ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

Efficacy of Endophytic Bacteria on Growth Inhibition of Important Plant Pathogenic Fungi

รัฐสิทธิ์ แซ่ลี้[1] **และพรหมมาศ คูหากาญจน์**[1*]
Rattasit Saelee[1] and Prommart Koohakan[1*]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถใช้ควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชบางชนิดได้ อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อการผลิตพืชยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการมีชีวิตรอดและการคงประสิทธิภาพ จึงได้มีการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่แยกได้จากมะเขือเทศ (SuRW02, SuRW01 และ LbRW03) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าว (Su2S217, SuR317, BaS417 และ BaR917) ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อ *Fusarium* sp. และ *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคพืชมาศึกษาความมีชีวิตรอด รวมถึงคุณสมบัติในการคงประสิทธิภาพเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน และนำไปทดสอบความเป็นปฏิปักษ์เพิ่มเติมด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม โดยเชื้อสาเหตุโรคพืชมีดังนี้ คือ *Furarium oxysporum, Colletotrichum capsici, Pythium* sp. และ *Pyriculraria* sp. ผลการทดลองพบว่าทุกไอโซเลทยังมีชีวิตรอด และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอื่น ๆ ได้ เช่น ไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ที่สามารถยับยั้ง *F. oxysporum*., *Pyricularia* sp. และ *C. capsici* ได้มากกว่า 50% ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบจำเพาะเจาะจง ยกเว้น SuR317 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Pyricularia* sp., *C. capsici, Pythium* และ *F. oxysporum* จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลท BaR917 และ SuRw02 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคข้าวและมะเขือเทศตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด คือ *Bacillus* sp. และ *Sphingobacterium* sp. ตามลำดับ

คำสำคัญ: การควบคุมโรคโดยชีววิธี, endophytic bacteria, Fusarium, Pyricularia, Pythium, Colletotrichum

Abstract

Endophytic bacteria are one type of microorganism that can be used to effectively control plant-pathogenic fungi. However, the use of these microorganisms in plant production improvement is still limited because of problems with levels of efficacy and maintenance or stability of efficacy. In order to study efficacy, experiments were conducted to test the viability of endophytic bacteria isolated from tomato (SuRW02, SuRW01 and LbRW03) and rice (Su2S217, SuR317, BaS417 and BaR917), isolates which were previously reported to be able to control *Fusarium* sp. and *Pyricularia* sp. We also studied the ability of the bacterial isolates to maintain their efficiency as antagonist microorganisms after long-time storage. Included was a dual culture test with other plant pathogenic microorganisms, performed in order to observe additional antagonistic activity. The results showed that all isolates survived, and some isolates were able to inhibit the growth of other fungal pathogens. The isolates LbRW03, SuRW01 and SuRW02 isolated from tomato not only showed the ability to inhibit *Fusarium oxysporum* sp. growth; they also were able to inhibit *Pyricularia* sp. and *C. capsici*. With regard to rice endophytic bacteria, it was found that some isolates had inhibitory effects on specific hosts; however, SuR317 was able to inhibit *C. capsici*, *F. oxysporum* and *Pythium* sp. Two isolates, BaR917 and SuRW02, were selected for 16s rRNA gene sequence studies. The results indicated that the isolates belonged to *Bacillus* and *Sphingobacterium,* respectively.

Keywords: biological control, endophytic bacteria, Fusarium, Pyricularia, Pythium, Colletotrichum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: prommart.ko@kmitl.ac.th

คำนำ

แบคทีเรียภายในเนื้อเยื่อพืช หรือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของพืช และควบคุมโรคพืชได้ จึงมักมีการนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมาใช้งานร่วมกับการผลิตพืชหลายชนิด (Wang et al., 2009; Zhao et al., 2010) โดยในปัจจุบัน แนวโน้มการบริโภคอาหารนั้นเพิ่มสูงขึ้นจากในอดีต (FAO, 2009; Godfray et al., 2010) เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของอาหารและเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของประชากรจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิต รวมถึงค้นหาวิธีควบคุมโรคพืชเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยจากสารเคมีทางการเกษตร การใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีศักยภาพมากพอจะนำไปใช้ตอบสนองต่อความต้องการดังกล่าว ตัวอย่างเช่น รายงานของ Changmuang et al. (2017) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการกระตุ้นการเจริญของเมล็ดพันธุ์ข้าวและควบคุมเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ หรือรายงานของ Prasom et al. (2017) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อป้องกันโรคจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ทำการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลทที่เคยมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Pyricularia* sp. และ *Fusarium* sp. (Changmuang et al., 2017; Prasom et al., 2017) มาประเมินความมีชีวิตรอด ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์อื่น และระบุบางสายพันธุ์ที่มีความสำคัญด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วิธีการศึกษา

การศึกษาความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิม

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่เคยได้มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว (Changmuang et al., 2017) และไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศ (Prasom et al., 2017) มาทำการต่อเชื้อหลังเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -4°C โดยทำการต่อเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการประเมินความมีชีวิตรอดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

ทดสอบด้วยเทคนิคเลี้ยงเชื้อร่วม (Changmuang et al., 2017) สำหรับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เคยมีการรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวให้ทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อ *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. และ *Colletotrichum capsici* ในขณะที่ไอโซเลทที่เคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในมะเขือเทศให้ทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อ *Pyricularia* sp., *Pythium* sp. และ *C. capsici* ทำได้โดยวัดระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองข้าง 2.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการเขี่ยเอาโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียไอโซเลทที่ต้องการขีดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDPA (Potato Dextrose Peptone Agar) วางชิ้นวุ้นของเชื้อสาเหตุโรคบริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีชุดควบคุมเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าและจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองละ 4 ซ้ำ นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

การระบุสายพันธุ์ไอโซเลทสำคัญ (BaR917 และ SuRw02) ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

สกัดเอาจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของ 2 ไอโซเลทสำคัญที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากรายงานก่อนหน้า (Changmuang et al., 2017; Prasom et al., 2017) ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Wilson (modified Wilson, 1990) ดังนี้ เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB นาน 24 ชั่วโมง ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 567 µl, TE 10% SDS 3 µl และ protinase K 20 mg/ml 3 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 5M NaCl 100 µl ผสมให้เข้ากัน ตามด้วยเติมสารละลาย CTAB/NaCl 80 µl (ละลาย 4.1 g NaCl และ 10 g CTAB ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 80 ml) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากบ่มเสร็จเติม chloroform/isoamyl alcohol ที่ปริมาตร equal volume ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที เมื่อเสร็จย้ายส่วนใสด้านบนลงหลอดใหม่เติม equal volume ของ phenol/chloroform/isoamyl alcohol และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสลงหลอดใหม่อีกครั้งและเติม 0.6 vol isopropanol จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อตกตะกอน DNA ทำการล้างตะกอนดังกล่าวด้วย 70% ethanol 1 ครั้ง และทิ้งให้แห้งข้ามคืน นำ DNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีนตำแหน่ง 16s rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (สารในปฏิกิริยาดังนี้: 10x Taq buffer 2 µl, 25 mM $MgCl_2$ 1 µl, dNTPs (2.5 mM each) 0.2 µl, forward และ reverse primer (5 uM) อย่างละ 0.5 µl, Taq DNA polymerase 0.2 µl (5 U), DNA template (10 ng) 5 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10.6 µl รวมทั้งหมด 20 µl) คู่ primer ที่ใช้ คือ 27F และ 1492R (Aslam et al., 2013) เพื่อเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA มีสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการ คือ: initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ทำทั้งหมด 35 รอบปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นำไปตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 0.5% agarose gel และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับ ณ บริษัท Bionics จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Mega X (Neighbor-joining method, NJ) โดยมีค่า bootstrap ที่ 1000 replication

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการศึกษาความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิม

จากการ subculture แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LbRW03, SurW01, SurW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ที่ได้เก็บรักษาในอาหาร NB ผสมกับกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ปี 2016-2018 พบว่าทุกไอโซเลทยังมีชีวิตอยู่ และมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ อีกทั้งยังคงสภาพและรูปร่างไว้ได้คล้ายเดิมหลังจากการแยกครั้งแรก (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Feltham et al. (1978) ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ด้วยเม็ด bead และกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -76°C เป็นระยะเวลา 14 เดือน พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่เก็บรักษาด้วยวิธีนี้ยังมีชีวิตอยู่จำนวนหนึ่งหลังจากนำมาต่อเชื้อ โดยไม่มีสภาวะใด ๆ เปลี่ยนแปลงไป

Table 1 Survival of endophytic bacteria after a long-time storage.

Isolate	Viability*	Colony characteristic				Cell shape
		Color	Shape	Margin	Surface	
LbRW03	+	White	Circular	Entire	Smooth	Bacilli
SuRW01	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
SuRW02	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
Su2S217	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
BaR917	+	White	Circular	Undulate	Smooth	Bacilli
BaS417	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
SuR317	+	White	Circular	Entire	Smooth	Bacilli

* + indicated the growth of bacterial colony on NA media; – indicated no growth of bacterial colony on NA media.

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

เมื่อนำไอโซเลททั้งหมด คือ LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ไปทดสอบกับเชื้อ *Pythium* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ที่ 0.00, 0.00, 0.00, 46.11, 0.00, 38.89 และ 0.00% ตามลำดับ (Figure 1) ไอโซเลท Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ 47.63, 0.70, 2.45 และ 0.00% ตามลำดับ (Figure 2) เมื่อนำไอโซเลททั้งหมดทดสอบกับ *C. capsici* พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ 66.60, 65.13, 68.70, 65.97, 65.97, 69.75 และ 23.32% ตามลำดับ (Figure 3) นอกจากนั้น เมื่อนำไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ไปทดสอบกับเชื้อ *P. oryzae* สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ 59.46, 63.29 และ 63.67% ตามลำดับ (Figure 4) โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้ง *Pythium* sp และ *F. oxysporum* คือ Su2S217 ส่วนไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อ *C. capsici* และ *P. oryzae* ได้ดีที่สุดคือ SuRW01 และ SuRW02 ตามลำดับ (Table 2) โดยจะเห็นได้ว่าไอโซเลทที่แยกได้จากทั้งมะเขือเทศและข้าว สามารถยับยั้งเชื้อ *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคข้าว และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้มากกว่า 50% (ยกเว้น SuR317 ที่ไม่สามารถยับยั้ง *C. capsici* ได้) ทว่าไม่สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. ได้เลย นอกจากนั้น กลุ่มไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว (Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317) ก็ไม่สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ได้เช่นกัน (Table 3)

จากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าในบางไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อสาเหตุได้ เหตุผลที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งโรคได้ หรือยับยั้งได้ในระดับปานกลางสามารถเกิดได้จากหลายกรณี อ้างอิงจากรายงานของ Rosenblueth and Martinez-Romero (2006) พบว่าการตอบสนองของพืชที่มีต่อแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสม นั่นก็คือขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของพืช บางสายพันธุ์พืชนั้นสามารถได้รับประโยชน์จากการกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ยีนของพืชจะแสดงออกก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นโดยการมีอยู่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงกับพืชนั้น ๆ ซึ่งความจำเพาะเจาะจงดังกล่าวอาจเกิดได้จากทั้งความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมหรือปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความจำเพาะต่อเมแทบอไลต์บางชนิดหรือองค์ประกอบทางด้านผนังเซลล์ เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้น จึงอาจหมายความว่าความแตกต่างของพันธุ์พืชจะส่งผลให้มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แตกต่างกันไป และในทำนองเดียวกัน เชื้อสาเหตุโรคพืชก็อาจเข้าทำลายและอยู่อาศัยในพืชด้วยเหตุผลเดียวกัน จึงทำให้เกิดการแก่งแย่งแข่งขันภายในพืชชนิดนั้น ๆ เห็นได้จากการที่ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดหนึ่ง ๆ จะสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคในพืชอาศัยเดียวกันได้ดีและอาจสามารถยับยั้งเชื้อราชนิดอื่น ๆ ได้ (Senthilkumar et al., 2008) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอาจมีการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราที่ส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยไคตินในขณะที่เกือบทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. ซึ่งผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบขึ้นจากเบตากลูแคนและเซลลูโลสได้ (Clavaud et al., 2009) อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณาข้อมูลทั้งหมด ทั้งงานวิจัยก่อนหน้าและงานวิจัยปัจจุบัน พบว่าไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ BaR917 เนื่องจากเมื่อนำไปทดสอบกระตุ้นการเจริญเมล็ดพันธุ์ข้าว พบว่าไอโซเลทดังกล่าวให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในขณะที่ไอโซเลทอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่า แม้ผลการเลี้ยงเชื้อร่วมจะใกล้เคียงกันก็ตาม (Changmuang et al., 2017) รวมถึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* ที่ไม่แตกต่างกับสายพันธุ์อื่นถึงแม้จะยับยั้ง *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* ได้ไม่เท่าไอโซเลทในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ SurW02 โดยเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* (Prasom et al., 2017), *C. capsici* และ *P. oryzae* ได้มากที่สุด เมื่อพิจารณาข้อมูลต่าง ๆ โดยรวม จึงอาจกล่าวได้ว่า BaR917 มีประสิทธิภาพสูงสุดในข้าว เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่ต่างกับไอโซเลทอื่น ๆ และยังมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของข้าวมากที่สุด ในขณะที่เชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทั้ง Su2S217, BaS417 และ SuR317 เอง มีประสิทธิภาพด้อยกว่าในด้านการกระตุ้นการเจริญ (Changmuang et al., 2017) ถึงแม้ว่าไอโซเลทดังกล่าวอาจจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่น ๆ แต่ในภาพรวมแล้วยังคงมีประสิทธิภาพต่ำ ในขณะที่ SuRW02 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Pyrucularia, F. oxysporum* และ *C. capsici* สูงสุด จึงได้นำทั้ง 2 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกไประบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาต่อไป อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาไอโซเลทอื่น ๆ ที่เหลือเพิ่มเติมด้วยวิธีการใหม่เพื่อขยายขอบเขตความเข้าใจในประสิทธิภาพที่แท้จริง ตัวอย่างเช่นไอโซเลท Su2S217 ที่ยับยั้งเชื้อได้ทุกชนิด ถึงแม้จะยับยั้งเชื้อบางชนิดได้ไม่ถึง 50% แต่ก็อาจจะมีศักยภาพมากพอ ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีความสามารถในการควบคุมโรคแบบ broad spectrum ได้

Table 2 Dual culture results of all isolates against plant pathogenic fungi.

Isolate	*Pythium* sp.		*F. oxysporum*		*C. capsica*		*P. oryzae*	
	CD (cm) *	%Inhibition*	CD (cm) *	Inhibition%*	CD (cm) *	Inhibition%*	CD (cm) *	Inhibition%*
Control	9.00a	ND **	7.14ab	ND**	5.95a	ND	6.52a	ND
LbRW03	9.00a	0.00c	68.19***		1.99c	66.60a	2.66b	59.46b
SuRW01	9.00a	0.00c	68.33***		2.07c	65.13a	2.40c	63.29a
SuRW02	9.00a	0.00c	71.94***		1.86c	68.70a	2.37c	63.67a
Su2S217	4.85c	46.11a	3.74c	47.63a	2.02c	65.97a	66.80****	
BaR917	9.00a	0.00c	7.09ab	0.70b	2.02c	65.97a	61.11****	
BaS417	5.50b	38.89b	6.96b	2.45b	1.80c	69.75a	64.86****	
SuR317	9.00a	0.00c	7.30a	0.00b	4.56b	23.32b	66.66****	

* Different letters in the same column represent statistical different; P=0.05, ** Not determined, *** Results of these isolates have already reported by Prasom et al. (2017), **** Results of these isolates have already reported by Changmuang et al. (2017), CD: Colony diameter.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3 Conclusion of dual culture result.

Isolate	*Pythium* sp. inhibition	*F. oxysporum* inhibition	*C. capsici* inhibition	*P. oryzae* inhibition
LbRW03	-	+	+	+
SurW01	-	+	+	+
SurW02	-	+	+	+
SuS217	-	-	+	+
BaR917	-	-	+	+
BaS417	-	-	+	+
SuR317	-	-	-	+

* + indicated the inhibition of pathogen growth more than 50%; - indicated no inhibition or inhibition percent lower than 50%.

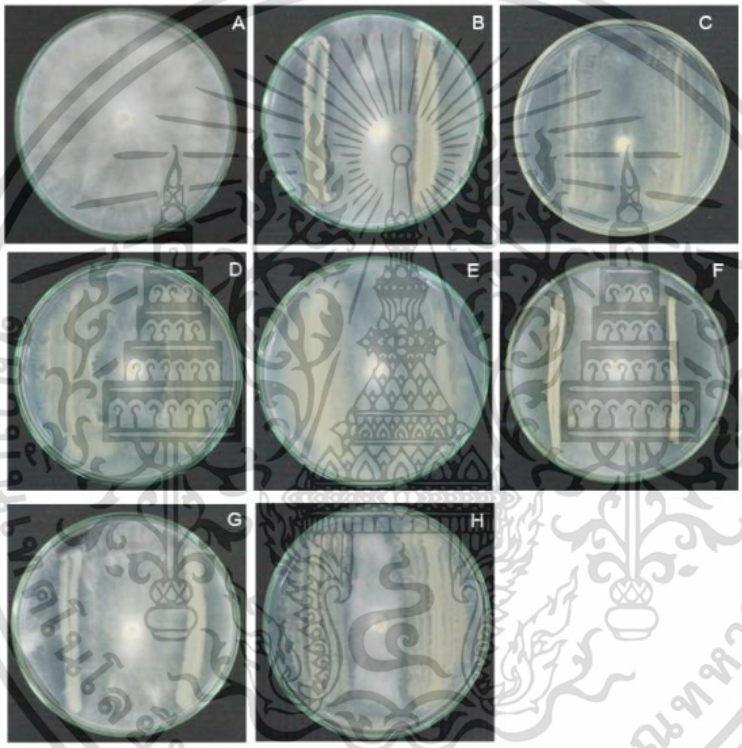

Figure 1 Effect of endophytic bacteria on *Pythium* sp. growth; A: Control; B: LbRW03; C: SuRW01; D: SuRW02; E: Su2S217; F: BaR917; G: SuR317 and H: BaS417.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

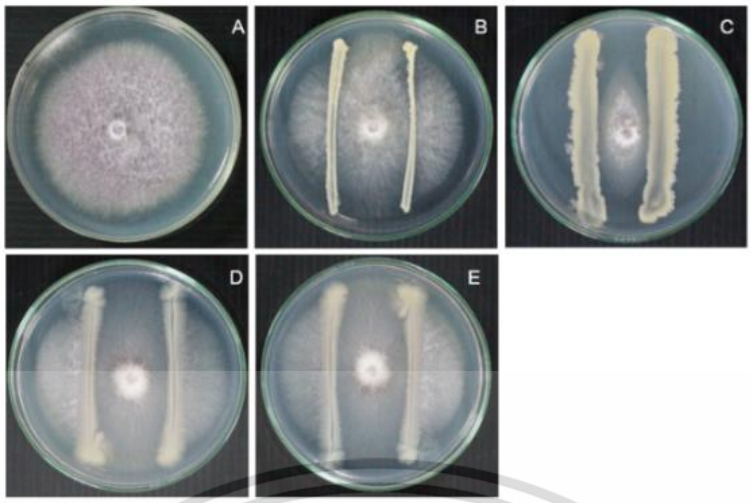

Figure 2 Effect of endophytic bacteria on *Fusarium* sp. growth. A: Control; B: BaR917; C: Su2S217; D: BaS417 and E: SuR317.

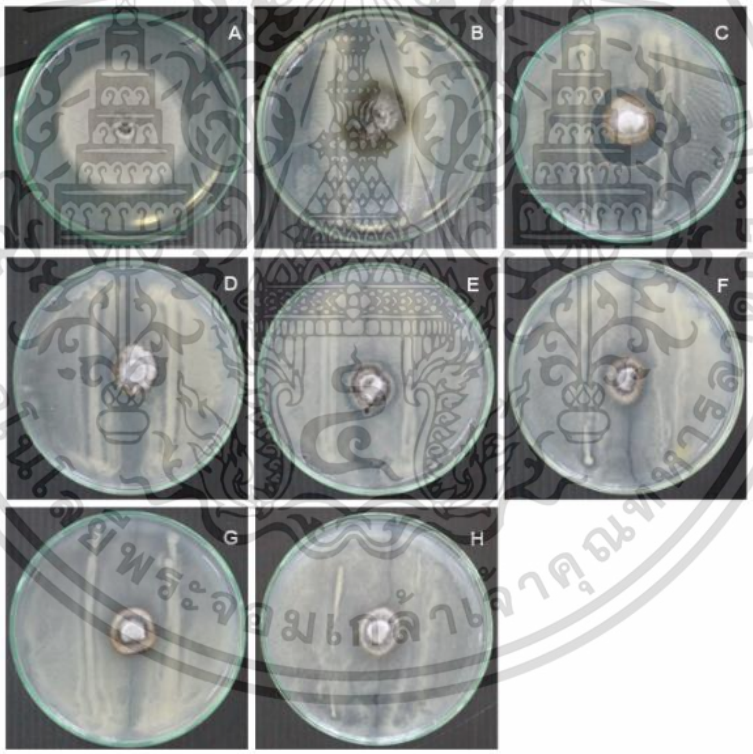

Figure 3 Effect of endophytic bacteria on *Colletotrichum capsici* growth. A: Control; B: SuR317; C: SuRW01; D: SuRW02; E: LbRW03; F: BaS417; G: Su2S217 and H: BaR917.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

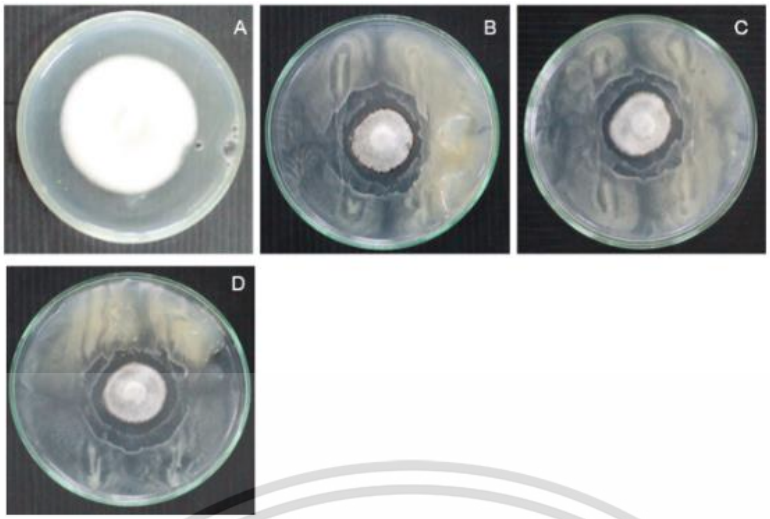

Figure 4 Effect of endophytic bacteria on *Pyricularia* oryzae growth. A: Control; B: LbRW03; C: SuRW01and D: SuRW02.

ผลการระบุสายพันธุ์ไอโซเลทสำคัญ (BaR917 และ SuRw02) ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บน 0.5% agarose gel จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ1500 bp (Figure 5) หลังจากนั้นส่งไปวิเคราะห์ลำดับที่บริษัท Bionics โดยหลังจากทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์บนตำแหน่ง 16s rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud และทำแผนภูมิแสดงสายวิวัฒนาการ พบว่า BaR917 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus altitudinis* อยู่ที่ 99.85% (Table 4, Figure 6) ในขณะที่ SuRw02 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingobacterium* โดยคล้ายคลึงกับ *S. thalpophilum* มากที่สุดที่ 99.88% (Table 4, Figure 7) ซึ่งเคยมีรายงานว่าทั้ง 2 สกุลเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และมีความสามารถในการควบคุมโรคพืช (Figure 6) (Patel et al., 2018) ตัวอย่างในสกุล *Bacillus* spp. เช่น *B. stratosphericus* ที่สามารถควบคุมโรคเน่าในโสมที่เกิดจากเชื้อ *Cladosporium* และ *Fusarium* (Durairaj et al., 2018) *B. altitudinis* ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Thanatephorus cucumeris* (teleomorph ของ *Rhizoctonia solani*) ในถั่วเขียว (Sunar et al., 2013) *B. aerius* ที่มีรายงานว่าสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Botrytis cinerea* (Shafi et al., 2017) เป็นต้น หรือสกุล *Sphingobacterium* เองก็เคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. ในระดับหนึ่งเช่นกัน (Sturz et al., 1999)

Table 4 Percent similarity of referenced species in this study.

Isolate	Ascension number	Species	Percent similarity
BaR917	ASJC01000029	*Bacillus altitudinis*	99.85
SuRW02	AJ438177	*Sphingobacterium thalpophilum*	99.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

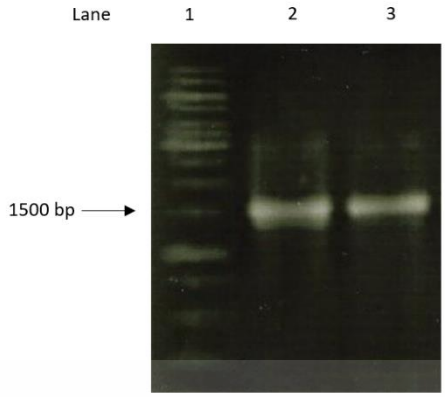

Figure 5 The primer pair 27F and 1492R were used to amplify a 1500 bp DNA product that is characteristic of bacterial 16s rRNA gene. Lane 1: 1 kb DNA ladder; Lane 2: PCR product from BaR917; Lane 3: PCR product from SuRW02.

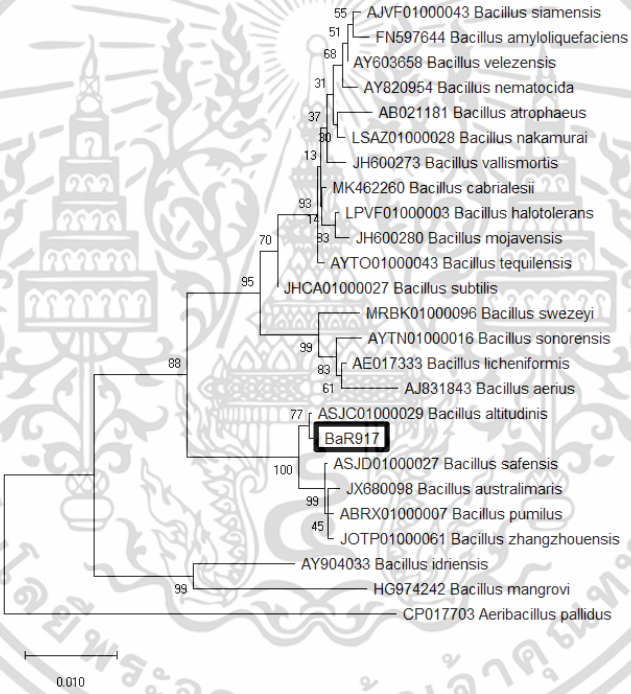

Figure 6 Phylogenetic tree of BaR917 using Neighbor-joining method based on 16s rRNA sequences with boostraps values at 1000. A number on each branch indicated bootstrap percentage. *Aeribacillus pallidus* was used as outgroup.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

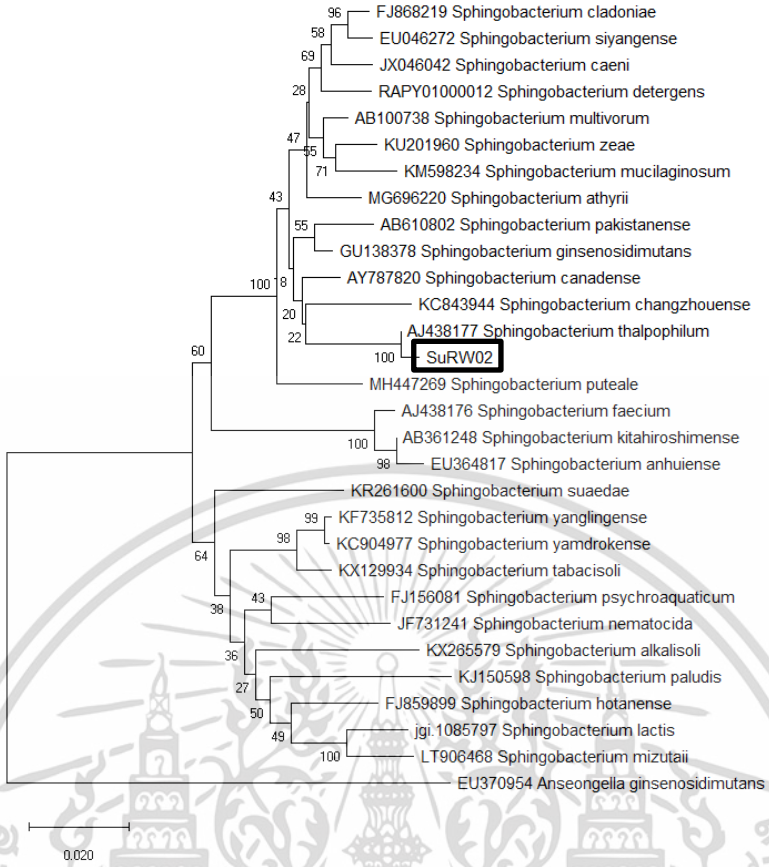

Figure 7 Phylogenetic tree of SuRW02 using Neighbor-joining method based on 16s rRNA sequences with boostraps values at 1000. A number on each branch indicated bootstrap percentage. *Anseongella ginsenosidimutans* was used as outgroup.

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ เมื่อนำเชื้อไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ไปทดสอบกับเชื้อ *P. oryzae* สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ 59.46, 63.29 และ 63.67% ตามลำดับ ไอโซเลท SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ 47.63, 0.70, 2.45 และ 0.00% ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อนำไอโซเลททั้งหมด คือ LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ไปทดสอบกับเชื้อ *Pythium* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ที่ 0.00, 0.00, 0.00, 46.11, 0.00, 38.89 และ 0.00% ตามลำดับ และ *C. capsici* ที่ 66.60, 65.13, 68.70, 65.97, 65.97, 69.75 และ 23.32% ตามลำดับ เมื่อนำ 2 ไอโซเลทสำคัญ คือ BaR917 และ SuRW02 ไประบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. และ *Sphingobacterium thalpophilum* ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

Aslam, Z., Yasir, M., Yoon, H. S., Jeon, C. O., and Chung, Y. R. 2013. Diversity of the bacterial community in the rice rhizosphere managed under conventional and no-tillage practices. *Journal of Microbiology* 51(6): 747-756.

Changmuang, T., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. Isolation and screening of endophytic bacteria against rice blast pathogen. *International Journal of Agricultural Technology* 13(7.1): 1231-1244.

Clavaud, C., Aimanianda, V., and Latge, J. P. 2009. Organization of fungal, oomycete and lichen (1,3)-β-glucans. In *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, A, Bacic., G. Fincher, and B. Stone. eds. pp. 387-424. Australia: Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H., and Oh, B. T. 2018. An investigation of biocontrol Activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. *Biological Control* 125: 138-146.

Feltham, R. K. A., Power, A. K., Pell, P. A., and Sneath, P. H. A. 1978. A simple method for storage of bacteria at - 76°C. *Journal of Applied Bacteriology* 44(2): 313-316.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2009. How to feed the world in 2050. http://www.ricethailand.go.th/ rkb3/title-index.php-file=content.php&id=74.html (October 2019).

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., and Toulmin, C. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812-818.

Patel, P., Shah, R., Joshi, B., and Ramar, K. 2018. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. *Biotechnology Reports* (21): e00317.

Prasom, P., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. *In vitro* study of endophytic bacteria isolated from tomato plant against *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Agricultural Technology* 13(7.1): 1217-1230.

Rosenblueth, M., and Martínez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(8): 827-837.

Senthilkumar, M., Swarnalakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y. K., and Annapurna, K. 2008. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology* 58(4): 288-293.

Shafi, J., Mingshan, J., Zhiqiu, Q., Xiuwei, L., Zumin, G., Xinghai, L., Yang, Z., Peiwen, Q., Hongzhe, T., Wunan, C., and Kai, W. 2017. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. *Archives of Biological Sciences* 69: 469-480.

Sturz, A. J., Christie, B. R., Matheson, B. G., Arsenault, W. J., and Buchanan, N. A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* 48(3): 360-369.

Sunar, K., Dey, P., Chakraborty, U., and Chakraborty, B. 2013. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiology* 55(1): 91-104.

Wang, H., Wen, K., Zhao, X., Wang, X., Li, A., and Hong, H. 2009. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection* 28(8): 634-639.

Wilson, K. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. eds. New York: John Wiley & Sons Incorporation.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., and Gu, Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* 101(1): 292-297.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 30 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้