การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในแนวกว้างและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Screening for broad spectrum antagonistic bacteria to control the causal agents of anthracnose disease and promote plant growth

ยลธิดา ชนะชัย[1,2]และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล[1,2*]

Yontida Chanachia[1,2] and Petcharat Thummabenjapone[1,2*]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในแนวกว้าง และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย ดำเนินการวิจัยโดยนำเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus* spp. *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba037N, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-PSK, *Bacillus*-BS, *Bacillus*-BK, *Streptomyces*-PR15 และ*Streptomyces*-PR87 มาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, C.capsici* และ *C. acutatum* โดยวิธี dual culture bioassay พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-BK สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.ทั้ง 3 สปีชีส์ได้อย่างชัดเจน เส้นใยของเชื้อราบริเวณที่เกิดแนวยับยั้งมีลักษณะบวมพอง เส้นใยเสียสภาพแตกหัก ส่วน *Bacillus*-Ba037N และ Bacillus-PSK ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* spp. บางไอโซเลตได้เพียงเล็กน้อย เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 11 ไอโซเลตสามารถสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) ได้มีค่าตั้งแต่ 6.23-19.42 µg/ml โดยไอโซเลต *Bacillus*-PSK มีค่า IAA สูงที่สุดเท่ากับ 19.42 µg/mlและมี 9 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-BK โดยเชื้อ *Streptomyces*-PR87 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตที่ผสมอยู่ในอาหารทดสอบได้มากที่สุดมีค่า solubilization index (S.I) เท่ากับ 3.5 รองลงมาคือ *Bacillus*-NTS3 เท่ากับ 3.368 จากผลการวิจัยได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้หลายสปีชีส์และมีกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีมากไว้ 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029 และ *Bacillus*-NTS3 สำหรับประเมินประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรกโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริกและการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในแปลงปลูกต่อไป

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี โรคพริก จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

Received August 1, 2019

Accepted October 2, 2019

[1]สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Dept. of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, KhonKaen University

[2]ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, KhonKaen University

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th

ABSTRACT: The objective of this research aimed to screen the broad spectrum antagonistic bacteria which have capability to enhance the plant growth too. The *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba037N, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-PSK, *Bacillus*-BS and *Bacillus*-BK and *Streptomyces*-PR15 and *Streptomyces*-PR87 were investigated. Dual culture bioassay was tested with *Colletotrichum gloeosporioides, C. capsici* and *C. acutatum*, the causal agent of chilli anthracnose disease. The results showed that 9 isolates including *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-BS and *Bacillus*-BK strongly inhibited the growth of fungal pathogens. The inhibited mycelium shown as abnormal hypha, thickened cell wall and swollen cell were observed under microscopy. The *Bacillus*-037N and *Bacillus*-PSK inhibited some isolates of *Colletotrichum* spp. with low inhibition percentage. Assessment for production of indole-3-acetic acid (IAA) and phosphate solubilization capabilities were investigated. All antagonistic isolates (9 isolates) produced IAA range from 6.23-19.42 µg / ml. The highest IAA value was produced by *Bacillus*-PSK at 19.42 µg / ml. Only 9 isolates showed phosphate solubility activity, e.g. *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-BS and *Bacillus*-BK. The *Streptomyces*-PR87 was the best isolate for phosphate solubililization with 3.5 solubilization index (S.I), followed by *Bacillus*-NTS3 (3.368 S.I.). From this research, the four high potential candidates including *Streptomyces*-PR15, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029 and *Bacillus*-NTS were selected for further study for biological control of anthracnose disease and promote plant growth of chilli seedlings or plants.
Keywords: biological control, Chilli diseases, plant growth promoting bacteria, bacteria for phosphate solubilization,

บทนำ

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทยมีการเพาะปลูกในหลายประเทศทั่วโลก ประเทศไทยส่งออกพริกในรูปของพริกสดหรือแช่เย็น พริกบดหรือป่น พริกแห้ง เครื่องแกงสำเร็จรูป และซอสพริก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ปัญหาของการปลูกพริกที่มักพบคือ ปัญหาโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีรายงานการแพร่ระบาดมากในประเทศไทย 3 สปีชีส์ ได้แก่ *C.gloeosporioides, C. capsici* และ *C. acutatum* ส่งผลทำให้ผลผลิตพริกลดลงถึง 80% มีคุณภาพไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Suwannarat et al.,2017) เกษตรกรมีการใช้สารเคมีกำจัดโรคแอนแทรคโนสกันอย่างกว้างขวาง เช่น เบนโนมิล (benomyl), คาร์เบนดาซิม (carbendazim) และอะซอกซีสโตรบิน (azoxystrobin) เป็นต้นและมีการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชมากเกินความจำเป็นและใช้ไม่ถูกวิธี เนื่องจากขาดความรู้และทักษะการจัดการโรคที่ถูกต้อง เพื่อเป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมีเกษตรที่มีพิษตกค้างในการผลิตพริก ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องหาแนวทางการจัดการโรคพืชที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. และ *Pseudomonas fluorescens* มีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และมีความสามารถในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ (Barea et al., 2005) รายงานพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญ เช่น *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของพืชวงศ์แตง (ภัทรกร, 2548) ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก (รัติกาล, 2558) นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *B. amyloliquefaciens, B. subtilis, B. pasteurii, B. cereus, B.pumilus, B. mycoides* และ*B. sphaericus* ที่มีบทบาทในการชักนำความต้านทานที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ของพืชกับเชื้อจุลินทรีย์ และยังมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Choudhary and Johri, 2009)

เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจัดอยู่ในกลุ่ม plant growth promoting bacteria (PGPB) สามารถพบได้ทั้งที่อยู่รอบผิวรากพืช หรือผิวใบพืช ตลอดจนอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชซึ่งมีแบคทีเรียที่โดดเด่นอยู่ 2 จีนัส คือ *Streptomyces* spp.เป็นสมาชิกในกลุ่ม Actinobacteria และ *Bacillus*

spp.อยู่ในกลุ่ม Firmicutes มีบทบาทหลักในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชประเภทต่างๆ เชื้อที่เป็น PGPB ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสังเคราะห์สารฮอร์โมนพืช เช่น กลุ่มออกซิน ไซโตไคนิน และ จิบเบอร์เรลลิน การช่วยละลายและเคลื่อนย้ายฟอสเฟตในต้นพืช การสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และการชักนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขึ้นในต้นพืชที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดเช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin (Shoda, 2000)

งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกได้ในแนวกว้าง (broad spectrum) และเป็นจุลินทรีย์ที่มีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดโรคที่สำคัญของพริก และช่วยลดสัดส่วนการใช้ปุ๋ยเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญ เติบโตของพริก เป็นทางเลือกใหม่ของเกษตรกรที่จะใช้ควบคุมโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตพริก/เมล็ดพันธุ์ในการผลิตพริก/เมล็ดพันธุ์พริกที่ปลอดภัยหรือการผลิตพริกแบบอินทรีย์

วิธีการศึกษา

1) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โดยเทคนิค dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาทดสอบ 11 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 เลี้ยงบนอาหาร AGMA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ส่วน *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba037N, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-PSK, *Bacillus*-BS และ*Bacillus*-BK เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

นำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่แยกได้จากผลพริก ได้แก่ *C. acutatum, C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จำนวน 7 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วันจึงนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามเทคนิค dual culture bioassay โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นบริเวณที่มีเชื้อ *Bacillus* spp. เจริญอยู่บนอาหาร NA และ *Streptomyces* spp. เจริญอยู่บนอาหาร AGMA นำไปวางบนอาหาร PDA จานใหม่ และใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA นำไปวางบนอาหาร PDA โดยวางให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ด้านตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่วางห่างกัน 4 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่วางเฉพาะชิ้นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของรัศมีเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) ตามสูตรการคำนวณ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Kabir et al., 2012)

PIRG = (R1-R2)/R1x100

โดย R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในกรรมวิธีควบคุม

R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในกรรมวิธีที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลต

2) กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช

ก. การตรวจสอบการสังเคราะห์indole-3-acetic acid (IAA) โดยใช้ Salkowski's reagent

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร AGMA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วันหลังจากบ่ม ใช้cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบนอาหาร AGMA ที่มีเชื้อ *Streptomyces* spp.เจริญอยู่ แล้วจึงย้ายชิ้นวุ้นลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร AGMB 5 มล. ที่ผสม 2 mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเชื้อ *Bacillus spp.* ไอโซเลตต่างๆ เลี้ยงบนอาหาร NA นาน 2 วันย้าย single colony ลงในอาหาร NB ที่เติม 2 mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 2 วัน ที่อุณหภูมิห้องนำน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อจาก

หลอดที่เพาะเลี้ยงไว้มาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีดัดแปลงจาก Khamna et al. (2010) ทำการดูดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (bacterial broth culture) ปริมาณ 1.5 มล.ใส่ใน micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ทำให้เซลล์ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วจึงดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ และเติม 85% orthophosphoric acid จำนวน 2 หยด พร้อมเขย่า หลังจากนั้นเติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วจึงบ่มในที่มืด นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความเข้มสีด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร โดยหากมี IAA สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู และนำค่า OD เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ IAA วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 6 ซ้ำ

ข. ตรวจสอบกิจกรรมละลายฟอสเฟต

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดโดยวิธี steak plate บนอาหารทดสอบให้มีขนาด 0.5x4 ซม. โดยใช้อาหาร Pikovskaya'sagar ที่ผสม 0.5% insoluble tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) (Pikovskaya,1948) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ถ้ามีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้น อาหารบริเวณขอบของโคโลนีจะเปลี่ยนจากลักษณะขุ่นเป็นวงใส (halo zone) ล้อมรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียไอโซเลตนั้นๆ มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟต แล้วจึงประเมินค่า solubilization index (S.I.) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ

$$\text{solubilization index (S.I.)} = \frac{\text{(ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี+วงใส)}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี}}$$

ผลการศึกษา

1)การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้กว้างขวาง

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 9 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-BK สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลต ได้อย่างมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เช่น *C. gloeosporioides* (Glo-c8) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ*Bacillus*-BK (70.63%), *Bacillus*-S32 (68.75%), *Bacillus*-BS (67.09%), *Bacillus*-Ba033 (66.67%), *Bacillus*-NTS3 (66.25%), *Bacillus*-MS4 (66.25%), *Bacillus*-Ba029 (63.54%), *Streptomyces*-PR15 (50%) และ *Streptomyces*-PR87 (50%) ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. capsici* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่น *C. acutatum* (acu10) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ *Bacillus*-BS (60.5%), *Bacillus*-MS4 (54.5%), *Bacillus*-BK (50.5%), *Bacillus*-Ba029 (48.25%), *Bacillus*-NTS3 (39.5%), *Bacillus*- Ba033 (36.5%) และ *Streptomyces*-PR15 (39%) และเชื้อ *C. capsici* (Cap5) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ *Bacillus*-NTS3 (41.88%), *Streptomyces*-PR15 (38.12%), *Bacillus*-MS4 (34.38%), *Bacillus*-S32 (32.50%), *Bacillus*-BK (30.63%), *Bacillus*-Ba029 (30%), *Bacillus*-BS (27.50%) และ *Bacillus*-Ba033 (25%) เมื่อนำเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum* spp. บริเวณที่เป็นแนวยับยั้งการเจริญของเส้นใยหลังจากบ่มเชื้อ 7 วันมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยเชื้อรามีลักษณะบวมฟอง เส้นใยเสียสภาพจากเดิม เซลล์สั้นลงและหงิกงอหยุดการเจริญ (Fig.5) ดังนั้นจึงจัดได้ว่าเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลต มีความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์กว้างในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก (broad spectrum antagonist) ส่วนเชื้อ *Bacillus*-Ba037N และ *Bacillus*-PSK ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้เพียงบางไอโซเลตเท่านั้น (Table 1 , Fig. 1,Fig. 2, Fig. 3) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ผิดปกติไปจากกรรมวิธีควบคุม (Fig. 5)

Table 1 Inhibition percentage of mycelium growth *C. acutatum* (Acu3, Acu10),*C. gloeosporioides* (Glo-c3, Glo 7, Glo-c8) and *C. capsici* (Cap5, Cap8, Cap9) isolates by antagonistic *Streptomyces* spp or *Bacillus* spp. isolates colony as determined by dual culture bioassay on PDA.

antagonist	inhibition of mycelium growth (%)[1/]							
	Acu3	Acu10	Glo-c3	Glo 7	Glo-c8	Cap 5	Cap8	Cap9
Streptomyces-PR 15	17.50e	39.00cd	46.13c	44.72c	50.00d	38.12ab	40.00bc	30.50cde
Streptomyces-PR 87	10.62e	27.50ef	45.45c	34.44d	50.00d	11.00d	37.50c	16.00g
Bacillus-Ba033	38.12bc	36.50de	64.32a	56.94b	66.67b	25.00c	44.00b	26.00def
Bacillus-Ba037N	0.00f	15.00g	7.96e	32.77d	33.33e	12.50d	7.00d	0.00h
Bacillus-Ba029	28.12d	48.25bc	59.10b	58.05ab	63.54c	30.00bc	42.00bc	38.00abc
Bacillus-S32	14.37e	19.50fg	63.64a	44.44c	68.75ab	32.50abc	42.00bc	23.00efg
Bacillus-PSK	0.00f	10.00gh	27.27d	30.83d	33.33e	0.00e	0.00e	17.00fg
Bacillus-BS	40.62 ab	60.50a	63.64a	54.16b	67.09b	27.50bc	43.00b	45.00a
Bacillus-BK	46.87 a	50.50ab	62.05ab	61.39a	70.63a	30.63abc	53.00a	41.50ab
Bacillus-NTS3	31.87 cd	39.50cd	61.37ab	57.22b	66.25bc	41.88a	52.00a	33.50bcd
Bacillus-MS4	35.62bcd	54.00ab	62.73a	55.00b	66.25bc	34.38abc	51.50a	38.00abc
control	0.00 f	0.00h	0.00f	0.00e	0.00f	0.00e	0.00e	0.00h
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	26.54	22.52	5.24	6.27	3.79	35.91	26.04	26.04

[1/] Means followed by the same later in the same column were not significantly different at P≤0.05 (*) and P ≤ 0.01 (**) by LSD

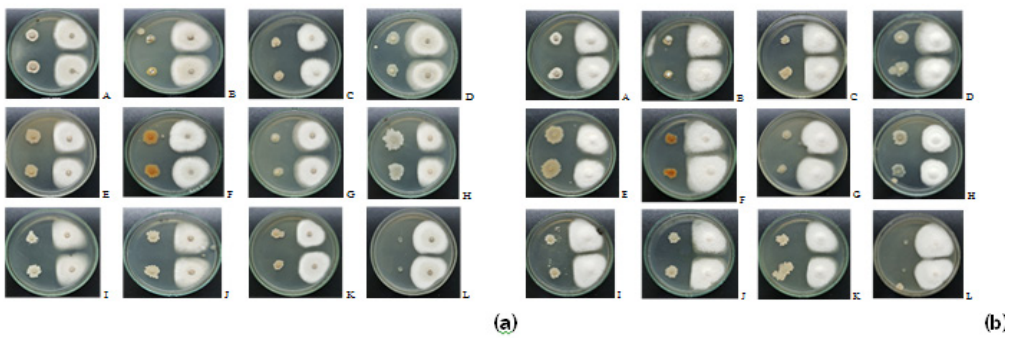

Fig. 1 Dual culture assay of *C. acutatum* (Acu3)(a) and *C. acutatum* (Acu 10)(b) by antagonistic bacteria isolates. (A) *Streptomyces* -PR15, (B) *Streptomyces* –PR87 (C) *Bacillus* –Ba033, (D) *Bacillus* –Ba037N, (E) *Bacillus*- Ba029 ,(F) *Bacillus* -S32, (G) *Bacillus* -PSK, (H) *Bacillus* -BS, (I) *Bacillus* -BK, (J) *Bacillus*- NTS3, (K) *Bacillus* -MS4 and (L) Control.Photographs were taken after incubating at 27 °C for 7 d.

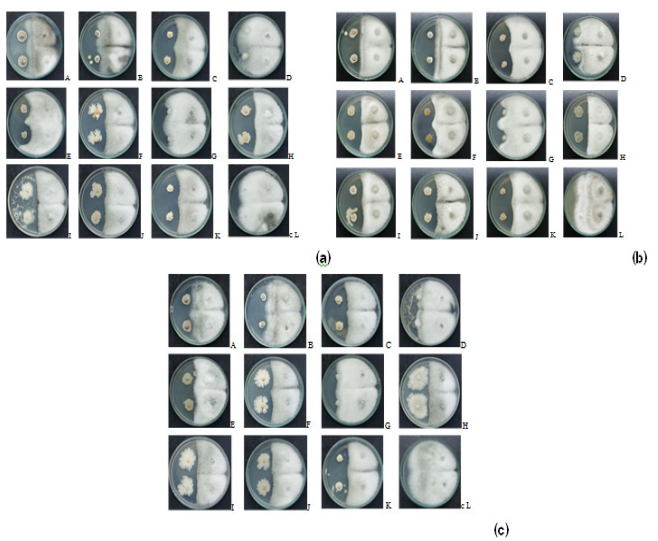

Fig. 2 Dual culture assay of *C. gloeosporioides*(Glo-c3) (a), *C. gloeosporioides*(Glo 7) (b) and *C. gloeosporioides* (Glo-c8) (c) by antagonistic bacteria isolates. (A) *Streptomyces*-PR15, (B) *Streptomyces*–PR87 (C) *Bacillus*-Ba033, (D) *Bacillus*–Ba037N ,(E) *Bacillus*-Ba029 ,(F) *Bacillus* -S32, (G) *Bacillus* -PSK, (H) *Bacillus* -BS, (I) *Bacillus*-BK, (J) *Bacillus*- NTS3 ,(K) *Bacillus* -MS4 and (L) Control . Photographs were taken after incubating at 27 °C for 7 d.

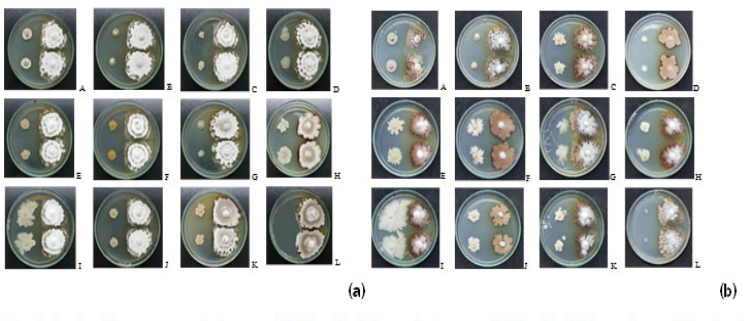

Fig. 3 Dual culture assay of *C. capsici* (Cap 9) (a) and *C. capsici* (Cap5) (b) by antagonistic bacteria isolates. (A) *Streptomyces* -PR15, (B) *Streptomyces* –PR87, (C) *Bacillus* –Ba033, (D) *Bacillus* –Ba037N ,(E) *Bacillus* -Ba029 ,(F) *Bacillus* -S32, (G) *Bacillus* -PSK, (H) *Bacillus* -BS, (I) *Bacillus* -BK, (J) *Bacillus*- NTS3, (K) *Bacillus* -MS4 and (L) Control. Photographs were taken after incubating at 27 °C for 7 d

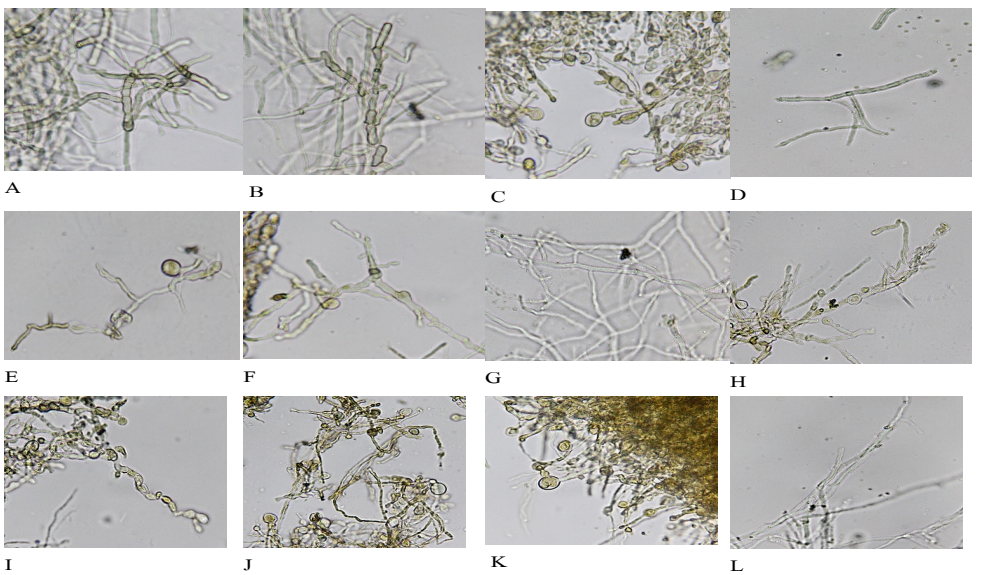

Fig. 4 Light microscopic observations of *Colletotrichum* mycelium at inhibition zone by antagonistic isolates (A-K) compared with normal mycelium in control treatment (L). (A) *Streptomyces* -PR15, (B) *Streptomyces*–PR87 (C) *Bacillus*–Ba033, (D) *Bacillus* –Ba037N ,(E) *Bacillus* -Ba029 ,(F) *Bacillus* -S32, (G) *Bacillus* -PSK, (H) *Bacillus* -BS, (I) *Bacillus* -BK, (J) *Bacillus*- NTS3, (K) *Bacillus* -MS4 and (L)Control.

2) กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช

ก. การตรวจสอบการสังเคราะห์ IAA โดยใช้ Salkowski's reagent

เชื้อ *Bacillus* spp.ทั้ง 9 ไอโซเลต สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ มีค่าตั้งแต่ 6.23-19.42 ไมโครกรัมโดยไอโซเลต *Bacillus*-PSK มีค่า IAA สูงที่สุด เท่ากับ 19.42 µg/ml รองลงมาคือ *Bacillus*-Ba037N, *Bacillus*-BS, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-S32, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-Ba033 และ *Bacillus*-BK ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. พบว่า *Streptomyces*-PR 87 มีค่า IAA เท่ากับ เท่ากับ 7.38 µg/ml รองลงมาคือ *Streptomyces* -PR 15 มีค่า 6.83 µg/ml (Table 2)

ข. ตรวจสอบกิจกรรมละลายฟอสเฟต

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*PR87 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตที่ผสมอยู่ในอาหารทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพดีที่สุด เกิดบริเวณวงใสได้กว้างและชัดเจนที่สุดมีค่า solubilization index (S.I) เท่ากับ 3.5 รองลงมาคือ *Bacillus*-NTS3, *Streptomyces*-PR15, *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-S32 และ *Bacillus*-Ba029 มีค่าวงใส (S.I) เท่ากับ 3.368, 3.28, 3, 3.05 และ 2.92 ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-BK, *Bacillus*-BS และ *Bacillus*-MS4 มีค่าวงใส (S.I) เท่ากัน คือ 2.7 ปรากฏวงใสชัดเจนแต่มีบริเวณวงใสแคบ เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตต่างๆส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*-PSK และ *Bacillus*-Ba037N ไม่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Table2) (Fig. 5)

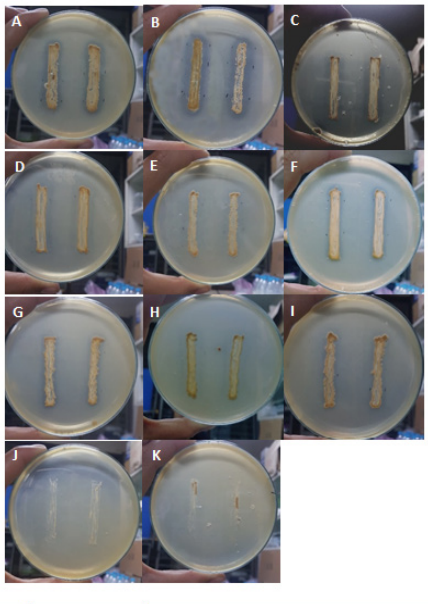

Fig. 5 Capability for Phosphate solubilization by antagonistic *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. after testing on Pikovskaya's agar media. Pikovskaya'sagar (A) *Streptomyces*-PR15, (B) *Streptomyces*-PR 87, (C) *Bacillus*-Ba033, (D) *Bacillus*-Ba029, (E) *Bacillus*-NTS3, (F) *Bacillus*–BK, (G) *Bacillus*-BS, (H) *Bacillus*-S32, (I) *Bacillus*-MS4, (J) *Bacillus*-PSK, (K) *Bacillus*-Ba037N

Table 2 Quantitative determination of IAA production and phosphate solubilization index of antagonistic *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp.

antagonist	IAA production[1/] (µg /ml)	Phosphate solubilization[1/] index (S.I)
Streptomyces -PR15	6.83 f	2.282 ab
Streptomyces -PR87	7.38 f	2.5 a
Bacillus-Ba033	7.16 f	2 c
Bacillus-Ba029	9.92 d	1.921cd
Bacillus-NTS3	8.66 e	2.368 a
Bacillus-BK	6.24 f	2.710 d
Bacillus-BS	12.5 c	1.736 d
Bacillus-S32	8.87 de	2.052bc
Bacillus-MS4	12.16 c	1.71 d
Bacillus-PSK	19.42 a	0 e
Bacillus-Ba037N	15.18 b	0 e
F-test	**	**
CV (%)	8.41	8.07

[1/] Means followed by the same later in the same column were not significantly different at P≤0.05 (*), P ≤ 0.01 (**) by LSD.

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-NTS3 และ *Streptomyces*-PR15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ได้ดีมาก และมีความสามารถในการสร้างสาร IAA และละลายฟอสเฟตได้มากเหมาะสมสำหรับการนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และการใช้ควบคุมโรคในระยะต้นกล้าและหลังย้ายปลูกในแปลงปลูกพืช รวมทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกได้ เชื้อ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 ยังมีผลการวิจัยที่ทดสอบมาก่อนหน้าโดย Rattikan et al. (2015) และ รัติกาล และเพชรรัตน์ (2555) พบว่ายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ 4 สปีชีส์ คือ *C. acutatum, C. coccodes, C. capsici* และ *C. gloeosporioides* และควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ของพริกได้ (รัติกาล, 2558; รัติกาลและคณะ, 2554) นอกเหนือจากการยับยั้งได้ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชวงศ์แตง และพริก-มะเขือ (เพชรรัตน์, 2545; ภัทรกร, 2548; อัศศิริ และ เพชรรัตน์, 2556) และส่งเสริมภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัส *Tobacco mosaic virus* ในพริก (วีรกรณ์, 2556) ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกไว้ (*Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029

และ *Bacillus*-NTS3) ยังมีบทบาทยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของพริก (เพชรรัตน์, 2562) จึงมีคุณสมบัติที่เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์กว้างมากขึ้นโดยควบคุมได้ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่สำคัญของพริก ในต่างประเทศมีรายงานวิจัยหลายรายงาน เช่น Amaresan et al. (2012) พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici*, *Sclerotium rolfsii* และ *Pythium* sp. ได้ การที่พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.และ *Streptomyces* spp. ในการวิจัยนี้ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆ ของเส้นใยเชื้อ น่าจะเกี่ยวข้องทั้งบทบาทการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเส้นใยหรือการงอกของสปอร์ *Colletotrichum* spp. และบทบาทของเอนไซม์ในกลุ่ม cellulolytic enzymes เช่นเดียวกับที่ Ashwini and Srividya (2013) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ chitinase, glucanase, และ cellulase ออกมาย่อยผนังของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เส้นใยมีลักษณะบวมพอง เส้นใยแตกหัก หยิกงอ

เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-NTS3 และ*Streptomyces*-PR15 สามารถผลิต IAA และละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชจะเอาไปใช้ได้ IAA อยู่ในกลุ่ม auxin ทำให้เซลล์ของรากพืชเกิดการยืดยาว มีผลต่อการแตกราก และช่วยส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (Buensanteai et al., 2013) ส่วนกลไกการละลายฟอสเฟตได้นั้นมีหลายกลไก เช่น เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ออกมานอกเซลล์และทำให้ pH รอบๆ เซลล์แบคทีเรียมี pH ลดลง การมีอิออนบวก H+ เพิ่มขึ้นส่งเสริมการสะสมของ NH_4^+ ทำให้เกิดการละลายของฟอสฟอรัส (Illmer and Schinner, 1995) เปลี่ยนแปลงรูปของฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ทำให้พืชนำฟอสเฟตไปใช้ได้ดีขึ้น Kang *et al*., (2014) รายงานพบว่า *Bacillus megaterium*mj1212 ผลิต malic และ quinic acid ออกมาละลายฟอสเฟตที่ผสมในอาหารทดสอบได้ นอกจากนี้ Sharma et al. (2013) ยังรายงานว่าการสะสมของ NH_4^+ภายในเซลล์ของแบคทีเรียยังเกิดขึ้นร่วมกับการปลดปล่อยโปรตอนออกมานอกเซลล์และทำให้เกิดการละลายฟอสฟอรัสโดยไม่ต้องมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมานอกเซลล์แบคทีเรีย

เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-Ba029, *Bacillus*-NTS3 และ *Streptomyces*-PR15 จึงมีศักยภาพสูงมากในการนำไปวิจัยและพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญของพริกตั้งแต่ระยะเพาะกล้าจนถึงการเพาะปลูกในแปลง ลดการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด และการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (biostimulant products) เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีบางชนิด ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับจัดการต้นพริกให้ได้ผลผลิตดีอย่างยั่งยืน สนับสนุนการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ดีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพริกปลอดภัยและพริกอินทรีย์ของประเทศไทยต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย(สกว.) ในโครงการวิจัยรหัส RDG6020029 โดยมี รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล เป็นหัวหน้าโครงการ ได้รับการอนุเคราะห์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยจากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และโรงเรือนปลูกพืชทดลองและห้องปฏิบัติการต่าง ของสายงานโรคพืชวิทยา สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. *Streptomyces* อีกมิติหนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. แก่นเกษตร 30: 20-27.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, 2562. โครงการประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์และวิธีการใช้เพื่อควบคุมโรคเมล็ดพันธุ์และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รัติกาล ยุทธศิลป์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2555. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichumcapsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก. แก่นเกษตร 40: 224-232.

รัติกาล ยุทธศิลป์ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อนันต์ หิรัญสาลี. 2554. การคัดเลือกไอโซเลต *Streptomyces* ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*). แก่นเกษตร 39: 219-224.

รัติกาล ยุทธศิลป์. 2558. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสและรากปมของพริกโดย *Streptomyces* spp. ปฏิปักษ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภัทรกร ภูริชินวุฒิ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล พิศาล ศิริธร วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และอัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2547. *Streptomyces* :ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Didymellabryoniae* และการสังเคราะห์ hydrolytic enzymes. หน้า 454-465 ในการสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 วันที่ 26-27 มกราคม 2547 ณ ห้องประชุมกวีจุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภัทรกร ภูริชินวุฒิ. 2548. พันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อ Streptomyces spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. citrulli และเชื้อรา *Didymella bryoniae*. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วีรกรณ์ แสงไสย์. 2556. บทบาทของ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิต้านทานโรคไวรัส TMV ของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศปี 2561. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อัศศิริ กลางสวัสดิ์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2556. วิธีการใช้ *Streptomyces*-PR87 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ. แก่นเกษตร 41: 205-212.

Amaresan, N.,V. Jayakumar., K. Kumar and N. Thajuddin. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. Ann Microbiol 62:805–810.

Ashwini, N. and S. Srividya. 2013. Potentiality of Bacillus subtilis as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. Biotech 4:127-136.

Barea, J.M., M.J.Pozo., A.Rosario and A.A. Concepcio. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. Experimental Botany; 56:1761–1778.

Buensanteai, N., M. Sompong., K. Thamnu., D. Athinuwat., A. Brauman and C. Plassard. 2013. The plant growth promoting bacterium Bacillus sp. CaSUT007 produces phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. African Journal of Microbiology Research 7: 4949-4954.

Choudhary, D.K. and B.N. Johri. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiol 164: 493-513.

Kabir, L., W. K. Sang., S.K. Yun and S.L. Youn. 2012. Application of Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Effect and Biocontrol of Anthracnose Caused by *Colltotrichumacutatum* on Pepper. Mycobiology 40: 244-251.

Kang, S.M., R. Radhakrishnan., Y.H. You., G.J. Joo., I.J. Lee., K.E. Lee and J.H. Kim. 2014. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contentsto Promote Mustard Plant Growth. Indian Journal Microbiol 54:427–433.

Khamna, S., A .Yokota., J.F. Peberdy and S. Lumyong. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated

from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Biological Sciences 4: 23-32.

Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27: 257-263.

Pikovskaya, R.I . 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologiya;17 :362–370.

Rattikan, Y., P. Thummabenjapone and A. Hiransalee. 2015. Antagonistic *Streptomyces* selection to broad spectrum for biological control of *Colletotrichum* spp., causal agent of anthracnose in Chilli. Journal of Pure and Applied Microbiology 9:2705.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. J. Bioscience and Bioengineering 89: 515-521.

Suwannarat, S., S.Steinkellner., P. Songkumarn and S. Sangchote.2017. Diversity of *Colletotrichum* spp. isolated from chili pepper fruit exhibiting symptoms of anthracnose in Thailand. Mycological Progress 16: 677–686

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficieencyin agriculture soil.Springerplus 2: 587-600.