ประชากรไส้เดือนเดือนฝอยเฉลี่ย 66.0 และ 75.6 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว มีประชากรไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 16752.8 (ตารางที่ 7)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลองพบว่า culture filtrate และ cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. สามารถควบคุมการเกิดโรครากปมได้ดีในทุกไอโซเลตของทั้งสองเชื้อ กรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate *Bacillus* spp. ไอโซเลต 43 สามารถความคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด มีประชากรไส้เดือนเดือนฝอยเฉลี่ยเหลือเพียง 2.8 รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate *Bacillus* spp. ไอโซเลต 43 และ กรรมวิธีที่

ใช้ cell suspension *Streptomyces* spp. ไอโซเลต 37 ประชากรไส้เดือนเดือนฝอยเฉลี่ย 66.0 และ 75.6 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว มีประชากรไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 16752.8 culture filtrate อัตราที่ใช้ 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง cell suspension *Bacillus* spp. OD เท่ากับ 1 cell suspension *Streptomyces* spp. OD เท่ากับ 10 อัตราที่ใช้ 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในทุกอัตรา ส่วนการราดก้นหลุมด้วยอะบาเม็กติน 1.8 % EC อัตราส่วน 30 มล./น้ำ 20 ลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง สามารถสามารถควบคุมใส่เดือนฝอยรากปมได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพเรือนทดลอง และนำไปศึกษาในสภาพแปลงทดสอบต่อไป

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. การควบคุมโรครากปมในพริก. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์:กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ. 2552. รายงานการวิจัยเรื่อง วิจัยและพัฒนาโรงงานต้นแบบและเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกาจัดแมลงในเชิงพาณิชย์. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ: ม.ป.ท.

ยุวดี ชูประภาวรรณ, สุภาวดี แก้วระหัน และ สมชาย ค าแน่น. 2559. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพแปลงปลูก. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3 (พิเศษ 3): 118-124.

พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

รัติกาล ยุทธศิลป์, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพลและอนันต์ หิรัญสาลี. 2556. ศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ปฏิปักษ์และวิธีการใช้สำหรับควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง. วารสารแก่นเกษตร. 41(พิเศษ 1):213-219.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltomore.

Jiang, C.H., P. Xie, K. Li ,Y.S. Xie,L.J. Chen,J.S. Wang,Q. Xua,J.H. Guo. 2018. Evaluation of root-knot nematode disease control and plant growth promotion potential of biofertilizer Ning shield on *Trichosanthes kirilowii* in the field. brazilian journal of microbiology. 49:232–239.

Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Slininger PJ, Bothast RJ. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of Fusarium head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. Plant Dis. 2001; 85:1253-1258.

McSorley, R., K.H. Wang, and G. Church. 2008. Suppression of root-knot nematodes in natural and agricultural soils. Applied Soil Ecology 39 : 291-298.

Prakob, W., Nguen-Hom, J., Jaimasit, P., Silapapongpri, S., Thanunchai, J. and Chaisuk, P. 2009. Biological control of lettuce root knot disease by use of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. Journal of Agricultural Technology 5(1): 179-191.

Rajendran, G., Ramakrishnan, S. and Subramanian S. 2001. Biomanagement of nematodes in horticultural crops. South Indian Horticulture 49: 227-230.

Terefe M., T.Tefera, and P.K. Sakhuja. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on rootknot nematode Meloidogyne incognita infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. Invertebrate Pathology 100 : 94–99.

Wu, X.Y., Walker, M.J., Hornitzky, M.and Chin, J.2006. Development of a group-specific PCR combinedwith ARDRA for the identification of Bacillus speciesof environmental significance. J. Microbiol. Methods64(1): 107-119.

Xiao, K., L. L. Kinkel, and D. A. Samac. 2002. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. Biol. Control 23:285-295.

ภาคผนวก

ตางรางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
ddH_2O	0.01	0.01
NB	1.82	0.25
AGMB	2.41	3.52
B1	66.47	88.37
B2	55.10	97.67
B3	72.53	95.28
B4	71.97	97.86
B5	55.63	95.79
B6	61.93	94.11
B7	42.41	96.11
B8	66.58	98.47
B9	75.83	94.01
B10	51.05	97.56
B11	34.50	97.93
B12	67.01	97.50
B13	41.81	92.22
B14	55.55	97.75
B15	48.19	98.53
B16	68.03	98.81
B17	68.20	98.47
B18	63.63	97.35
B19	42.82	95.84

ตางรางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (ต่อ)

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
B20	69.69	88.06
B21	43.85	96.89
B22	63.93	94.73
B23	56.03	96.12
B24	87.50	94.78
B25	82.65	97.73
B26	89.53	95.70
B27	85.64	98.23
B28	88.92	91.33
B29	86.48	89.01
B30	93.08	98.46
B31	90.33	97.61
B32	81.86	83.28
B33	88.02	97.97
B34	87.20	90.68
B35	90.24	98.66

ตางรางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (ต่อ)

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
B36	92.74	95.28
B37	96.20	98.19
B38	88.26	96.42
B39	89.18	93.87
B40	92.06	97.01
B41	10.48	22.56
B42	**2.33**	2.33
B43	95.18	97.99
B44	89.13	96.53
B45	96.00	98.78
B46	23.37	53.33
B47	42.83	43.96
B48	23.96	26.90
B49	46.57	61.90
B50	64.29	77.37

ตางรางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
ddH_2O	0.01	0.01
NB	1.82	0.25
AGMB	2.41	3.52
S1	32.52	71.38
S2	37.63	53.06
S3	47.26	59.96
S4	24.25	45.63
S5	43.99	50.74
S6	28.31	81.68
S7	39.46	70.70
S8	63.66	88.17
S9	24.55	74.88
S10	26.65	40.39
S11	36.24	63.85
S12	21.99	62.36
S13	79.53	87.33
S14	66.02	82.15
S15	56.66	69.09
S16	57.14	69.74
S17	37.59	43.32
S18	31.84	51.50
S19	37.80	44.68

ตางรางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย (ต่อ)

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
S20	44.15	66.35
S21	28.88	38.44
S22	17.84	34.11
S23	29.65	36.41
S24	32.47	45.57
S25	27.95	49.60
S26	38.43	47.08
S27	39.63	58.48
S28	4.95	34.55
S29	33.75	57.51
S30	37.15	41.44
S31	66.61	73.18
S32	10.05	42.09
S33	30.00	48.09
S34	60.90	62.87
S35	33.94	36.75

ตางรางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอย (ต่อ)

ไอโซเลต	การควบคุมการฟักไข่ไส้เดือนฝอย (%)	
	Culture filtrate ความเข้มข้น50%	Culture filtrate ความเข้มข้น100%
S36	36.83	66.65
S37	32.02	42.78
S38	35.30	68.94
S39	24.86	80.24
S40	19.02	44.34
S41	25.00	35.59
S42	27.75	37.20
S43	33.33	37.10
S44	12.57	16.67
S45	41.85	44.28
S46	14.43	26.55
S47	5.68	12.45
S48	2.29	3.07
S49	36.50	42.19
S50	20.45	33.13

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)
H_2O	0.0h
B30	50.0a
B35	10.0g
B37	17.5e
B43	20.0d
B45	32.5b
S6	25.0c
S8	15.0f
S13	0.0h
S14	0.0h
S31	25.0c
F-test	**
C.V.(%)	4.4

** Significant at $p < 0.05$

[1] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95% โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)
H_2O	0.0c
B30	20.0a
B35	0.0c
B37	17.5b
B43	0.0c
B45	0.0c
S6	0.0c
S8	0.0c
S13	0.0c
S14	0.0c
S31	0.0c
F-test	**
C.V.(%)	7.3

** Significant at $p < 0.05$

[1] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95% โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp.

Test	Isolates		
	S8	S13	S33
Glyceral	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	+	+	-
L-Xylose	+	+	-
Galactose	-	+	-
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Manose	-	-	-
Rhamnose	+	-	-
Inosital	-	-	-
Manitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	+
α-methyl-D-Mannoside	-	-	-
α-methyl-D-Glucoside	-	-	-
NAcetyl glucosamine	+	+	+
Amygdaline	+	+	+
Arbutine	-	-	-
Esculine	-	-	-
Salicine	+	+	+
Cellubiose	-	-	-
Lactose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Trehalose	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-
Amidon	-	-	-
Glycogene	+	-	-
β-Gentiobiose	-	-	-
D-Fucose	+	+	+
L-Fucose	+	+	+
D- arabitol	-	-	-

ตารางที่ 6 ข้อมูลการเจริญเติบโตของพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท อายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย 9 สัปดาห์

	การเจริญเติบโตของพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท		
Treatment	**น้ำหนักต้นสด (กรัม)**	**น้ำหนักรากสด (กรัม)**	**ความสูง (ซม.)**
Control disease	49.42e	15.35a	61.60d
Healthy Control	61.74c	10.44d	60.00d
Abamectin+RKN	56.64d	10.08d	66.60cd
CF-S8+RKN	55.26d	11.09c	68.20cd
CF-S13+RKN	60.16cd	11.93bc	73.80b
CF-S33+RKN	62.86c	11.25c	73.20b
CF-B37+RKN	58.86cd	9.70d	74.60ab
CF-B43+RKN	53.50d	9.49d	77.00ab
CF-B45+RKN	72.00bc	11.36c	81.20ab
S8+RKN	54.44d	10.86cd	74.80ab
S13+RKN	56.66d	12.33bc	79.80a
S33+RKN	65.20bc	12.31bc	80.60a
B37+RKN	77.80ab	14.23ab	80.40a
B43+RKN	78.32ab	13.51b	76.00ab
B45+RKN	85.96a	14.56ab	80.20a
CV(%)	4.33	1.30	2.47

ตารางที่ 7 ข้อมูลประชากรไส้เดือนฝอยเข้าทำลายพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท อายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย 9 สัปดาห์

Treatment	ตัวอ่อนระยะที่2	จำนวนไข่	ประชากรรวม[1]	Reproductive factor[2]
Control disease	324b	16428.8b	16752.8b	3.35b
Healthy Control	0.0a	0.0a	0.0a	0.00a
Abamectin+RKN	0.0a	0.0a	0.0a	0.00a
CF-S8+RKN	17.2a	828.0a	845.2a	0.17a
CF-S13+RKN	6.4a	164.4a	170.8a	0.03a
CF-S33+RKN	0.0a	249.6a	249.6a	0.05a
CF-B37+RKN	0.4a	65.6a	66.0a	0.01a
CF-B43+RKN	2.4a	0.4a	2.8a	0.00a
CF-B45+RKN	0.0a	112.4a	112.4a	0.22a
S8+RKN	0.0a	918.8a	918.8a	0.18a
S13+RKN	21.2a	69.6a	90.8a	0.02a
S33+RKN	36.8a	2195.2a	2232.0a	0.45a
B37+RKN	12.0a	63.6a	75.6a	0.15a
B43+RKN	139.6b	2821.2a	2960.8a	0.59a
B45+RKN	172.0c	921.6a	1093.6a	0.22a
CV(%)	19.74	22.01	22.79	22.79

[1]ประชาการรวม=ตัวอ่อระยะที่2 + จำนวนไข่

[2]Reproductive factor=Pf/Pi, Pf=final population, Pi=initial population

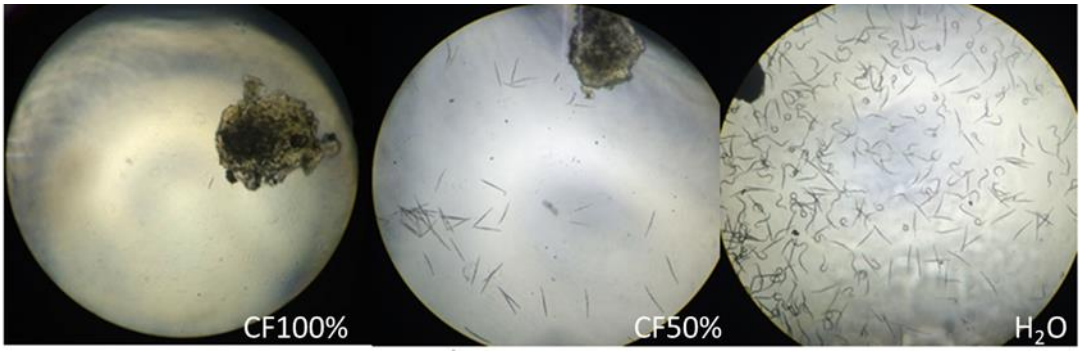
ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมอายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย 9 สัปดาห์

Treatment	Gall index[1] (0-5 scale)	Disease severity[2] (%)
Control disease	4.8	96.0±0.54[b]
Healthy Control	0.0	0.0±0.00[a]
Abamectin+RKN	0.0	0.0±0.00[a]
CF-S8+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
CF-S13+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
CF-S33+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
CF-B37+RKN	0.0	0.0±0.00[a]
CF-B43+RKN	0.0	0.0±0.00[a]
CF-B45+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
S8+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
S13+RKN	0.4	8.0±0.54[a]
S33+RKN	0.6	12.0±0.54[a]
B37+RKN	0.0	0.0±0.00[a]
B43+RKN	1.0	20.0±0.25[a]
B45+RKN	0.6	12.0 ±0.54[a]

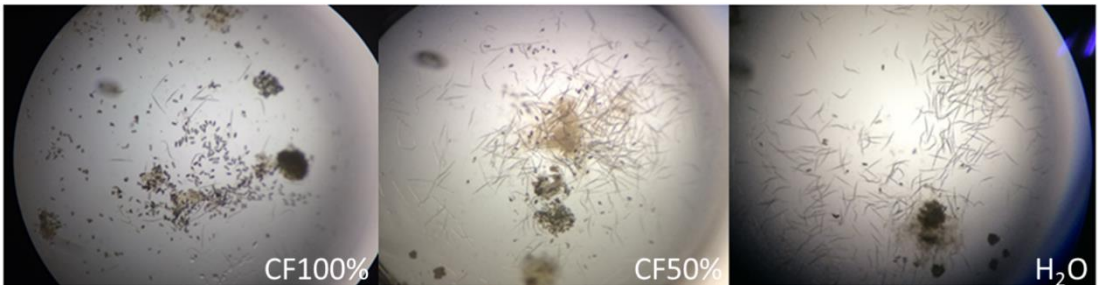
[1]0 = 0 - 10% galled root, 1 = 11 - 20% galled root, 2 = 21 - 50% galled root, 3 = 51 - 80% galled root, 4 = 81 - 90% galled root and 5 = 91 - 100% galled root

** Significant at $p < 0.05$

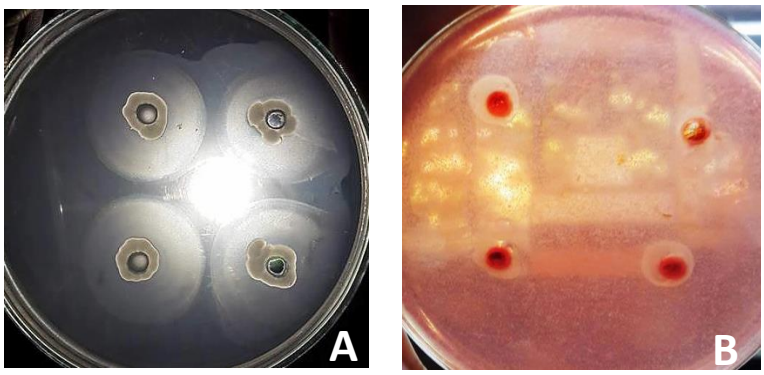
[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

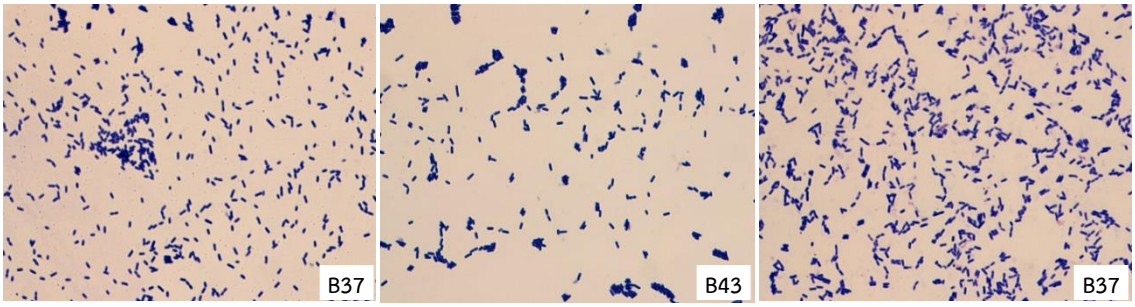


ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของ culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

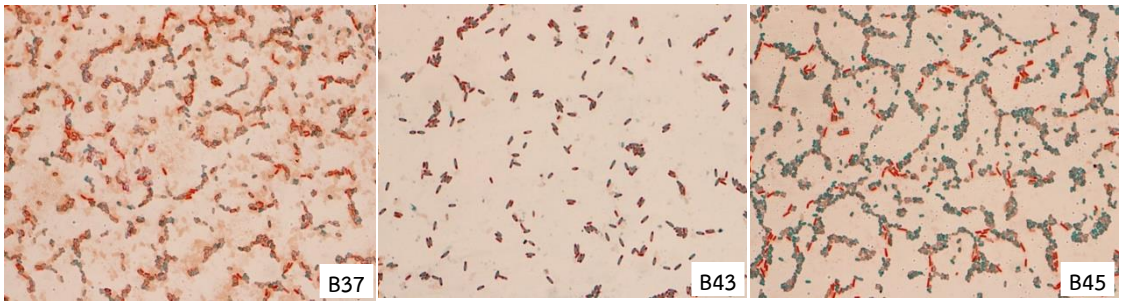


ภาพที่ 3 การสร้างเอนไซม์ A. protease และ B. Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp.



ภาพที่ 5 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 โซเลท มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod shapes) ติดสีแกรมบวก



ภาพที่ 6 ลักษณะการสร้างเอ็นโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 โซเลท

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.1
Profile	- + - - + + + - - - - + + - - - - + + + - - - + - + + + + + - + - - - + + - - - - - - - - - - - - -
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.8	0.58	MNE 87%	MDG 83%	ARB 80%	LAC 23%
			TRE 88%	GLYG 79%		

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Bacillus megaterium	0.1	0.27	GAL 82%	NAG 87%	ARB 80%	MEL 90%
			TRE 99%	GLYG 95%	GEN 81%	

Glyceral -	D-Glucose -	α-methyl-D-Glucoside -	Saccharose -	β-Gentiobiose -
Erythritol +	D-Fructose +	NAcetyl glucosamine -	Trehalose +	D- Turanose -
D-Arabinose -	D-Manose +	Amygdaline +	Inuline -	D- Tagatose -
L-Arabinose -	L-Sorbose -	Arbutine -	Melezitose -	D-Fucose -
Ribose +	Rhamnose -	Esculine +	D-Raffinose -	L-Fucose -
D-Xylose +	Dulcitol -	Salicine +	Melezitos +	D- arabitol -
L-Xylose +	Inosital -	Cellubiose +	D-Raffinose +	L- arabitol -
Adonitol -	Manitol +	Maltose +	Amidon -	Gluconate -
β-methyl-xyloside -	Sorbitol +	Lactose +	Glycogene -	2- ceto-gluconate -
Galactose -	α-methyl-D-Mannoside +	Melibiose -	Xylitol -	5-ceto-gluconate -

ภาพที่ 7 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 ด้วย API 50 CHB test kit

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.1
Profile	- + - - + + + - - - - + + + - - - + + + - + - + + + + + + - + - + + - + + + - - - - - - - - - - - -
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.8	0.9	SAC 90%			

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Bacillus licheniformis	0.1	0.55	GAL 75%	SAC 99%	TUR 75%	TAG 91%

Glyceral -	D-Glucose -	α-methyl-D-Glucoside -	Saccharose +	β-Gentiobiose -
Erythritol +	D-Fructose +	NAcetyl glucosamine +	Trehalose -	D- Turanose -
D-Arabinose -	D-Manose +	Amygdaline -	Inuline +	D- Tagatose -
L-Arabinose -	L-Sorbose +	Arbutine +	Melezitose +	D-Fucose -
Ribose +	Rhamnose -	Esculine +	D-Raffinose -	L-Fucose -
D-Xylose +	Dulcitol -	Salicine +	Melezitos +	D- arabitol -
L-Xylose +	Inosital -	Cellubiose +	D-Raffinose +	L- arabitol -
Adonitol -	Manitol +	Maltose +	Amidon +	Gluconate -
β-methyl-xyloside -	Sorbitol +	Lactose +	Glycogene -	2- ceto-gluconate -
Galactose -	α-methyl-D-Mannoside +	Melibiose -	Xylitol -	5-ceto-gluconate -

ภาพที่ 8 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B43 ด้วย API 50 CHB test kit

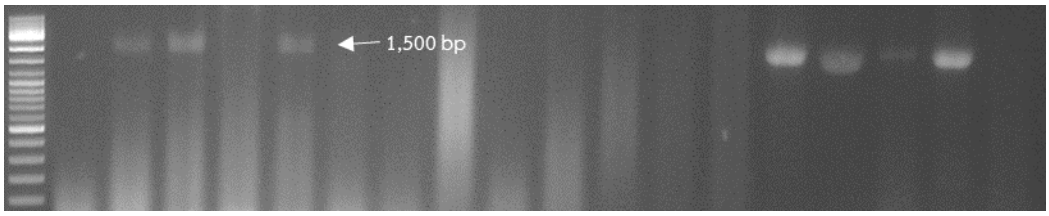
VERY GOOD IDENTIFICATION	
Strip	API 50 CHB V4.1
Profile	- + - - + + + - - - - + + + - - - + + + - + - + + + + + + - + + + + - + + - - + - - - - - - - - - -
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.2	0.94	GLYG 79%			

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Bacillus licheniformis	0.7	0.65	GAL 75%	GLYG 87%	TUR 75%	TAG 91%

Glyceral -	D-Glucose -	α-methyl-D-Glucoside -	Saccharose +	β-Gentiobiose -
Erythritol +	D-Fructose +	NAcetyl glucosamine +	Trehalose +	D- Turanose -
D-Arabinose -	D-Manose +	Amygdaline -	Inuline +	D- Tagatose -
L-Arabinose -	L-Sorbose +	Arbutine +	Melezitose +	D-Fucose -
Ribose +	Rhamnose -	Esculine +	D-Raffinose -	L-Fucose -
D-Xylose +	Dulcitol -	Salicine +	Melezitos +	D- arabitol -
L-Xylose +	Inosital -	Cellubiose +	D-Raffinose +	L- arabitol -
Adonitol -	Manitol +	Maltose +	Amidon -	Gluconate -
β-methyl-xyloside -	Sorbitol +	Lactose +	Glycogene -	2- ceto-gluconate -
Galactose -	α-methyl-D-Mannoside +	Melibiose -	Xylitol +	5-ceto-gluconate -

ภาพที่ 9 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต B37 ด้วย API 50 CHB test kit



ภาพที่ 10 ขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ BK1F และ BK1R

Bacillus subtilis voucher RIFA 585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Identities 99%

```
B43            3   GGGACTGAGAMACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  62
     ********** ***************************************************
KF624714.1  248   GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  307

B43           63   ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCT  122
     ************************************************************
KF624714.1  308   ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCT  367

B43          123   GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG  182
     ************************************************************
KF624714.1  368   GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG  427

B43          183   AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  242
     ************************************************************
KF624714.1  428   AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  487

B43          243   GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG  302
     ************************************************************
KF624714.1  488   GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG  547

B43          303   GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  362
     ************************************************************
KF624714.1  548   GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  607

B43          363   TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  422
     ************************************************************
KF624714.1  608   TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  667

B43          423   CTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGKGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC  482
     ********************************** ***********************
KF624714.1  668   CTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC  727

B43          483   CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTG  542
     ************************************************************
KF624714.1  728   CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTG  787

B43          543   CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA  602
     ************************************************************
KF624714.1  788   CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA  847

B43          603   GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  662
     ************************************************************
KF624714.1  848   GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  907

B43          663   GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG  722
     ************************************************************
KF624714.1  908   GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG  967

B43          723   GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT  782
     ************************************************************
KF624714.1  968   GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT  1027

B43          783   CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA-GTG  841
     ************************************************** ***
KF624714.1  1028  CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTG  1087

B43          842   ACTGCCGGTGAM-AACCGGAAGAAGGTGGGATGACGTCAA-TCATCATGCCC-T-ATGA- 896
KF624714.1  1088  ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC  1147

B43          897   CTGGGCTACACACGTTGCTTACAATGAACAG  927
KF624714.1  1148  CTGGGCTACACACGT-GCT-ACAATGGACAG  1176
```

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต B33 ในฐานข้อมูล (GenBank database)

NCBI

Bacillus subtilis strain SD4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Identities 98%

```
B37          14    AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG  73
     ************************************************************
MH700589.1  253   AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG  312

B37          74    TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA  133
     ************************************************************
MH700589.1  313   TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA  372

B37          134   GGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA  193
     ************************************************************
MH700589.1  373   GGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA  432

B37          194   CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  253
     ************************************************************
MH700589.1  433   CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  492

B37          254   TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC  313
     ************************************************************
MH700589.1  493   TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC  552

B37          314   CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG  373
     ************************************************************
MH700589.1  553   CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG  612

B37          374   TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT  433
     ************************************************************
MH700589.1  613   TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT  672

B37          434   CTGTAACTGACGCTGAGGAGCGRRRGSGKGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  493
     ********************  * * ******************************
MH700589.1  673   CTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  732

B37          494   TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGC  553
     ************************************************************
MH700589.1  733   TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGC  792

B37          554   TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG  613
     ************************************************************
MH700589.1  793   TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG  852

B37          614   ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAAGCAMCGCGAAGAACCT  673
     ******************************************** ***** ************
MH700589.1  853   ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG-AAGCAACGCGAAGAACCT  911

B37          674   TACCMAGGTCTTGACATCCTCTGGACAATCCYTAGARATAGGGACGTCCCCTTCGGGGGC  733
     **** ******************* ******** **** *** *******************
MH700589.1  912   TACC-AGGTCTTGACATCCTCTG-ACAATCC-TAGAGATA-GGACGTCCCCTTCGGGGGC  967

B37          734   ARAGTGGACRGGGGG  748
     * **** ** *****
MH700589.1  968   AGAGTG-ACAGGGGG  981
```

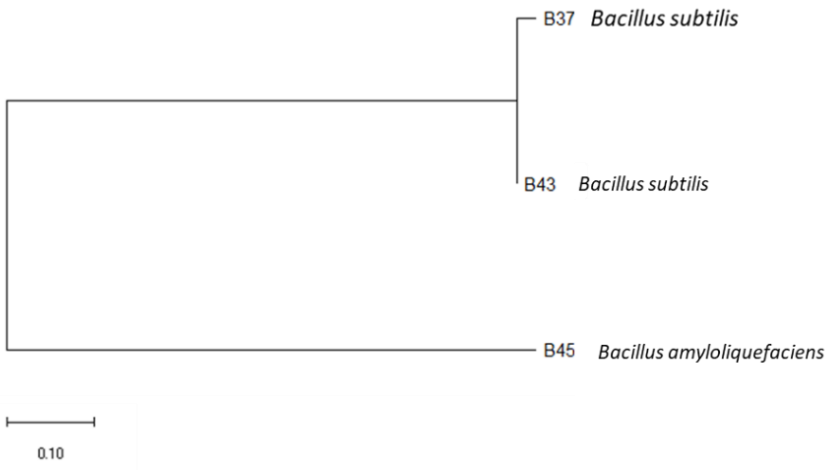
ภาพที่ 12 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต B37 ในฐานข้อมูล (GenBank database) NCBI *Bacillus amyloliquefaciens* strain SDF0269 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Identities 99%

Bacillus amyloliquefaciens strain SDF0269 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc Identities 98%

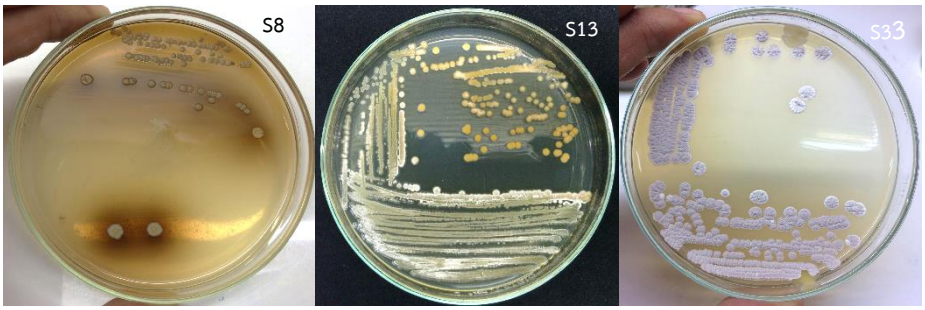
```
B45          3     GCAGGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACC  62
     *** ***************************************************
MH569394.1  942   GCA-GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACC  884

B45          63    TCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG  122
     ************************************************************
MH569394.1  883   TCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG  824

B45          123   GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTA  182
     ************************************************************
MH569394.1  823   GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTA  764

B45          183   GAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC  242
     ************************************************************
MH569394.1  763   GAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC  704

B45          243   CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAA  302
     ************************************************************
MH569394.1  703   CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAA  644

B45          303   GGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT  362
     ************************************************************
MH569394.1  643   GGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT  584

B45          363   TGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT  422
     ************************************************************
MH569394.1  583   TGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT  524

B45          423   TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG  482
     ************************************************************
MH569394.1  523   TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG  464

B45          483   GGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  542
     ************************************************************
MH569394.1  463   GGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  404

B45          543   AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCC  602

MH569394.1  403   AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCC  344

B45          603   TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACT  662
     ************************************************************
MH569394.1  343   TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACT  284

B45          663   CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGC  722
     ************************************************************
MH569394.1  283   CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGC  224

B45          723   TTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCCGGACAA  782
     ************************************************************
MH569394.1  223   TTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCCGGACAA  164

B45          783   CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTT  842
     ************************************************************
```

```
MH569394.1  163   CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTT  104

B45          843   AGGTAC-GTCA-G-TGCCG-CCTATTTGACGGCACT-GT-C-TCCCTTACACAGAGCTT- 894
      ****** ***** * ***** ***************** ** * ***** ************
MH569394.1  103   AGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGACGGCACTTGTTCTTCCCTAACACAGAGCTTT  44

B45          895   ACGAATCCGAAAAACCGTTCAT  916
      **** ********* ** *****
MH569394.1   43   ACGA-TCCGAAAA-CC-TTCAT  25
```

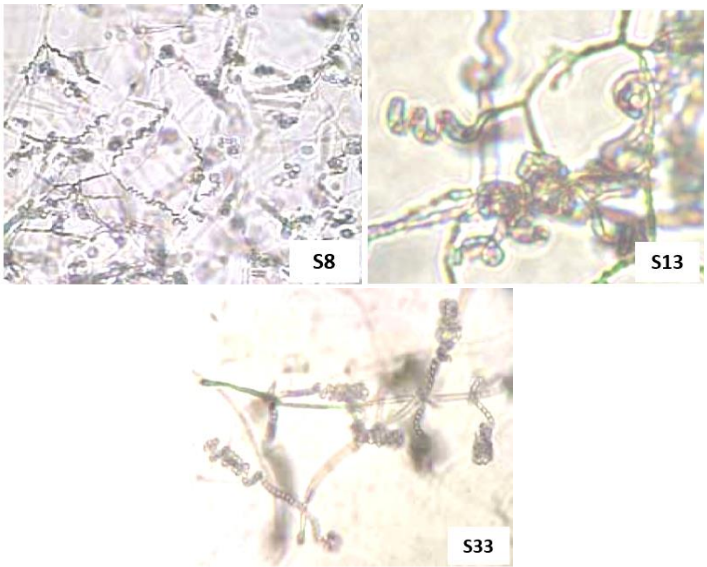
ภาพที่ 13 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต B45 ในฐานข้อมูล (GenBank database) NCBI



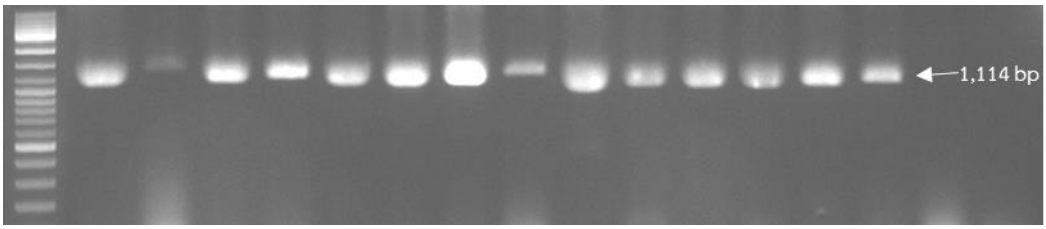
ภาพที่ 14 Phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp.



ภาพที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* spp.



ภาพที่ 16 ลักษณะของเซลล์ของเชื้อ ***Streptomyces*** **spp.**



ภาพที่ 17 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R

Streptomyces canus strain BTU10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Identities97%

```
S8             22    GCTTCAKGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGC  81
      ****** ******************************************************
MH482892.1 1004    GCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGC  945

S8             82    TCCACCTCGCGGTCTTGCGACTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT  141
      ************************************************************
MH482892.1  944    TCCACCTCGCGGTCTTGCGACTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT  885

S8            142    CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTC  201
      ************************************************************
MH482892.1  884    CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTC  825

S8            202    ACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA  261
      ************************************************************
MH482892.1  824    ACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA  765

S8            262    CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCC  321
      ************************************************************
MH482892.1  764    CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCC  705

S8            322    CCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTKTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT  381
      ***************************** ****************************
MH482892.1  704    CCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT  645

S8            382    TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT  441
      ************************************************************
MH482892.1  644    TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT  585

S8            442    TTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAKGCGTTAACTTCAGC  501
      ********************************************* **************
MH482892.1  584    TTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGC  525

S8            502    ACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  561
      ************************************************************
MH482892.1  524    ACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  465

S8            562    GTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGMTACAGACCAGAAA  621
      ********************************************* *************
MH482892.1  464    GTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAA  405

S8            622    GTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAAA  681
      ************************************************************
MH482892.1  404    GTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAA-  346

S8            682    TTCCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTTCCAATGACCCTCCACGGGTTG  741
      ** ************************************** ****************** ***
MH482892.1  345    TT-CCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTT-CCAATGACCCTCCACGG-TTG  289

S8            742    AGCCGTGGGCTTTCCACATCAGACTTAAAAAAACCAACCTGCGCGCGCTTTACRCCCAAA  801
      ************** ************* *** ** ***************** *****
MH482892.1  288    AGCCGTGGGCTTTC-ACATCAGACTTAAGAAA-CC-ACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAA- 233

S8            802    TAA  804
      ***
MH482892.1  232    TAA  230
```

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ Streptomyces ไอโซเลต S8 ในฐานข้อมูล (GenBank

database) NCBI

Streptomyces diastaticus subsp. *ardesiacus* strain CMAA 1525 16S ribosomal RNA gene, partial

Identities 97%

```
S13          26   CTTWACMCMTGCAAGTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGT  85
     *** ** * ***************************************************
MH241022.1  39   CTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGT  98

S13          86   GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT  145
     ************************************************************
MH241022.1  99   GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT  158

S13          146  ACCGGATACTGACCTGCCAAGGCATCTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGA  205
     ************************************************************
MH241022.1  159  ACCGGATACTGACCTGCCAAGGCATCTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGA  218

S13          206  GCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC  265
     ************************************************************
MH241022.1  219  GCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC  278

S13          266  GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  325
     ************************************************************
MH241022.1  279  GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  338

S13          326  CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA  385
     ************************************************************
MH241022.1  339  CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA  398

S13          386  TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTG  445
     ************************************************************
MH241022.1  399  TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTG  458

S13          446  CAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGSGGKRRTACGTAGGGCGCAAGCGT  505
     ************************************** ** *****************
MH241022.1  459  CAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT  518

S13          506  TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGC  565
     ************************************************************
MH241022.1  519  TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGC  578

S13         566  CCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGAT  625
     ************************************************************
MH241022.1  579  CCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGAT  638

S13          626  CGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGGTGGCGAA  685
     ********************** ***************************** *********
MH241022.1  639  CGGAATTCCTGGTGTAGCGGT-GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC-GGTGGCGAA  696

S13          686  RGCGGATCTCTGGGGCCMATACTGACGCCTGAGGARCRAAARGCGGTGGGGAGCGaaasa  745
     ********** ***** ********* ******* * *** ** ************ *
MH241022.1  697  GGCGGATCTCT-GGGCCGATACTGACG-CTGAGGAGCGAAA-GC-GTGGGGAGCGAAC-A  751

S13          746  KAATAAATACCCTGG  761
     * ** *********
MH241022.1  752  GGATTAGATACCCTGG 767
```

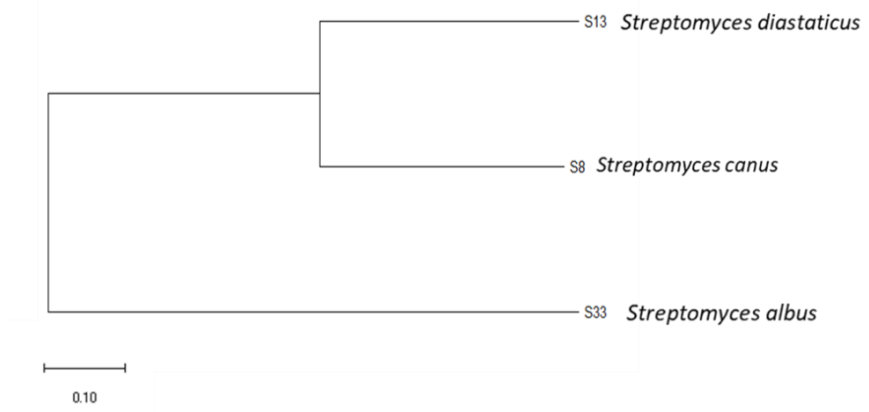
ภาพที่ 19 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ Streptomyces ไอโซเลต S13 ในฐานข้อมูล (GenBank

database) NCBI

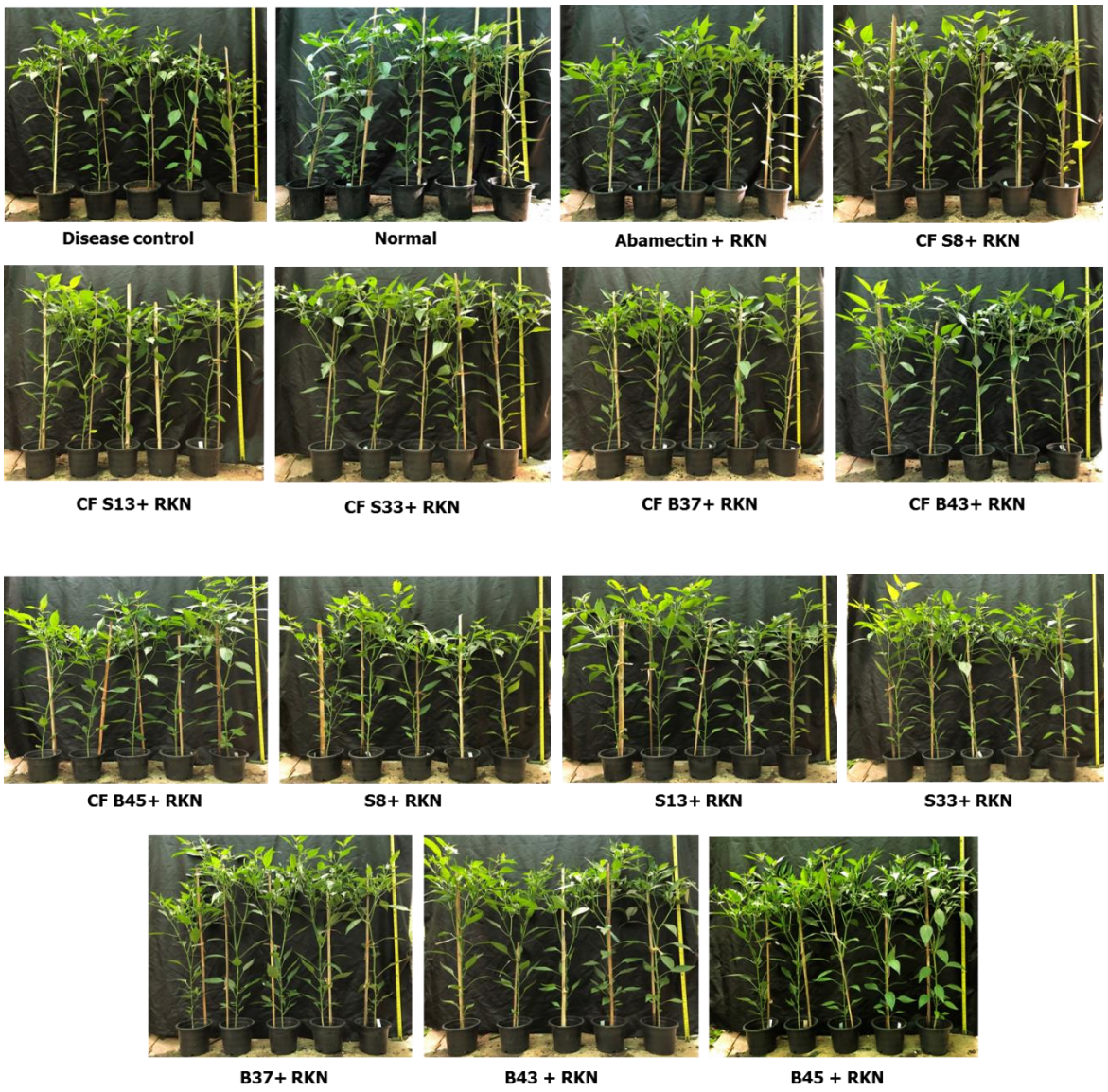
Streptomyces albus strain ZD11 chromosome, complete genome Identities 95%

```
S33            3   GGGAACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG  62
     *** *********************************************************
CP033071.1 267   GGG-ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG  325

S33           63   GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC  122
     ************************************************************
CP033071.1  326   GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC  385

S33          123   TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA  182
     ************************************************************
CP033071.1  386   TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA  445

S33          183   GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  242
     ************************************************************
CP033071.1  446   GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  505

S33          243   CGGAATTATTGKSCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCC  302
     *********** ***********************************************
CP033071.1  506   CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCC  565

S33          303   GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA  362
     ************************************************************
CP033071.1  566   GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA  625

S33          363   ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTARAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC  422
     ************************** ******************************
CP033071.1  626   ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC  685

S33          423   TCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGSGRRRGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  482
     *************************** * *************************
CP033071.1  686   TCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  745

S33          483   CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAKTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTTAK  542
     ********************************* **********************
CP033071.1  746   CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTTAG  805

S33          543   TGCTGCAGCTAA  554
     ************
CP033071.1  806   TGCTGCAGCTAA  817
```

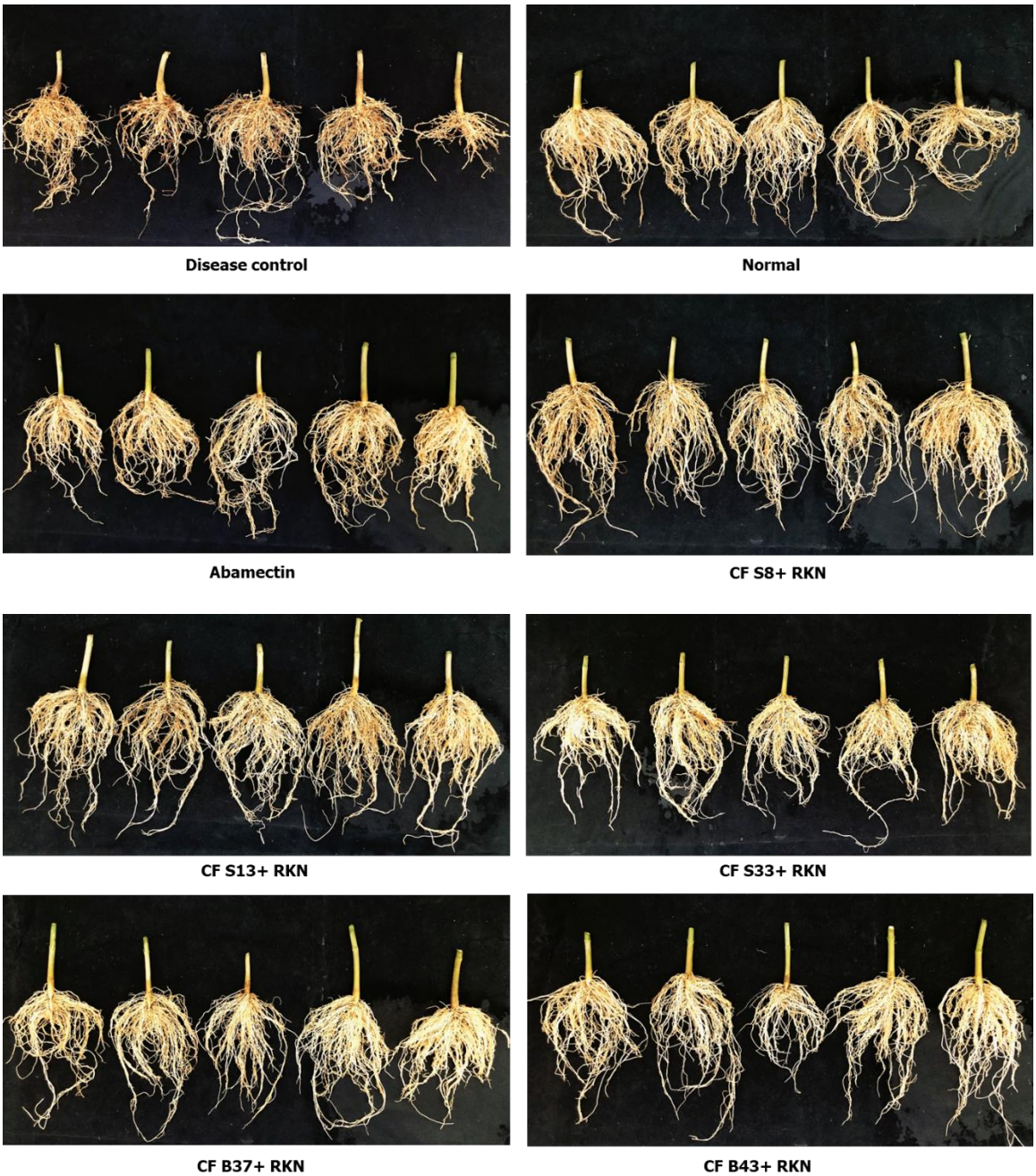
ภาพที่ 20 เปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ Streptomyces ไอโซเลต S33 ในฐานข้อมูล (GenBank database) NCBI



ภาพที่ 21 Phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp.



ภาพที่ 22 พริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท อายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปม 9 สัปดาห์



ภาพที่ 23 รากพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท อายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปม 9 สัปดาห์

CF B45+ RKN

S8+ RKN

S13+ RKN

S33+ RKN

B37+ RKN

B43+ RKN

B45+ RKN

ภาพที่ 23 รากพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอท อายุ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปม 9 สัปดาห์ (ต่อ)