

ประสิทธิภาพของบาซิลลัสในการควบคุมโรคเมล็ดต่างข้าว^{1/}
Efficacy of *Bacillus* sp. control Dirty Panicle Rice Fungal Pathogens^{1/}

ผู้ทำสัมมนา

นางสาวเพชรไพลิน ปราบเสร็จ^{2/}

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์สุพัตรา คำเรียง^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของบาซิลลัสในการควบคุมโรคเมล็ดต่างข้าว เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าวในประเทศไทย ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าว *B. oryzae* (NPT0508) *C. lunata* (SPB0627) และ *F. incarnatum* (SKA06131) โดยใช้วิธีการ Dual culture method พบว่า แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ IBK-8, IBK-4 และ IBK-5 จากทั้งหมด 513 สายพันธุ์ มีผลกระทบบต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าวทั้ง 3 ชนิดได้สูงที่สุด คือ *C. lunata* (0-34.55%) *B. oryzae* (0-38.78%) และ *F. incarnatum* (0-34.97%) และทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ (IBK-4, IBK-8 และ IBK-5) และทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ (IBK-4, IBK-8 และ IBK-5) ด้วยวิธีการฉีดพ่นแบคทีเรียบนข้าวพันธุ์ กข47 จากนั้นฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่าง ในสภาพเรือนทดลองแล้วเก็บข้อมูลการเกิดโรคบนเมล็ดข้าวหลังจากการฉีดพ่น 21 วัน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต IBK-8 สามารถควบคุมการเกิดโรคเมล็ดต่างข้าว ที่เกิดจากเชื้อรา *B. oryzae* NPT0508 (27.6%), *C. lunata* SPB0627 (22.6%) และ *F. incarnatum* SKA06131 (19.40%) แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ จากการทดสอบมีเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลต ผิดปกติอยู่ในการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทุกไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-BK ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไปในลักษณะที่บวมพองเสียรูปร่าง เส้นใยบิดงอ หรือเส้นใยมีผนังสีเข้มมากขึ้น ดังนั้นสรุปได้ว่า *Bacillus subtilis* ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา แสดงถึงลักษณะการควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดการศึกษาที่มีความสำคัญในการต้านเชื้อราที่สามารถนำมาใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียปฏิชีวนะ ; โรคเมล็ดต่าง ; การเคลือบเมล็ด

^{1/}เอกสารประกอบสารรายวิชา 1201 408 สัมมนาพืชไร่

^{2/}นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

^{3/}อาจารย์ประจำภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทนำ

โรคเมล็ดต่างข้าว (Dirty panicle) ที่เกิดจากเชื้อรามีอาการบนเปลือกเมล็ดข้าวโดยแสดงอาการจุดสีดำขนาดเล็กและขยายใหญ่ขึ้น ในบางครั้งพบอาการแผลดำขนาดใหญ่หรือเป็นรอยต่างดำทั่วทั้งเมล็ดและเมล็ดลีบ เชื้อราสาเหตุของโรคเมล็ดต่างข้าวทำลายได้ตั้งแต่ช่วงที่ข้าวเริ่มตั้งท้องเป็นต้นไป ซึ่งสาเหตุของโรคเมล็ดต่างนั้นเกิดจากเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata* (Wakk) *Bipolaris oryzae* (*Helminthosporium oryzae*) (Breda de Haan) *Fusarium incarnatum* (*F. semitectum*) (Berk & Rav) *Cercospora oryzae* (I.Miyake) *Trichoconis padwickii* (Ganguly) และ *Sarocladium oryzae* (Sawada) เชื้อราเหล่านี้เพิ่มปริมาณโดยการสร้างโคนิเดียซึ่งสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำ ลม หรือติดไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าว เมื่อข้าวแสดงอาการเมล็ดต่างทำให้สูญเสียทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ (กวิณธรณ์ และคณะ, 2559) รายงานว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 3 มีความอ่อนแอต่อโรคเมล็ดต่างและเมื่อตรวจหาสาเหตุพบว่าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *C. lunata*, *F. semitectum* และ *H. oryzae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *C. lunata* พบมากที่สุดและพบทั่วไปบนเมล็ดพันธุ์ข้าวที่เก็บมาจากภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย เชื้อราสามารถเข้าไปทำลายตั้งแต่ข้าวเริ่มติดเมล็ดและพัฒนาต่อไปจนทำให้เกิดอาการเมล็ดต่างและเมล็ดลีบในระยะใกล้เก็บเกี่ยวส่งผลทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ สูญเสียความงอกจนเสียคุณภาพของการเป็นเมล็ดพันธุ์ หากมีการนำผลผลิตจากแปลงนั้นมาใช้ทำเมล็ดพันธุ์ข้าวได้ เมื่อนำข้าวไปขัดสีจะได้เมล็ดข้าวที่มีคุณภาพต่ำ และแตกหักง่าย นอกจากนี้สปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคยังแพร่ระบาดโดยปลิวไปกับลม หรือติดไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าวได้ ซึ่งก่อให้เกิดโรคในการปลูกฤดูต่อไป เกษตรกรจึงนิยมใช้สารเคมีในการกำจัด เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีนั้นมักก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในดิน รวมไปถึงสภาพแวดล้อม และเป็นอันตรายต่อเกษตรกร รวมไปถึงผู้บริโภค การควบคุมโดยใช้ศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัด เป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไป มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าการใช้สารฆ่าแมลง ให้ผลในการควบคุมที่ชัดเจน (วีรเทพ และคณะ, 2559) โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถนำไปใช้ป้องกันโรคในข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดปัญหาการสร้างความต้านทานของศัตรูพืช มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม (Zimmermann, 1992) ทำให้สามารถขับเคลื่อนระบบการเกษตรให้ยั่งยืน สอดคล้องกับนโยบายรัฐบาลในการส่งเสริมการทำการเกษตรแบบปลอดภัย

การควบคุมโรคด้วยชีววิธีคือการใช้จุลินทรีย์ที่ลดจำนวนเชื้อก่อโรค หรือแอกติวิตีของเชื้อก่อโรคซึ่งเรียกว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microbials) การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชเกิดขึ้นในราวปี ค.ศ. 1965 งานวิจัยในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชจึงเริ่มได้รับความ

สนใจอย่างต่อเนื่องและแพร่หลายจนถึงปัจจุบันทั้งนี้เพื่อจะมุ่งไปสู่การควบคุมโรคพืชแบบวิธีผสมผสาน โดยมีวัตถุประสงค์หลักในเรื่องการเพิ่มผลผลิตการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะคัดเลือกจากในบริเวณที่ไม่เกิดโรคหรือบริเวณที่โรคลดลงหรือบริเวณที่ไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อโรค และในบริเวณที่มี host ซึ่งมีความไวต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมกกว่าบริเวณที่เกิดโรค (Baker and Cook, 1974)

การควบคุมโรคโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1. กระบวนการ antibiosis ใช้ผลผลิตซึ่งได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเข้าไปยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง

1.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวล โมเลกุลต่ำ ผลิตโดยจุลินทรีย์ มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระดับความเข้มข้นต่ำ (Fravel, 1988) บทบาทของสารปฏิชีวนะต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพื่อนำมาผลิตในอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

1.2 การสร้างสารระเหย (volatile substances) มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีพบว่าสารระเหยบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา Howell และคณะ (1988) รายงานการควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahliae* จากสารระเหยแอมโมเนียซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* นอกจากนั้น alkyl pyrones ก็เป็นสารระเหยชนิดหนึ่งซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดโดยเฉพาะ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค damping-Off ของผักกาดหอม (Claydon และคณะ, 1987) ไฮโดรเจนไซไดยาไนด์จาก *Pseudomonas fluorescens* ควบคุมเชื้อ *Thielaviopsis basicola* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรครากเน่าของต้นยาสูบ (Schippers และคณะ, 1990)

2. กระบวนการแก่งแย่งอาหาร (nutrient competition) แหล่งคาร์บอนซึ่งได้รับจากคาร์โบไฮเดรตและกลูโคสเป็นสารอาหารหลักที่มีจำกัดเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการแข่งขันซึ่งกันและกันในการนำสารอาหารนี้มาใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้เร็วและมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถที่จะนำเอาสารอาหารซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อจุลินทรีย์อื่น (Gilbert และคณะ, 1990) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีกลไกหลักในการควบคุมโรคพืชแบบแข่งขันที่สำคัญ เช่น *Fusarium oxysporum* (Lemanceau และคณะ, 1993) ตัวอย่างเช่น *F. oxysporum* F047bio ใช้ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* WES 816 ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของมะเขือเทศ

3. กระบวนการปรสิต (parasitism) พบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อรา เอนไซม์ตัวหลักที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือ เอนไซม์ chitinase และ B-1, 3-glucanase ซึ่งจะย่อยสลาย chitin และ R-1,3-glucan อันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราชั้นสูง (Tweddell *et al.*, 1992) และผนังเซลล์ของ *schistosoma* (Banyagoub and Jabaji-Hare, 1992) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะสร้าง chitinase และ 3-1,3-glucanase ในอาหารที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรด (Elad *et al.*, 1982)

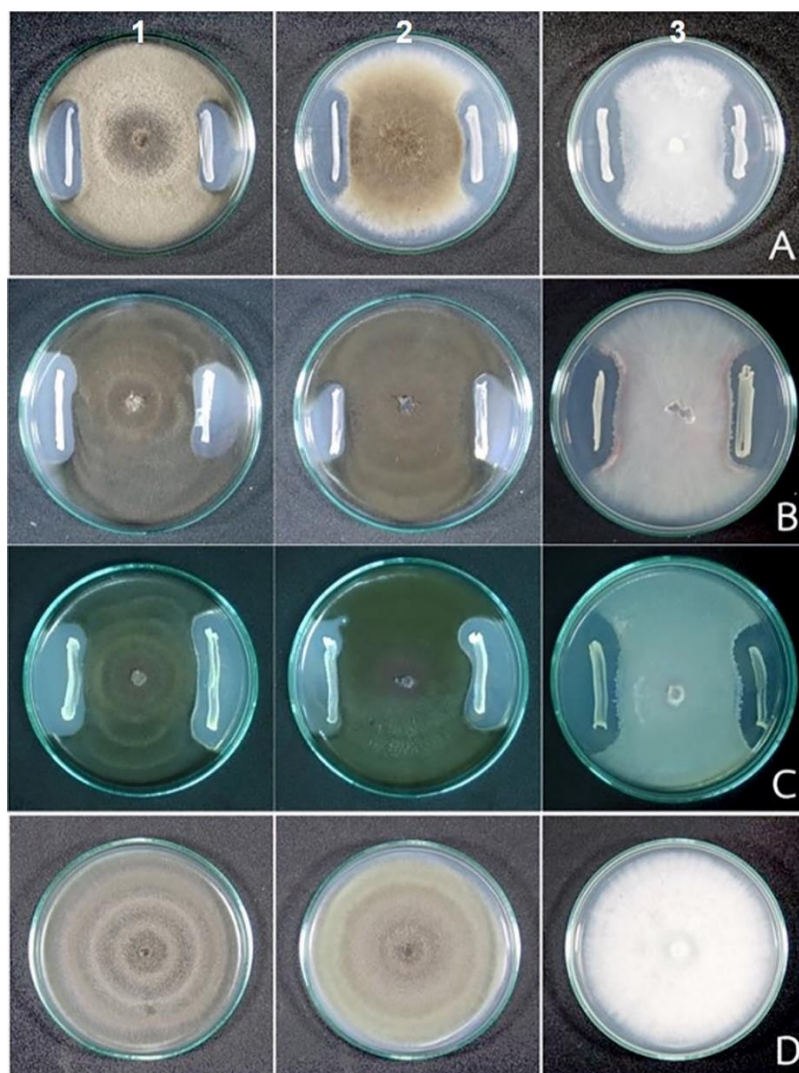
เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส

เชื้อ *Bacillus* spp. หลายชนิด (species) มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (Chen *et al.*, 2014) มีรายงานว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สร้างสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น iturin, fengycin และ surfactin (Zhao *et al.*, 2014) เอ็นโดสปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ทำให้ เชื้อ *Bacillus* ทำให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และง่ายต่อการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืช (Raaijmakers *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด มีคุณสมบัติเป็นทั้งเชื้อปฏิปักษ์และคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช (Ahmad *et al.*, 2008) กลไกที่เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชมีหลายกลไก เช่น การผลิตสารที่มีลักษณะคล้ายฮอร์โมนพืช (indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid and ethylene) การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุฟอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปที่รากพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ การผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase ช่วยลดสภาวะเครียดในพืช รวมทั้งการผลิตสาร siderophore เป็นต้น (Souza *et al.*, 2015)

การคัดเลือกแบคทีเรียบาซิลลัส

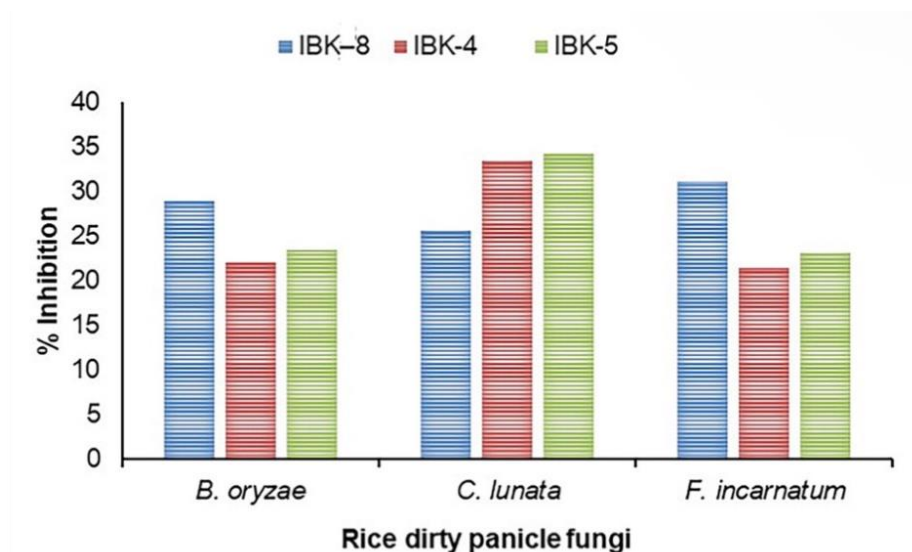
Jintana *et al.* (2021) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากป่าพรุในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าวในประเทศไทย ได้สำรวจและสุ่มตัวอย่างดินในปี 2560-2561 ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากป่าพรุในประเทศไทย สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 513 ไอโซเลต และเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าว 3 ไอโซเลต ได้แก่ *B. oryzae* (NPT0508) *C. lunata* (SPB0627) และ *F. incarnatum* (SKA06131) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างโดยใช้วิธีการ Dual culture method (ภาพที่ 1) และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย

3 สายพันธุ์ (IBK-4, IBK-8 และ IBK-5) จากทั้งหมด 513 สายพันธุ์ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างทั้ง 3 ชนิดได้สูงที่สุด คือ *C. lunata* (0-34.55%) *B. oryzae* (0-38.78%) และ *F. incarnatum* (0-34.97%) (ภาพที่ 2)



ที่มา: Jintana *et al.* (2021)

ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคเมล็ดต่างในข้าว A: IBK-8; B: IBK-4; C: IBK-5 และ D: กลุ่มควบคุม (เชื้อรา); 1: *Bipolaris oryzae* NPT0508; 2: *Curvularia lunata* SPB0627 และ 3: *Fusarium incarnatum* SKA06131



ที่มา: Jintana et al. (2021)

ภาพที่ 2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคเมล็ดต่างในข้าว 3 ชนิด ได้แก่ *Bipolaris oryzae* NPT0508, *Curvularia lunata* SPB0627, และ *Fusarium incarnatum* SKA06131 โดยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ (IBK-8, IBK-4, IBK-5) ในการทดสอบการเพาะเลี้ยงร่วม

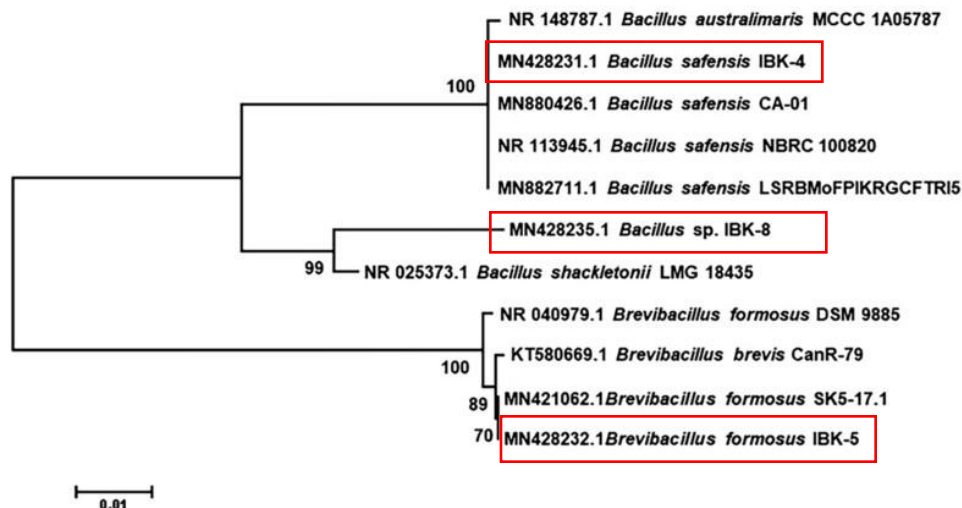
การทดสอบการเกิดโรคในข้าว โดยการเตรียมเชื้อบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-28°C) เป็นเวลา 7 วัน และเตรียมเชื้อแบคทีเรีย IBK-8, IBK-4 และ IBK-5 เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร แล้วปรับเป็น O.D. 1.1-1.2 ด้วย 108 CFU/มล. (Schaad, โจนส์, & ชุน, 2001) จากนั้นทำการฉีดพ่น ด้วย IBK-8, IBK-4 และ IBK-5 จากนั้น ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรค (SPB0627) ถูกเพาะเชื้อบนข้าวพันธุ์ กข47 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ในระยะเบตข้าวโดยใช้สปอร์แขวนลอย (105 สปอร์/มล.) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยพ่นบนรวงข้าว 3 รวง/ต้น จำนวน 5 ต้น การประเมินโรคทำได้โดยนำเมล็ดที่ได้จาก 15 รวง แล้วสุ่มเลือก 400 เมล็ด 5 ครั้ง เพื่อการประเมินความรุนแรงของโรคได้ดำเนินการที่ 21 วันหลังการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโวลเท IBK-8 สามารถควบคุมการเกิดโรคเมล็ดต่างข้าว ที่เกิดจากเชื้อรา *B. oryzae* NPT0508 (27.6%), *C. lunata* SPB0627 (22.6%) และ *F. incarnatum* SKA06131 (19.40%) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความรุนแรงของโรคและค่าดัชนีโรคหลังการปลูกเชื้อ *B. oryzae* NPT0508, *C. lunata* SPB0627, *F. incarnatum* SKA06131 และการทดลองใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ IBK-4, IBK-5, IBK-8 ภายใต้สภาพโรงเรือน

Treatment	Disease severity (%)	Disease index (%)
<i>B. oryzae</i> NPT0508 + IBK-4	32.4	30.60c
<i>B. oryzae</i> NPT0508 + IBK-5	36.2	32.60b
<i>B. oryzae</i> NPT0508 + IBK-8	30.6	27.60d
<i>B. oryzae</i> NPT0508	45.0	44.60a
C.V. (%)		4.2259
<i>C. lunata</i> SPB0627 + IBK-4	28.2	23.60c
<i>C. lunata</i> SPB0627 + IBK-5	34.7	33.20b
<i>C. lunata</i> SPB0627 + IBK-8	25.1	22.00c
<i>C. lunata</i> SPB0627	46.3	45.40a
C.V. (%)		4.8175
<i>F. incarnatum</i> SKA06131 + IBK-4	30.8	28.20b
<i>F. incarnatum</i> SKA06131 + IBK-5	27.7	25.00c
<i>F. incarnatum</i> SKA06131 + IBK-8	23.8	19.40d
<i>F. incarnatum</i> SKA06131	33.9	32.00a
C.V. (%)		5.7962

ที่มา: Jintana et al.(2021)

แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีการยืนยันการจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกระบุว่าเป็นบาซิลลัส (IBK-4 และ IBK-8) บาซิลลัส (IBK-5) ตามการจัดลำดับ 16S rRNA (ภาพที่ 3) จากนั้นจึงประเมินทั้ง 3 สายพันธุ์ในพันธุ์ข้าวพบว่าบาซิลลัส สายพันธุ์ IBK-8 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการพัฒนาของโรคตามที่ได้สังเกตได้จากความรุนแรงและดัชนีของโรค ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าสายพันธุ์แบคทีเรียจากป่าพรุมีโอกาasเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อโรคในพืช



ที่มา: Jintana *et al.* (2021)

ภาพที่ 3 แผนผังสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียที่แยกได้จากปาพร และกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงซึ่งได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยอ้างอิงจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-Joining ในโปรแกรม MEGA 7 ตัวเลขบนกิ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของการสุ่มตัวอย่างแบบ Bootstrap (1,000 ครั้ง)

รัตนพร และ เพชรรัตน์ (2021) การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เรียปฏิบัติที่มีฤทธิ์กว้างสำหรับควบคุมโรคเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวในห้วงปฏิบัติการ ดำเนินงานทดลองโดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ *Streptomyces* spp. 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR87, *Streptomyces*-PR15 และเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ *Bacillus* spp. จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-BS, *Bacillus*-BK, *Bacillus*-PSK และ *Bacillus*-Ba037N มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Fusarium fujikuroi*-FURS017, *Fusarium proliferatum* FUSR002, *Fusarium* spp.-FUSR021, *Bipolaris oryzae*-BiKD5, *Curvularia lunata*-CurRD, *Alternaria padwickii* AlKD5 และ *Rhizoctonia oryzae*-Rhi-SMN1 โดยวิธี dual culture bioassay พบว่า แบคทีเรียปฏิบัติ *Bacillus* spp. จัดเรียงลำดับเชื้อที่มีศักยภาพมากที่สุดมีฤทธิ์กว้างควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ทั้ง 7 ไอโซเลต คือ *Bacillus*-MS4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 71.93% ขึ้นอยู่กับชนิดเชื้อราสาเหตุ

โรคข้าวที่นำมาทดสอบ รองลงมาอันดับ สองคือ *Bacillus*-Ba029 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวอยู่ในช่วง 80.23% และลำดับที่สามมีหลายไอโซเลต ที่ระดับการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเหตุโรคได้ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ หรือ แตกต่างกันเล็กน้อย ได้แก่ *Bacillus*-NTS3 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 69.64%, *Bacillus*-Ba033 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 67.97%, *Bacillus*-BS เปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 66.57% , *Bacillus*-S32 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 69.92% และ *Bacillus*-BK มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 66.56% (ตารางที่ 2)

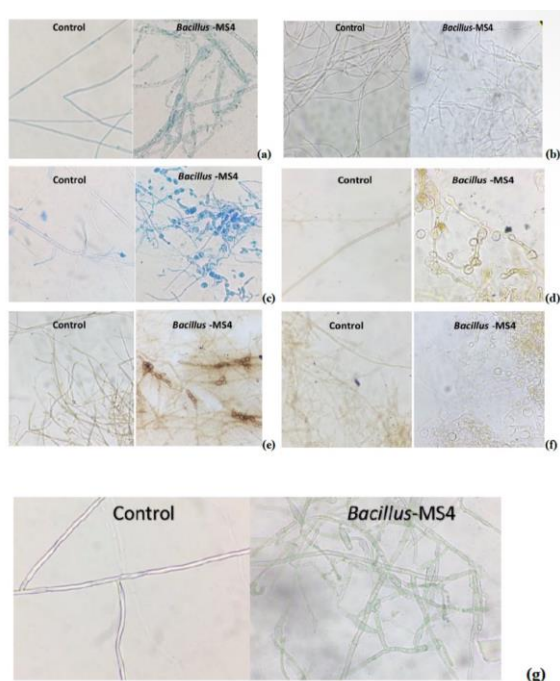
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Fusarium fujikuroi*-FUSR017, *Fusarium periferatum*-FUSR002, *Fusarium* spp.-FUSR021, *Bipolaris oryzae*-BiKD5, *Curvularia lunata*-CurRD, *Alternaria padwickii*-ALKD5 และ *Rhizoctonia oryzae*-Rhi-SMN1 โดย *Streptomyces* spp. หรือ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ซึ่งถูกกำหนดโดยวิธี dual culture bioassay บน PDA โดยทำการวัดหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน

Antagonists	Inhibition of mycelium growth (%) ^{1/} of pathogenic fungi						
	FUSR017	FUSR002	FUSR021	BiKD5	CurRD	ALKD5	Rhi-SMN1
Control	0.00g	0.00e	0.00f	0.00h	0.00h	0.00h	0.00d
<i>Streptomyces</i> -PR87	45.12e	0.00 ² e	50.79c	24.69e	49.38d	57.65e	0.00 ² d
<i>Streptomyces</i> -PR15	7.96f	0.00 ² e	48.75d	20.48f	45.00e	58.19e	0.00 ² d
<i>Bacillus</i> -PSK	0.00g	0.00e	2.04e	8.08g	19.69g	46.75g	0.00d
<i>Bacillus</i> -Ba037N	0.00g	0.00e	2.73e	10.54g	27.19f	53.75f	0.00d
<i>Bacillus</i> -NTS3	56.71b	62.16d	62.73b	46.24c	59.07c	69.74ab	64.77b
<i>Bacillus</i> -BK	54.55d	62.61bcd	62.39b	39.56d	66.56b	65.47d	60.91c
<i>Bacillus</i> -MS4	71.93a	63.30b	79.89a	65.71a	67.82b	70.75a	67.50a
<i>Bacillus</i> -BS	54.89cd	62.62bcd	62.27b	43.02cd	65.63b	66.57cd	64.09b
<i>Bacillus</i> -Ba029	57.16b	64.09a	80.23a	44.54c	72.19a	67.40cd	64.55b
<i>Bacillus</i> -S32	56.36bc	62.39cd	62.39b	58.65b	66.88b	69.62ab	60.00c
<i>Bacillus</i> -Ba033	54.66cd	63.07bc	61.93b	58.95b	66.25b	67.97bc	60.68c
F-test	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	3.14	1.5	1.66	7.99	3.06	2.34	3.65

ที่มา: รัตนาพร และ เพชรรัตน์ (2021)

ประเมินผลกระทบของสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ปลดปล่อยออกจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยอ้อมได้โดยสังเกตจากลักษณะของเส้นใยใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สารทุติยภูมิจากเชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตมีผลกระทบต่อเส้นใยเชื้อราทดสอบในลักษณะที่สอดคล้องไปกับผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคข้าวโดยเชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบที่ 7 วันหลังจากบ่มเชื้อร่วมกันพบว่าเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคในบริเวณที่เกิดแนวยับยั้งนั้นมีลักษณะที่ผิดปกติ ซึ่งส่วน

ใหญ่เป็นไปในลักษณะบวมพองเสียรูปร่าง เส้นใยบิดงอ หรือเส้นใยมีผนังหนาสีเข้มมากขึ้นและบวมพองด้วยในอัตราที่มากกว่าเส้นใยปกติในชุดควบคุม ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*-MS4 มีระดับการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคที่รุนแรงชัดเจนมากกว่าเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ต่ำกว่า (ภาพที่ 3) ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87 และ *Streptomyces*-PR15 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. fujikuroi* -FUSR017, *Fusarium* sp.-FUSR021, *B. oryzae* -BiKD 5, *C. lunata* -CurRD และ *A. Padwickii*-ALKD5 ได้อย่างชัดเจน โดยเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะบวมพอง บิดงอหรือเส้นใยมีผนังสีเข้มมากขึ้นและบวมพองเช่นเดียวกับที่พบใน *Bacillus*-MS4 และยังพบว่าแม้แต่ในกรรมวิธีที่ทดสอบกับเชื้อรา *F. proliferatum* -FUSR002 และ *R. oryzae*-Rhi-SMN1 ซึ่งยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้เล็กน้อยนั้น เมื่อนำเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 ไอโซเลตซึ่งเจริญได้บางๆ ใกล้กับชิ้นวันที่แบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญอยู่ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็พบว่าเส้นใยมีการบวมพองเช่นเดียวกัน



- (a) *Fusarium fujikuroi* -FUSR017,
- (b) *Fusarium proliferatum* -FUSR002,
- (c) *Fusarium* spp.-FUSR021,
- (d) *Bipolaris oryzae* -BiKD5,
- (e) *Curvularia lunata* -CurRD,
- (f) *Alternaria padwickii* -ALKD5,
- (g) *Rhizoctonia oryzae*-Rhi-SMN1

ที่มา: รัตนาพร และ เพชรรัตน์ (2021)

ภาพที่ 3 การสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงเกี่ยวกับการเจริญที่ผิดปกติของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคจากบริเวณยับยั้งหลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Bacillus*-MS4 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (ภาพด้านขวา) เปรียบเทียบกับเส้นใยเชื้อราปกติในการทดลองควบคุม (ภาพด้านซ้าย)

ธิดารัตน์ และคณะ (2021) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข 69 หลังการเคลือบร่วมกับ *Bacillus subtilis* ที่อัตราแตกต่างกัน โดยผลการทดลองพบว่า การเคลือบเมล็ดร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่อัตรา 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร จากการเคลือบเมล็ดข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ในสภาพโรงเรือน พบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เคลือบเมล็ดมีอัตราการงอกสูงที่สุดอยู่ที่ 94% รองลงมา คือ เมล็ดที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์อย่างเดียว อัตราการงอกอยู่ที่ 86% และอันดับที่สาม คือ การเคลือบเมล็ดด้วยพอลิเมอร์กับ *Bacillus subtilis* ที่อัตรา 1 มิลลิลิตร อัตราการงอกอยู่ที่ 82% และอันดับที่สี่ คือ การเคลือบเมล็ดด้วยพอลิเมอร์กับ *Bacillus subtilis* ที่อัตรา 3 มิลลิลิตร อัตราการงอกอยู่ที่ 73% และการเคลือบเมล็ดด้วยพอลิเมอร์กับ *Bacillus subtilis* ที่อัตรา 2 มิลลิลิตร มีอัตราการงอกต่ำที่สุดอยู่ที่ 68% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราการงอกและดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวเจ้าดอกมะลิ 105 และ กข69 ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการโรงเรือน โดยการเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในปริมาณที่แตกต่างกัน

Treatments ^{1/2/}	Seed germination (%)			
	Khao dawk mail 105		RD69	
	Laboratoy	Greenhouse	Laboratoy	Greenhouse
T ₁	98	94a	90	85
T ₂	99	86a	92	78
T ₃	100	82ab	88	75
T ₄	99	68c	89	80
T ₅	100	73bc	93	76
C.V. (%)	1.11	10.24	4.46	5.78
F-test	Ns	**	ns	ns

หมายเหตุ: ns = not significant and ** = significant at P < 0.01, respectively

^{1/} Means within a column followed by the same letter are not significantly at P < 0.01 and P < 0.05 by LSD

^{2/} T1 = Non-coated seed, T2 = Seed coating with polymer alone, T3 = Seed coating with polymer plus *Bacillus subtilis* 1 mL, T4 = seed coating with polymer plus *Bacillus subtilis* 2 mL, T5 = Seed coating with polymer plus *Bacillus subtilis* 3 mL.

ที่มา: ธิดารัตน์ และคณะ (2021)

สรุป

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียบาซิลลัสที่แยกได้จากดิน ไอโซเลตที่ดีที่สุดคือ IBK-4, IBK-5 และ IBK-8 เมื่อนำมาประเมินเป็นสารควบคุมทางชีวภาพกับเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างข้าว ได้แก่ *B. oryzae* NPT0508, *C. lunata* SPB0627 และ *F. incarnatum* SKA06131 การคัดเลือกและระบุว่าเป็น IBK-4 (*Bacillus safensis*), IBK-5 (*Brevibacillus formosus*) และ IBK-8 (*Bacillus* sp.) ตามลำดับ แบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุด โดยที่สารทุติยภูมิจะมีรายงานในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้นั้น ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสารปฏิชีวนะ เช่น bacilysocin, gramicidin, tyrocidine, bacitracin, mycobacillin, surfactin, bacilysin และ subtilin และแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* spp. ผลิตภัณฑ์ปฏิชีวนะ เช่น streptomycin geldanamycin และ nigericin (Mannanov and Sattarova, 2001) และ อาจมีกลุ่มเอนไซม์ผลิตออกมาด้วย เช่น สกุล *Bacillus* spp. สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ hydrolytic enzymes ออกมาแล้วช่วยเสริม กิจกรรมการย่อยผนังเซลล์เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เส้นใยเชื้อราเสียหาย หรือแตกหักได้ง่ายขึ้น เช่น chitinase, chitosanase, laminarinase, lipase and protease (Priikko *et al.*, 2001) Alekhya และ Gopalakrishnan (2017) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Streptomyces* spp.ผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค เช่น cellulase, lipase, protease และ b-1,3-glucanase ได้เช่นกัน และ Zeidan *et al.* (2019) รายงานการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่นำมาทดสอบที่เกิดขึ้นมีลักษณะผิดปกติ บวมพองหรือแตกหักเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ที่คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อ *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum* และ *Penicillium verrucosum* ที่ได้รับสารทุติยภูมิที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่เป็นเชื้อ ปฏิชีวนะควบคุมเชื้อรา เป็นสารปฏิชีวนะที่มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของ ochratoxin A ในเชื้อสาเหตุโรค *A. carbonarius* เพื่อนำไปสู่การพัฒนาชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคเมล็ดต่างข้าวในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กวินธรรพ์ บุปผา, เทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข, รัชมี ฐิติเกียรติพงศ์, ศิริพร กออินทร์ศักดิ์ และ จินตนา อันอาตม์งาม. 2559. การสำรวจโรคเมล็ดต่างข้าวที่เกิดจากเชื้อราและการพัฒนานิเวศวิทยาการประเมินโรคในสภาพโรงเรือน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 47(3): 339-349.
- ธิดารัตน์ แก้วคำ. 2564. ผลของการเคลือบเมล็ดพันธุ์ร่วมกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์กข 69. วารสารแก่นเกษตร 49 (พิเศษ 1) :936-941.
- รัฐเมือง รัตนพร, และ ธรรมเบญจพล เพชรรัตน์. 2021. “การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างสำหรับควบคุมโรคขอบใบแห้งและโรคเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวในท้องปฏิบัติการ” วารสารแก่นเกษตร 49 (6) : 1474 - 86. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj/article/view/249170>.
- วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, นวลศิริ สืบบุญมี, ไสวบุรณพานิชพันธุ์, ปภพ สินขยกุล และจิราพร กุลสาริน. 2559. ประสิทธิภาพสารพบบางชนิดในการเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* MRT-PCH 048 เพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วารสารเกษตร 34(2): 227-234.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiology Journal. Res. 163: 173-181. Alekhyia, G., and S. Gopalakrishnan. 2017. Biological control and plant growth-promotion traits of Streptomyces species under greenhouse and field conditions in chickpea. Journal of Agricultural Research 6(4): 410–420.
- Baker, K.F. and Cook, R.J. 1974. Biocontrol of plant pathogens. St. Paul: Am. Phytopathology. Soc. 433 pp.
- Fravel, D. R. 1988, Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathology. 26:75-91.
- Fravel, D. R. 1988, Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathology. 26:75-91.
- Gilbcr, G. S., Handelsman, d., and Farhe. J. I.. 1990. Bacterial communities in soil and on soybean roots, and the effects of a biological control agent. Phytopathology. 80:995. Jintana Unartngam, Thiphaphorn Naunnet, Sasawat Sangsuk, Orawan Chountragoon, Chommanat Kerdkhong and Manee Tantirungkij. 2021. Effectiveness of Bacteria Isolated from Peat Swamp Forests to Control Rice

- Dirty Panicle Fungi in Thailand. AGRIVITA Journal of Agricultural Science. 43(2): 262-272.
- Lemanceau, P., Bakker, P. A., and Kogel, W. J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* 1:047 and Pseudobactin 358 pathogenic *Fusarium oxysporum* T. sp. diunthi. Journals Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59(1). 59:74 -82.
- Mannanov R. N., and R.K. Sattarova. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria chemistry of natural compounds. Chemistry of Natural Compounds. 37: 117-123. Pirkko, H., G. Aktuganov, N.F. Galimzyanova, and A. Melent. 2001. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components. Journal of chromatography biomedical sciences and applications. 758: 197-205.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81: 537-547.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (Eds.). 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3rd ed.). The American Phytopathological Society. Retrieved from <https://my.apsnet.org/APSSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=42635>.
- Souza Rd, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2015. Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet. Mol. Biol. 38: 401-419.
- Zeidan, R., Z. Ul-Hassan, R. Al-Thani, G. Migheli, and S. Jaoua. 2019. In-Vitro application of a Qatari *Burkholderia cepacia* strain (QBCO3) in the biocontrol of mycotoxigenic fungi and in the reduction of Ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius*. Toxins. 11: 700.
- Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S.A., Tejera, E. and Stapley, E. O. 1992. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I Production, taxonomy and antibacterial activity. J. Antibiotics. 40:1677-1681.