วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก

Screening of antagonistic bacteria for control bacterial wilt disease and promote growth of pepper seedling

ทวินันท์ บางขาม[1,2] และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล[2,3]*

Thawinan Bangkham[1,2] and Petcharat Thummabenjapone[2,3]*

[1] *สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[1] *Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, KhonKaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*
[2] *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพ ฯ 10900*
[2] *Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand*
[3] *คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ. เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002*
[3] *Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Mittraphap road, Muang Khon Kaen, Khon Kaen 40002, Thailand*

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก นำเชื้อ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87 และ *Bacillus* spp. จำนวน 34 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* (biovar 3 และ 4) โดยเทคนิค dual culture bioassay พบว่า ทั้งเชื้อ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้อย่างชัดเจนทุกไอโซเลต ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้มากที่สุด ได้แก่ *Bacillus*-Ba046, Ba032, Ba028, Ba033 และ NTS3 มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 26.53-34.10 มม. เชื้อปฏิปักษ์ 22 ไอโซเลต สังเคราะห์ Indole 3-acetic Acid (IAA) ได้ในปริมาณ 3.26 - 17.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba046, *Bacillus*-NTS3 และ *Bacillus*-Ba033 มาทดสอบกับเมล็ดพริกโดยวิธี blotter test พบว่า การแช่เมล็ดพริกในเซลล์แขวนลอยเชื้อปฏิปักษ์เข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนเพาะไม่มีผลเชิงลบต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก แต่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริกที่อายุ 21 วันหลังเพาะได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ตรวจสอบการเป็นเอนโดไฟต์ของ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าเป็นเอนโดไฟต์อยู่ได้ทั้งภายในเนื้อเยื่อส่วนราก ลำต้น และใบของต้นกล้าพริก เมื่อประเมินการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า กรรมวิธีใช้ *Bacillus*-NTS3 ควบคุมโรคได้ดีที่สุด มีการเกิดโรค 40.00 % และดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำ 31.67 % รองลงมาคือ *Streptomyces*-PR87 มีการเกิดโรค 53.33% และดัชนีความรุนแรงของโรค 25 % ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *R. solanacearum* เพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 100% และดัชนีความรุนแรงของโรคที่ 83.33 %

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี; *Ralstonia solanacearum*; โรคเหี่ยวเขียว; แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช

ABSTRACT: The objective of this research was to screen the antagonistic bacteria to control bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* and promote the growth of pepper seedling. The *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87 and 34 isolates of *Bacillus* spp. were screened for inhibition the growth of *R. solanacearum* (biovar 3 and 4) by dual culture bioassay. The result showed that both of *Streptomyces* isolates inhibited the growth of all tested *R. solanacearum* isolates. For antagonistic *Bacillus* spp., *Bacillus*-Ba046, *Bacillus*-Ba032, *Bacillus*-Ba028, *Bacillus*-Ba033 and *Bacillus*-NTS3 strongly inhibited the growth of tested pathogen isolates with

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th

Received: date; March 25, 2021 Accepted: date; May 31, 2021 Published: date; December 5, 2021

diameter of clear zone of 26.53 - 34.10 mm. The 22 isolates of tested antagonistic bacteria produced IAA ranking from 3.26-17.86 microgram/milliliter. The *Streptomyces*-PR87 and *Bacillus*-Ba046, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-Ba033 were selected for further studies in laboratory and green house. Soaking pepper seeds in cell suspension of tested antagonistic bacteria at $1x10^8$ cfu/ml for 1 hr. prior blotter test did not had negative effect to seed germination percentage. However, the growth of seedling was significantly promoted by tested antagonistic bacteria. The endophytic capability was assessed. The *Bacillus*-Ba046, *Bacillus*-NTS3 and *Bacillus*-Ba033 were behaved as endophytic bacteria which located internal of root, shoot and leaf tissues of pepper seedlings. For testing ability to control bacterial wilt disease in green house, the *Bacillus*-NTS3 was highly reduced disease incidence and disease severity index as 40.00 and 31.67 %, respectively. The *Streptomyces*-PR87 treatment showed 53.33 % of disease plant and 25 % for disease severity index, while control treatment showed 100% of disease incidence and 83.33 % of disease severity index.

Keyword: biological control; *Ralstonia solanacearum*; bacterial wilt disease; plant growth promoting bacteria

บทนำ

โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ทำความเสียหายให้กับการผลิตพริกและพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง มะเขือ งา และยาสูบ (Hayward, 1991; Vanitha et al., 2009) การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมียังไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคอยู่ในดินและสารเคมีกำจัดเชื้อราที่มีจำหน่ายส่วนใหญ่ไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ ต้องใช้สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ แต่สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีราคาแพงและไม่แนะนำให้ใช้ควบคุมโรคพืช ทำให้มีข้อจำกัดในด้านใช้สารเคมีควบคุมโรค การคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรคนี้ก็ยังมีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อสาเหตุโรค *R. solanacearum* ที่พบส่วนใหญ่ในประเทศไทยจัดอยู่ใน biovar 3 และ biovar 4 แนวทางการควบคุมโรคนี้โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solacearum* ได้กว้างทั้ง biovar 3 และ biovar 4 และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยกระตุ้นต้นพืชให้แข็งแรงไปพร้อมกันจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ยั่งยืนสำหรับการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริก และพืชอื่น ๆ โดยกลุ่มเชื้อปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพมากคือ แบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟต์ (endophytes) มีความสามารถทั้งในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มผลผลิตพืช โดยผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น ทำให้พืชไม่ขาดธาตุฟอสฟอรัสเนื่องจากปล่อยเอนไซม์ออกมาช่วยละลายฟอสเฟตที่ถูกตรึงไว้ในดินให้ละลายออกมาทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้ ช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้พืชเอาไปใช้ในการเจริญเติบโตของพืชได้ และยังมีการนำไปใช้กำจัดของเสียที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมรอบต้นพืชหรือในนิเวศเกษตรได้ (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006; Hardoim et al., 2015) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ปฏิปักษ์ที่มีการศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมากได้แก่ เช่น *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Paenibacillus* spp. เป็นต้น (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006; Eljounaidi et al., 2016) จากงานวิจัยที่ได้ศึกษาเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. พบว่ามีหลายไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR33, *Streptomyces*-PR84 และ *Streptomyces*-PR87 สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของพริกและมะเขือเทศ (เมธาวี, 2552), *Streptomyces*-7, *Streptomyces*-13, *Streptomyces*-15, *Streptomyces*-22, *Streptomyces*-23, *Streptomyces*-42, *Streptomyces*-55, *Streptomyces*-74, *Streptomyces*-78, *Streptomyces*-84, *Streptomyces*-87, *Streptomyces*-95, *Streptomyces*-108, *Streptomyces*-128, *Streptomyces*-PR8 และ *Streptomyces*-PR12 สามารถยับยั้งเชื้อ *Acidovorax citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรียของพืชวงศ์แตง และ *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของพืชวงศ์แตง (ภัทรกร, 2548), *Streptomyces*-PR13, *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR22, *Streptomyces*-PR33, *Streptomyces*-PR78, *Streptomyces*-PR84 และ *Streptomyces*-PR87 สามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก (รัติกาล และเพชรรัตน์, 2555) และ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 สามารถยับยั้งเชื้อ *Fusarium* spp. สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว (ปภัสสร และเพชรรัตน์, 2559) ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์มีรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis*-PRKKU.1, *Bacillus*-BK, *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-MS4, *Bacillus*-029, *Bacillus*-032 และ *Bacillus*-033 สามารถยับยั้ง

เชื้อ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมของมะเขือเทศ (นันทภัค และเพชรรัตน์, 2562) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. และ *Bacillus* spp. ที่ได้ศึกษาวิจัยข้างต้นแล้วและที่คัดเลือกใหม่ในจีนัส *Bacillus* spp. มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* biovar3 และ biovar 4 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง รวมทั้งประเมินพฤติกรรมการเป็นเอนโดไฟต์ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและช่วยเพิ่มผลผลิตพริกทั้งในการปลูกพริกแบบทั่วไป แบบปลอดภัย หรือแบบอินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป

วิธีการศึกษา

1. ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยเทคนิค dual culture bioassay

นำเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 5 ไอโซเลต ที่จำแนกเป็น biovar 3 และ biovar 4 แยกได้จากพริกและมะเขือเทศจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย คือ ไอโซเลต RS1-3, RS3-1-1, A3-18, RS10-1 และ RS1399 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก กรมวิชาการเกษตร และ รศ.ดร. อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ นำมาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D.600 nm) เท่ากับ 0.1 จากนั้นใช้ สำลีก้านที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มสารแขวนลอยเซลล์เชื้อให้เปียกชุ่ม แล้วนำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร NA ก่อนที่จะวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตเจริญอยู่สำหรับทดสอบ dual culture bioassay

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*–PR15, *Streptomyces*-PR87 และ *Bacillus* spp. จำนวน 34 ไอโซเลตที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล มาทดสอบ โดย เชื้อ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomtces*-PR87 เลี้ยงบนอาหาร arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) (Dhingra and Sinclair, 1995) บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. 34 ไอโซเลต ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ Ba02, Ba027, Ba028, Ba029, Ba030, Ba032, Ba033, Ba037N, Ba038, Ba039, Ba040, Ba042, Ba046, Ba096, BK, BS, HMP, HMB, PSK, NTS3, MS4, PP00202, PP00203, PP00205, PP00205-1, PP00403, PP00407, PP00506, S32 และ S33 ซึ่งแยกได้จากแหล่งต่างๆ ตามที่ระบุไว้ใน **Table 1**. นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

Dual culture bioassay: ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR87 หรือ *Bacillus* spp. 34 ไอโซเลต เจริญอยู่ และย้ายชิ้นวุ้นลงบนอาหาร NA ที่ทาเชื้อ *R. solanacearum* แต่ละไอโซเลต โดยเทคนิค dual culture bioassay ดัดแปลงวิธีจาก Harris et al. (1989) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คือ ชิ้นวุ้นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) นำไปเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม STATISTIX 10 ด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

2. ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ Indole-3-Acetic Acid (IAA)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 บนอาหาร AGMA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะลงบนอาหาร AGMA ที่มีเชื้อ *Streptomyces* spp. เจริญอยู่ แล้วจึงย้ายชิ้นวุ้นลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร arginine glycerol mineral salt broth (AGMB) ปริมาตร 5 มล. ที่ผสม 2 mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 2 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ที่เติม 2 mM tryptophan เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (bacterial broth culture) จากหลอดที่เลี้ยงไว้มาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีดัดแปลงจาก Khamna et al. (2009) โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 1.5 มล. ใส่ในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มล. ทำให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ และเติม 85% orthophosphoric acid จำนวน 2 หยด พร้อมเขย่า หลังจากนั้นเติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากันและบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที หากมี IAA สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มล. มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ IAA โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 23 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 6 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม STATISTIX 10 ด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

3. ทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกโดยวิธี blotter test

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากการทดลองที่ 1 ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *R. solanacearum* มากที่สุด 3 อันดับแรก และการทดลองข้อ 2 ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *R. solanacearum* และสามารถสังเคราะห์ IAA ได้สูงมาใช้ในการทดลองนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR87 บนอาหาร AGMA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน ในระยะที่มีการสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มปกคลุมอยู่ ตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1×1 ซม. ย้ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลว AGMB ปริมาตร 150 มล. เขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28-32°ซ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะเซลล์ของเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman®No.1 นำไปปั่นให้ละเอียดด้วย homogenizer ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-5 นาที ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มล. เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่มีเชื้อ *Bacillus* spp. เจริญอยู่ ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ผิวหน้าอาหารให้ออกจากผิวหน้าอาหาร นำมาปรับระดับเข้มข้นของเชื้อ *Streptomyces* spp. และ *Bacillus* spp. ที่ได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm เปรียบเทียบกับการนับปริมาณเชื้อเป็นหน่วย colony forming unit (cfu/ml) ด้วยวิธีการ serial dilution and plat count บนอาหาร AGMA หรือ NA ขึ้นอยู่กับชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เจือจางเซลล์แขวนลอยของเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml สำหรับใช้ในขั้นตอนการแช่เมล็ดพันธุ์พริก

เตรียมเมล็ดพันธุ์พริกหวานและพริกเผ็ด แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ 10% clorox 30 นาที ล้างด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน จำนวน 400 เมล็ดต่อ 10 มล. แช่เป็นเวลา 1 ชม. แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเพาะในกล่องชื้น (Blotter test) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชม. ต่อวัน ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด วัดความยาวราก จำนวนราก ความสูงของต้นกล้าพริก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ที่อายุ 21 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม STATISTIX 10 ด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

4. ศึกษาการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์

สุ่มต้นกล้าพริกหวานและพริกเผ็ดจากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี Blotter test ในแต่ละกรรมวิธีมาแยกเชื้อ endophytic bacteria โดยฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของตัวอย่างพืชด้วยแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ใน 10%Clorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในหลอด microcentrifuge ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไป spread plate บนอาหารทดสอบโดยวิธี serial dilution and plate count บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ เปรียบเทียบลักษณะเชื้อที่พบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต้นแบบที่นำมาใช้ในการทดลอง

5. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียว ในสภาพโรงเรือนทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ของต้นกล้าพริกขี้หนูพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท ในสภาพเรือนทดลอง เตรียมดินเพาะที่มีส่วนผสมคือ ดิน : พีทมอส อัตราส่วน

1:1 ใส่ลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว (400 กรัม) เติมเชื้อแขวนลอย *R. solanacearum* ทั้ง 5 ไอโซเลต ความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 0.2 ปริมาตร 50 มล. และประเมินเชื้อสาเหตุโรคในดินมีมากเพียงพอสำหรับทำให้เกิดโรคเหี่ยวเขียวได้ โดยการย้ายปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 28 วัน ลงไปจำนวน 3 ต้นต่อกระถาง สังเกตอาการทุกวัน จนครบ 14 วัน เมื่อพบว่าต้นมะเขือเทศเหี่ยวทั้งหมด จึงถอนต้นเหี่ยวออกให้เหลือแต่ดินที่ติดเชื้อสำหรับใช้ทดสอบกับต้นกล้าพริกขี้หนูพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท อายุ 28 วัน หรือระยะที่มีใบจริง 4-6 ใบ ย้ายปลูกจำนวน 3 ต้นต่อกระถาง ตามกรรมวิธีที่กำหนดไว้ 6 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธี 1 ปกติ (ดินไม่ติดเชื้อ *R. solanacearum* ต้นพริกแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) กรรมวิธี 2 ควบคุมโรค (ดินติดเชื้อ *R. solanacearum* ต้นพริกแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธี 3-6 ทดสอบเชื้อปฏิปักษ์แต่ละ ไอโซเลต (ดินติดเชื้อ *R. solanacearum* ต้นพริกแช่เชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลต) วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ โดยก่อนย้ายปลูกต้นกล้าได้ตัดปลายรากต้นกล้าพริกแล้วแช่ลงในสารแขวนลอยเชื้อปฏิปักษ์ที่ทดสอบในแต่ละกรรมวิธี ซึ่งมีความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 2 เป็นเวลา 30 นาที ส่วนกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ใช้แช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทน บันทึกผล จำนวนต้นเป็นโรคแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคตามสูตรที่กำหนดไว้ข้างล่าง เปรียบเทียบความแตกต่างในทางสถิติโดยใช้โปรแกรม STATISTIX 10 ด้วยวิธี Least significant difference (LSD) กำหนดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเหี่ยวเขียว จำนวน 5 ระดับ ดังนี้ ระดับ 1 : ไม่แสดงอาการ, ระดับ 2 : ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยว 1-25%, ระดับ 3 : ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยว 26-50%, ระดับ 4 : ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยว มากกว่า 50% และ ระดับ 5 : ต้นพริกตาย นำค่าระดับความรุนแรงของโรคที่ประเมินได้ไปคำนวณหาค่าดัชนีความรุนแรงของโรค จากสูตร

$$\text{ดัชนีความรุนแรงของโรค} = \left[\frac{\sum(\text{ระดับความรุนแรง} \times \text{จำนวนต้นพริกที่ระดับความรุนแรงนั้นๆ})}{\text{ระดับความรุนแรงสูงสุด} \times \text{จำนวนต้นพริกทั้งหมดที่นำมาทดสอบ}}\right] \quad \text{X } 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \left[\frac{\text{จำนวนต้นพริกที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนต้นพริกทั้งหมดที่นำมาทดสอบ}}\right] \quad \text{X } 100$$

ผลการศึกษา

1. ประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยเทคนิค dual culture bioassay

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 36 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ มีจำนวน 19 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *R. Solanacearum* ทั้ง 5 ไอโซเลตได้อย่างชัดเจน โดยในเชื้อจีนัส *Streptomyces* พบว่า *Streptomyces*-PR15 ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้กว้างกว่าเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ซึ่งแตกต่างกันในทางสถิติ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 20.70-26.27 มม. และ 15.97-17.53 มม. ตามลำดับ (**Table 1**) ส่วนเชื้อจีนัส *Bacillus* แบ่งออกได้ 6 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลต จัดเป็นกลุ่มที่ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้กว้างมากที่สุดในจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus*-Ba046, Ba032, Ba028, Ba033 และ NTS3 มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 26.53-34.10 มม. กลุ่มย่อยที่ 2 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ *Bacillus*-MS4, S32, Ba029, BS, BK และ Ba027 มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 23.63-35.30 มม. (**Table 1, Figure 1**) กลุ่มย่อยที่ 3 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ *Bacillus* –S33, HMP, PP00202, PP00506, HMB, และ PP00205-1 มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 18.43-26.33 มม. กลุ่มย่อยที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ *Bacillus*-Ba040, Ba026, Ba036 และ Ba02 มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 9.27-28.00 ม.ม. กลุ่มย่อยที่ 5 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีในบางไอโซเลต มีความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 14.27-33.00 มม. ได้แก่ *Bacillus*-Ba038, Ba096, Ba039, และ Ba042 และกลุ่มย่อยที่ 6 จำนวน 8 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้บางไอโซเลตและอยู่ในระดับต่ำ มีความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 9.03-17.17 มม. หรือไม่ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ที่นำมาทดสอบทุกไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus*-PP00205, PSK, Ba037N, PP01106, PP00206, PP00203, PP00403, และ PP00407 (**Table 1**)

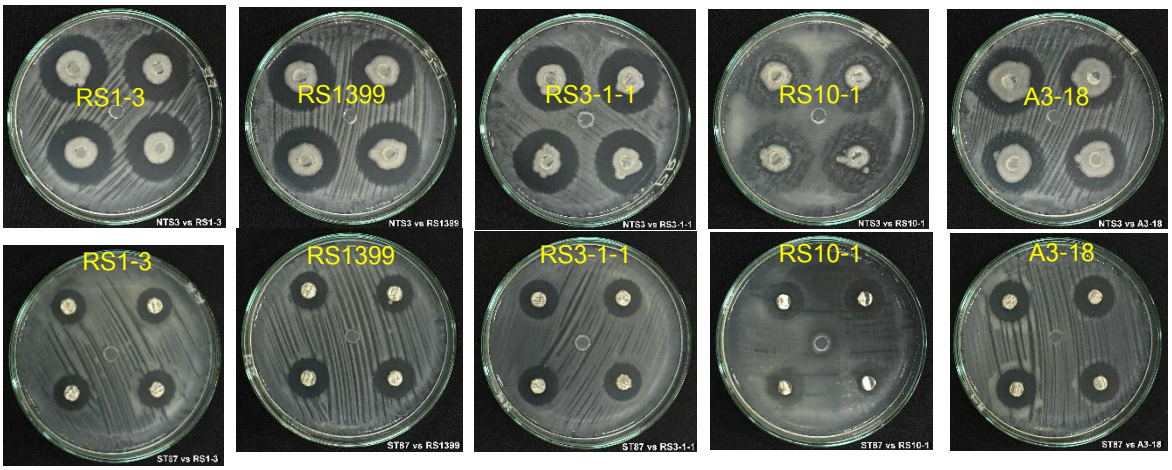

Figure 1 Dual culture bioassay of discs antagonistic bacteria *Bacillus*-NTS3 (a) and *Streptomyces*-PR87 (b) with lawn of *R. solanacearum* isolate RS1-3, RS1399, RS3-1-1, RS10-1 and A3-18. Photographs were taken after incubation at 28 ºC for 48 hrs

2. ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ Indole-3-Acetic Acid (IAA)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาทดสอบทุกไอโซเลตสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ และไม่ได้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* มีปริมาณ IAA ที่ตรวจสอบได้ตั้งแต่ 3.26-17.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*-PSK สังเคราะห์ IAA ได้ปริมาณมากที่สุด 17.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ *Streptomyces*-PR87 12.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *Bacillus*-Ba037N 11.51 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *Bacillus* สมาชิกในกลุ่มย่อยที่ 1 สามารถสร้าง IAA ได้ปานกลาง อยู่ในระดับ 5.40 -8.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อ *Bacillus* (**Table 1**)

Table 1 Testing the efficacy of antagonistic bacteria in inhibiting the growth of *R. solanacearum* by dual culture bioassay and IAA synthesis capability.

Antagonists	source		Clear zone (mm.)[1/]					IAA
		gr	RS1-3	RS1399	RS3-1-1	RS10-1	A3-18	(µg/ml)
Streptomyces-PPR87	soil		15.97^{j}	16.80^{l}	16.03^{l}	16.93^{j}	17.53^{i}	12.95^{b}
Streptomyces-PR15	soil		20.70^{i}	21.17^{k}	23.20^{hij}	26.27^{efg}	25.87^{de}	8.55^{cd}
Bacillus-Ba046	Rice seed	1	30.93^{a}	30.47^{a}	29.93^{a}	34.10^{a}	28.87^{a}	7.03^{defgh}
Bacillus-Ba032	Rice seed	1	29.87^{ab}	28.87^{ab}	27.87^{abc}	29.97^{bcd}	28.67^{a}	8.93^{c}
Bacillus-Ba028	Rice seed	1	28.33^{bc}	29.37^{ab}	26.53^{bcdef}	27.77^{def}	29.20^{a}	6.24^{efghi}
Bacillus-Ba033	Rice seed	1	28.33^{bc}	28.93^{ab}	28.93^{ab}	31.97^{abc}	28.03^{ab}	5.40^{ijk}
Bacillus-NTS3	tomato seed	1	28.50^{cd}	28.37^{bc}	27.60^{abcd}	33.77^{a}	27.70^{abc}	5.82^{fghi}
Bacillus-MS4	melon seed	2	27.13^{cd}	26.77^{cde}	23.60^{hij}	35.30^{a}	25.50^{de}	6.63^{efghi}
Bacillus-S32	Sunflower leaf	2	26.03^{defg}	25.97^{def}	25.20^{defghi}	32.83^{ab}	26.53^{bcd}	5.47^{hij}
Bacillus-Ba029	Rice seed	2	26.43^{cdefg}	25.60^{defg}	26.37^{bcdefg}	23.37^{gh}	23.67^{fgh}	7.30^{def}
Bacillus-BS	soil	2	26.87^{cdef}	25.30^{efgh}	26.43^{bcdefg}	32.77^{ab}	24.60^{efg}	6.91^{efghi}
Bacillus-BK	Peat moss	2	26.53^{cdefg}	25.87^{def}	24.43^{efghi}	24.20^{gh}	24.67^{efg}	3.26^{l}
Bacillus-Ba027	Rice seed	2	24.87^{efgh}	23.63^{ghij}	23.93^{fghij}	28.27^{def}	23.37^{fgh}	4.03^{jkl}
Bacillus-S33	Sunflower leaf	3	27.00^{cde}	26.87^{cde}	20.53^{k}	26.03^{efg}	24.53^{efg}	3.68^{l}
Bacillus-HMP	Tomato plant	3	24.80^{fgh}	23.10^{ijk}	23.63^{hij}	23.27^{gh}	22.53^{h}	7.09^{defg}
Bacillus-PP00202	Pepper plant	3	24.63^{gh}	25.33^{efgh}	21.60^{jk}	24.97^{fg}	23.00^{gh}	ND
Bacillus-PP00506	Pepper plant	3	24.67^{gh}	23.47^{hij}	23.87^{ghij}	26.33^{efg}	24.77^{ef}	ND
Bacillus-HMB	Tomato plant	3	23.50^{h}	22.53^{jk}	21.43^{jk}	21.10^{h}	18.43^{i}	7.54^{cde}
Bacillus-PP00205-1	Pepper plant	3	21.27^{cd}	24.77^{fghi}	25.47^{cdefgh}	26.10^{efg}	26.20^{cde}	ND
Bacillus-Ba040	Rice seed	4	11.67^{kl}	11.00^{n}	27.67^{abcd}	28.00^{def}	11.67^{k}	ND
Bacillus-Ba026	Rice seed	4	12.83^{k}	14.10^{m}	22.63^{ijk}	26.33^{efg}	9.27^{lm}	ND
Bacillus-Ba036	Rice seed	4	12.90^{k}	13.90^{m}	23.40^{hij}	23.77^{gh}	8.90^{lm}	5.72^{ghi}
Bacillus-Ba02	Rice seed	4	10.33^{lm}	27.50^{bcd}	20.33^{k}	25.67^{efg}	9.93^{l}	ND
Bacillus-Ba030	Rice seed	5	9.30^{mn}	9.03^{no}	9.20^{m}	9.20^{j}	9.20^{lm}	ND
Bacillus-Ba038	Rice seed	5	6.00^{o}	8.53^{o}	6.00^{n}	9.33^{j}	8.00^{mn}	6.21^{efghi}
Bacillus-Ba039	Rice seed	5	6.00^{o}	6.00^{p}	27.00^{abcd}	28.00^{def}	6.00^{o}	7.30^{def}
Bacillus-Ba042	Rice seed	5	6.00^{o}	14.27^{m}	23.67^{hij}	28.67^{cde}	6.00^{o}	ND
Bacillus-Ba096	Rice seed	5	6.00^{o}	6.00^{p}	27.00^{bcde}	33.00^{ab}	6.00^{o}	7.84^{defg}
Bacillus-PP00205	Pepper plant	6	7.83^{no}	6.00^{p}	7.03^{mn}	7.67^{j}	7.43^{no}	ND
Bacillus-PSK	Pepper seed	6	17.17^{j}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	17.86^{a}
Bacillus-Ba037N	Rice seed	6	16.60^{j}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	15.77^{j}	11.51^{b}
Bacillus-PP01106	Pepper plant	6	6.00^{o}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	ND
Bacillus-PP00206	Pepper plant	6	6.00^{o}	8.57^{o}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	ND
Bacillus-PP00203	Pepper plant	6	6.00^{o}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	ND
Bacillus-PP00403	Pepper plant	6	6.00^{o}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	ND
Bacillus-PP00407	Pepper plant	6	6.00^{o}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	ND
Control			6.00^{o}	6.00^{p}	6.00^{n}	6.00^{j}	6.00^{o}	0.00^{m}
F-test			**	**	**	**	**	**
C.V.(%)			11.51	10.48	12.25	13.71	9.84	13.79

[1/]Means within the same column with a common letter are not significantly different by LSD ($P < 0.05$), ND= not determined

3. ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริกโดยวิธี blotter test

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาแช่เมล็ดพันธุ์พริกก่อนเพาะไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกทั้งพริกหวานและพริกเผ็ด แต่คาดว่ามีปฏิสัมพันธ์ที่แตกต่างกันบ้างในคุณลักษณะที่ใช้ประเมินการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก ที่พบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อปฏิปักษ์แช่เมล็ดพริกก่อนเพาะมีการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริกที่ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งในด้านความสูงของลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักแห้ง การตอบสนองของสายพันธุ์พริกที่แตกต่างกันบ้าง ได้แก่ ในพริกหวานกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Streptomyces*-PR87 และ *Bacillus*-NTS3 ต้นกล้ามีความยาวรากมากที่สุด คือ 59.45 และ 57.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-Ba033 และ *Streptomyces*-PR87 ต้นกล้ามีน้ำหนักแห้งต่อต้นมากที่สุด คือ 4.0, 3.9 และ 3.9 มิลลิกรัมต่อต้น ตามลำดับ ส่วนในพริกเผ็ด พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Streptomyces*-PR87, *Bacillus*-Ba046 และ *Bacillus*-NTS3 ต้นกล้ามีความสูงมากที่สุด คือ 15.03, 14.40 และ 14.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Bacillus*-Ba033 ต้นกล้ามีความยาวรากมากที่สุด คือ 62.60 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Bacillus*-Ba033, *Bacillus*-NTS3 และ *Streptomyces*-PR87 ต้นกล้ามีน้ำหนักแห้งต่อต้น มากที่สุด คือ 2.4, 2.3 และ 2.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ (**Table 2**)

Table 2 Efficacy of antagonistic bacteria for enhance seed germination percentage and growth of sweet pepper and hot pepper seedlings at 21 days after blotter test

Treatment	Sweet pepper						Hot pepper					
	Germination (%)	Plant height (mm.)	Root length (mm.)	Lateral root (no.)	Fresh wt. (mg/plant)	Dry wt. (mg/plant)	Germination (%)	Plant height (mm.)	Root length (mm.)	Lateral Root (no.)	Fresh wt. (mg/plant)	Dry wt. (mg/plant)
Normal	89.00	13.43ab	45.58b	4.10	44.6a	3.5b	99.50a	12.20b	46.75c	2.40	16.9c	1.9c
***Streptomyces*-PR87**	94.25	11.68d	59.45a	4.05	44.3a	3.9a	99.50a	15.03a	51.13b	2.53	19.2b	2.2b
***Bacillus*-NTS3**	88.00	13.25b	57.60a	4.08	41.5a	4.0a	97.75b	14.38a	53.83b	2.53	20.7ab	2.3ab
***Bacillus*-Ba033**	93.25	12.55c	47.20b	3.73	35.3b	3.9a	99.50a	12.90b	62.60a	2.48	21.3a	2.4a
***Bacillus* -Ba046**	86.50	13.88a	46.50b	4.05	43.7a	3.6b	98.25ab	14.40a	47.18c	2.43	19.0b	1.9c
CV(%)	3.67	2.78	4.23	12.74	7.27	4.23	0.92	4.48	6.67	3.14	7.06	5.61
F-test	ns	**	**	ns	**	**	*	**	**	ns	**	**

*Means within the same column with a common letter are not significantly different by LSD ($P < 0.05$)

4. ศึกษาการเป็น endophytic bacteria

เมื่อสุ่มต้นกล้าพริกที่ได้จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกโดยวิธี blotter test มาแยกเชื้อแบบการแยก endophytic bacteria พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ไอโซเลต เป็น endophytic bacteria ที่ดีพบได้ทั้งภายในเนื้อเยื่อส่วนราก ลำต้น และใบของต้นกล้าพริก โดยภายในเนื้อเยื่อส่วนรากพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่หนาแน่นมากกว่าภายในเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นและใบ โดยในเนื้อเยื่อรากอยู่ที่ระดับ 6.5 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-NTS3), 7.4 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-Ba033) และ 6.4 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-Ba046) ในเนื้อเยื่อลำต้นอยู่ที่ระดับ 3.7 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-NTS3), 4.8 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-Ba033) และในเนื้อเยื่อใบอยู่ที่ระดับ 4.9 x 10^5 cfu/ml (*Bacillus*-NTS3), 4.8 x 10^4 cfu/ml (*Bacillus*-Ba033) และ 3.2 x 10^4 cfu/ml (*Bacillus*-Ba046) (**Table 3**) อย่างไรก็ตามพบเชื้อแบคทีเรียที่เป็น endophytic bacteria อื่น ๆ บ้าง ซึ่งมีลักษณะโคโลนีแตกต่างไปจากเชื้อ *Bacillus*-NTS3, Ba033 หรือ Ba046 ที่นำมาทดสอบเมื่อประเมินจากตัวอย่างที่ได้จากกรรมวิธีควบคุม ส่วนกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Streptomyces*-PR87 ไม่สามารถประเมินได้โดยวิธี serial dilution plating บนอาหาร NA ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คงต้องใช้เทคนิคอื่นเช่น เทคนิค ELISA ที่มีความจำเพาะ(specificity) และมีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) มากกว่า หรือการใช้ selective medium ที่จำเพาะกับเชื้อ *Streptomyces*-PR87

Table 3 Population of target antagonistic bacteria inside of root, stem, and leaf tissues obtained from 14 days old pepper seedlings (from blotter test experiment) after doing surface sterilization as recommended for endophytic bacteria isolation.

treatment	Population of target antagonistic bacteria (cfu/ml)		
	root	stem	leaf
Control	none	none	none
Streptomyces-PR87	N/A	N/A	N/A
Bacillus-NTS3	6.5 x 10^5 cfu/ml	3.7 x 10^5 cfu/ml	4.9 x 10^5 cfu/ml
Bacillus-Ba033	7.4 x 10^5 cfu/ml	4.8 x 10^5 cfu/ml	4.8 x 10^4 cfu/ml
Bacillus-Ba046	6.4 x 10^5 cfu/ml	3.2 x 10^5 cfu/ml	3.2 x 10^4 cfu/ml

N/A = Not available

5. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวในสภาพโรงเรือนทดลอง

การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวเขียวและลดความรุนแรงของโรคในพริกขี้หนูซุปเปอร์ฮอทได้ โดยกรรมวิธีที่ใช้ *Bacillus*-NTS3, *Bacillus*-Ba033 และ *Streptomyces*-PR87 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเหี่ยวเขียวต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเชื้อ *Bacillus*-NTS3 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด คือ 40 และ 31.67% ตามลำดับ รองลงมาคือ *Streptomyces*-PR87 มีการเกิดโรค 53.33% ดัชนีความรุนแรงของโรค 25% และ เชื้อ *Bacillus*-Ba033 มีการเกิดโรคเหี่ยวเขียว 60% และดัชนีความรุนแรงของโรค 45% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรคที่ 100% และระดับความรุนแรงของโรค 83.88 % ส่วนเชื้อ *Bacillus*-Ba046 ลดการเกิดโรคเหี่ยวเขียวและลดระดับความรุนแรงของโรคได้ไม่มากนัก ยังไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมอย่างชัดเจน โดยเกิดโรคเหี่ยวเขียวได้ 86.67% และมีดัชนีความรุนแรงของโรค 65% (**Table 4**)

Table 4 Disease incidence and disease severity index of bacterial wilt disease in hot pepper plants at 4 weeks after transplanting in pot containing *Ralstonia solanacearum* infested soil mix

Treatment	Disease incidence (%)*	Disease severity Index (%)*
Control	0.00d	0.00d
R. solanacearum	100.00a	83.33a
***R. solanacearum* + *Streptomyces*-PR87**	53.33bc	25.00cd
***R. solanacearum* + *Bacillus*-NTS3**	40.00c	31.67c
***R. solanacearum* + *Bacillus*-Ba033**	60.00bc	45.00bc
***R. solanacearum* + *Bacillus*-Ba046**	86.67ab	65.00ab
CV(%)	48.03	49.02
F-test	**	**

*Means within the same column with a common letter are not significantly different by LSD (P < 0.05)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด 36 ไอโซเลต มีเพียงจำนวน 23 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เป็นตัวแทนของ biovar 3 และ 4 ได้ทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ของเชื้อ *Streptomyces* spp. และ *Bacillus* spp. มีความแตกต่างกันไป โดยเฉพาะในส่วนของการสร้างสารทุติยภูมิที่เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* เช่นที่มีรายงานความหลากชนิดของสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งในเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. (Olanrewaju and Babalola, 2019) และเชื้อ *Bacillus* spp. (Shafi et al., 2017) เมื่อคัดเลือกโดยใช้คุณสมบัติการผลิตสาร IAA เพิ่มด้วยอีกลักษณะหนึ่ง จึงได้ไอโซเลตเชื้อปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพควบคุมโรคเหี่ยวเขียวได้กว้างและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย จากผลการทดลองได้ชี้ให้เห็นว่า *Bacillus*-NTS3 มีศักยภาพสูงสุดทั้งในห้องปฏิบัติการและการประเมินกับเมล็ดพันธุ์พริกทั้งพริกหวานและพริกขี้หนู เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนราก ลำต้นและใบของพริกได้เป็นอย่างดี เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ทั้ง biovar 3 และ 4 และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยสนับสนุนความสามารถในด้านการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในมะเขือเทศและใบจุดแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria* และโรคแอนแทรกโนสในพริก (นันทภัค และเพชรรัตน์, 2562; ยลธิดา และเพชรรัตน์, 2563) ส่วนเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ยังมีศักยภาพสูงเช่นเดียวกันในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกด้วยถึงแม้ว่าจะยังไม่ประสบความสำเร็จในการประเมินภาวะการเป็นเอนโดไฟต์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาทั้งเชื้อ *Streptomyces*-PR87 และ *Streptomyces*-PR15 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคชนิดอื่น ๆ ได้กว้างมาก เช่น ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชวงศ์แตง ได้แก่ โรคผลเน่าแบคทีเรีย ที่เกิดจากเชื้อ *Acidovorax citrulli* และโรคต้นแตกยางไหล ที่เกิดจากเชื้อ *Didymella bryoniae* (ภัทรกร, 2548), โรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum capsici* และโรครากปม ที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม ในพริก (รัติกาลและเพชรรัตน์, 2555) และโรคถอดฝักดาบและโรคเมล็ดด่างของข้าว ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* spp. (ปภัสสรและเพชรรัตน์, 2559) อีกทั้งสามารถกระตุ้นภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างยาสูบ (*Tobacco mosaic virus*) (วีรกรณ์, 2557) เป็นต้น จึงจัดเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ดีมากสำหรับการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชหลายประเภทกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ส่วน *Bacillus*-Ba033 และ

Bacillus-046 เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคสำคัญในพริกและมะเขือเทศ คือ โรคเหี่ยวเขียวและโรคเหี่ยวจากเชื้อ *S. rolfsii* และโรคใบจุดแบคทีเรีย พร้อมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (นันทภัคและเพชรรัตน์, 2562; ยลธิดาและเพชรรัตน์, 2563) แต่ควรต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านความเข้มข้นของเชื้อและวิธีการใช้ ส่วนเชื้อ *Bacillus*-PSK ถึงแม้จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ในระดับต่ำแต่สังเคราะห์สาร IAA ได้สูงมากที่สุด และ ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่ก่อโรคกับพืช (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) จึงมีศักยภาพสูงสำหรับนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (biofertilizer) หรือนำไปทดสอบการเข้ากันได้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้แล้วในการวิจัยนี้หรือไอโซเลตอื่น ๆ ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบเชื้อผสม สำหรับใช้เป็นแนวทางสร้างกลุ่มแบคทีเรียที่ดี (consortium bacteria) (Woo and Pepe, 2018) สำหรับใช้ในการผลิตสารกระตุ้นทางชีวภาพ (plant biostimulants) เพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชที่หลากชนิดโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคหลายประเภทและต้านทานต่อสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (abiotic stress) เช่น ดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ หรือมีน้ำน้อย ช่วยเพิ่มผลผลิตพืช นำไปสู่แนวทางการผลิตพืชที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืนได้ในที่สุด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นันทภัค เกตุสุวงษ์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2562. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยวสเคลอโรเตียมและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ. แก่นเกษตร. 47: 819-828.

ปภัสสร สีลารักษ์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2559. การถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ของเชื้อราฟิวซาเรียมสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าวและศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR87 ในการควบคุมโรคจากเชื้อฟิวซาเรียมของพืชเศรษฐกิจ. แก่นเกษตร. 44(ฉบับพิเศษ 1): 238-245.

ภัทรกร ภูริชินวุฒิ. 2548. พันธุศาสตร์โมเลกุลของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovarax avenae* subsp. *citrulli* และเชื้อรา *Didymella bryoniae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วีรกรณ์ แสงไสย์. 2557. บทบาทของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิต้านทานโรคไวรัส TMV ของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ยลธิดา ชนะชัย และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2563. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริกในแนวกว้างและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. แก่นเกษตร 48: 333-344.

รัติกาล ยุทธศิลป์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2555. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก. แก่นเกษตร 40 (ฉบับพิเศษ1): 224-232.

เมธาวี ธิมาศ. 2552. ศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวและโรครากปมมะเขือเทศ และความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Dhingra, O. D., and J.B. Sinclair. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. USA.

Eljounaidi, K., S.K. Lee, and H. Bae. 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases–review and future prospects. Biological Control. 103: 62-68.

Hardoim, P. R., L.S. Van Overbeek, G. Berg, A.M. Pirttilä, S. Compant, A. Campisano, and A. Sessitsch. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiology Molecular Biology Reviews. 79: 293-320.

Harris, L. J., M.A. Daeschel. M.E. Stiles, and T.R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Journal of food protection. 52: 384-387.

Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review Phytopathology. 29: 65-87.

Khamna, S., A. Yokota, and S. Lumyong. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25: 649-655.

Rosenblueth, M., and E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular plant-microbe interactions. 19: 827-837.

Shafi, J., H. Tian, and M. Ji. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotech-nology and Biotechnological Equipment. 31: 446-459.

Olanrewaju, O. S., and O. O. Babalola. 2019. Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. Applied microbiology and biotechnology. 103: 1179-1188.

Vanitha, S. C., S. R. Niranjana, C. N. Mortensen, and S. Umesha. 2009. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. Biocontrol. 54: 685-695.

Woo, S. L., and O. Pepe. 2018. Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in plant science. 9: 1801.