

การแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและฤทธิ์ต้านเชื้อราบางชนิด

Isolation and screening of endophytic bacteria from strawberry runner with plant growth promotion properties and antifungal activity against some fungi

ดลฤดี บุญญาภิสิต¹, อภิรดี เสียงสืบาติ², นารีลักษณ์ นาแก้ว^{3,4}, ธนิตา บุญสร้างสม^{1,5}, วิภา หอมหวล¹ และ จวงจันท์ จำปาทอง^{1,5*}

Dolrudee Boonyapisit¹, Apiradee Siangsuepchart², Nareeluk Nakaew^{3,4}, Thanita Boonsrangsom^{1,5}, Wipa Homhual¹ and Juangjun Jumpathong^{1,5*}

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

¹ Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand

² สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ 54140

² Department of Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae, 54140 Thailand

³ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

³ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand

⁴ สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคนิควิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

⁴ Centre of Excellence in Fungal Research, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand

⁵ สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

⁵ Center of Excellence in Research for Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีและคัดกรองคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราบางชนิด จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากไหลสตรอว์เบอร์รีจำนวน 117 ไอโซเลตมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบด้วยวิธี Molybdenum-blue method โดยไอโซเลต DB021 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดเท่ากับ 234.64 ± 2.64 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต DB041 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดเท่ากับ 322.10 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำน้ำเลี้ยงส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski's Reagent ในการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่า ไอโซเลต DB065 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Rhizoctonia solani* 1406 ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ $42.67 \pm 1.59\%$ ในขณะที่ไอโซเลต DB071 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Fusarium* sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ $43.05 \pm 0.18\%$ และ $54.92 \pm 0.26\%$ ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 5 ชนิดด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า ส่วนใสของไอโซเลต DB071 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร T2 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราที่ทดสอบได้ทุกชนิด เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ ดังนี้ คือ *Bacillus subtilis* DB016 และ DB051, *B. siamensis* DB071, *Microbacterium enclense* DB021, *Pseudomonas aeruginosa* DB065, *Enterobacter quasiroggenkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 และ DB044 การศึกษานี้เป็นการรายงานในระดับหลอดทดลองครั้งแรกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ไอโซเลตที่มีศักยภาพดีที่สุดจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตของสตรอว์เบอร์รีตามหลักการการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP)

* Corresponding author: juangjun@nu.ac.th

Received: date; June 10, 2022 Accepted: date; October 3, 2022 Published: date; January 10, 2023

คำสำคัญ: แบคทีเรียเอนโดไฟต์; แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช; ฤทธิ์ต้านเชื้อรา; สตรอว์เบอร์รี

ABSTRACT: The objective of this research was to isolate endophytic bacteria from strawberry runners and to screen for plant growth-promoting properties and antifungal activity against some fungi. A total of 117 isolates of bacterial endophytes showed soluble phosphate activity when tested by the Molybdenum-blue method. Isolate DB021 had the highest phosphate solubility efficiency at 234.64 ± 2.64 $\mu\text{g/ml}$. Also, isolate DB041 had the highest IAA production of 322.10 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$ when tested with the Salkowski's Reagent. Dual culture assay indicated that antagonism of DB065 against *Rhizoctonia solani* 1406 had the highest percentage of inhibition (42.67 ± 1.59). Furthermore, DB071 inhibited growth of *Fusarium* sp. FB3-3 and *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 by $43.05 \pm 0.18\%$ and $54.92 \pm 0.26\%$, respectively. In this study, the cell-free supernatant obtained from five different media were tested against *Rhizoctonia solani* 1406, *Fusarium* sp. FB3-3 and *C. gloeosporioides* DBCS-01. The agar well diffusion assay showed that DB071 cultivated in T2 medium inhibited mycelial growth of the three fungal pathogens. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, eight bacterial isolates were classified as follows: *Bacillus subtilis* DB016, *B. siamensis* DB051 and DB071, *Enterobacter quasirogerkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 and DB044, *Microbacterium enclense* DB021, and *Pseudomonas aeruginosa* DB065. This is the first in vitro study of endophytic bacteria isolated from strawberry runners with the potential to enhance plant growth. The most promising isolates will now be evaluated for their effectiveness to reduce disease and promote strawberry production based on Good Agricultural Practices (GAP).

Keywords: endophytic bacteria; plant growth promoting-bacteria; antifungal activity; strawberry

บทนำ

สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria × ananassa* Duch.) เป็นไม้ผลที่ได้รับความนิยมบริโภคผลสด ในประเทศไทยมีการปลูกสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ในพื้นที่สูงเพื่อบริโภคและเป็นแหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตร การปลูกสตรอว์เบอร์รีในอำเภอเขาค้อนั้นอยู่ในช่วงของปลายฤดูฝนซึ่งมีความชื้นในอากาศสูง ทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่าย โดยโรคที่พบในสตรอว์เบอร์รีส่วนใหญ่มีสาเหตุเกิดมาจากเชื้อราซึ่งสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืช สาเหตุการเกิดโรคนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ ต้นสตรอว์เบอร์รีมีความอ่อนแอ มีการแพร่ระบาดโดยแมลงที่เป็นพาหะและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค โรคที่สำคัญของสตรอว์เบอร์รี มีดังนี้ 1) โรคเหี่ยวสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. 2) โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ 3) โรคเน่าคอดิน สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. (ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวศ์, 2554; คลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิตสำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 2562) ซึ่งเกษตรกรต้องใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช แต่การใช้สารเคมีที่มากเกินไปและต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนานทำให้เกิดการสะสมของสารเคมีในดินและผลผลิตจนเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคได้ (Sainju and Alasinrin, 2020)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นแบคทีเรียที่เจริญอยู่ภายในเซลล์พืชอาศัย มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและทำให้พืชแข็งแรง อีกทั้งยังปกป้องพืชจากจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชด้วยการผลิตสารเมแทบอไลต์ (Brader et al., 2014) แบคทีเรียเอนโดไฟต์แยกได้จากพืชสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด (Hallmann and Berg, 2006; Adeleke et al., 2021) ซึ่งบริเวณรากพืชนั้นเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูงและมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายประการที่เป็นประโยชน์ต่อพืชอาศัย การเข้าสู่เซลล์รากของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำได้โดยการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรืออาจเข้าสู่รากบริเวณที่เกิดบาดแผลโดยธรรมชาติ นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดอาศัยโครงสร้าง flagella เพื่อเคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่าง ๆ เพื่อเข้าสู่เซลล์ (Campodónico et al., 2010; Mukherjee and Kearns, 2014; Ludueña et al., 2019)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยกลไกทางตรงและทางอ้อม (Glick, 1995) กลไกทางตรง ได้แก่ การผลิตฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ การละลายฟอสฟอรัสและการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase การตรึงไนโตรเจน เป็นต้น Indole-acetic acid (IAA) เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญรากและทำให้ต้นอ่อนเจริญได้ดี (Santoyo et al., 2016) ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถผลิต IAA โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Ludueña et al., 2019) จากการศึกษาความหลากหลายของเอนโดไฟต์จากพืช *Costus speciosus* พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถ

ผลิต IAA ได้ (Barman and Dkhar, 2019) นอกจากนี้ *Enterobacter* และ *Microbacterium* ยังสามารถผลิต IAA เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดียวกัน (Khan and Doty, 2009; Passari et al., 2015) ความสามารถในการละลายฟอสเฟตเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ได้รับการศึกษาเป็นจำนวนมาก โดยมีการรายงานว่า แบคทีเรียในจีนัส *Enterobacter*, *Pseudomonas* และ *Microbacterium* สามารถละลายฟอสเฟตได้ (Ali et al., 2014; Eljounaidi et al., 2016; Borah et al., 2021)

คุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยกลไกทางอ้อมคือ การป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชซึ่งเป็นกลไกทางอ้อมได้หลายรูปแบบ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะและสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อแย่งอาหารและพื้นที่ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan, 2021) แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ได้รับการศึกษาและเป็นที่ยอมรับว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิด (de Curtis et al., 2010; Zhang et al., 2011) เช่น *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. และ *Colletotrichum* spp. (Cui et al., 2020; Hussain and Khan, 2021) ซึ่งสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้มีการรายงานว่าเป็นสารกลุ่มลิโปเปปไทด์และสารกลุ่มโพลีคีไทด์ (Cossus et al., 2021) นอกจากนี้ แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อทำลายผนังเซลล์เชื้อราเพื่อป้องกันตนเองและพืชอาศัยได้อีกด้วย (Chernin et al., 1995; Susilowati et al., 2011)

ดินที่ทำเกษตรกรรมมักมีการใช้ปุ๋ยและสารเคมีต่อเนื่องเป็นเวลานานทำให้เกิดการสะสมสารเคมีต่าง ๆ ในดินส่งผลให้หลากหลายของจุลินทรีย์ลดลง (Xu et al., 2020) ดังนั้น การนำแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟต์และแบคทีเรียที่มีแหล่งอาศัยในดินที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมาใช้ จะช่วยให้ดินมีความสมบูรณ์และเหมาะสมแก่การเพาะปลูก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่มีคุณสมบัติบางประการในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ การละลายฟอสเฟต การผลิต IAA และฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา เพื่อเตรียมต้นแบบปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตสตรอว์เบอร์รีตามหลักการการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP)

วิธีการศึกษา

การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างไหลสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์พระราชทาน 80 จากบ้านไร่ไธสงสตรอเบอร์รี ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ (16°35'48"N101°0'14"E) จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตามวิธีการของ Rojas-Solis et al. (2018) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาบดเพื่อเตรียมสารละลายสำหรับการแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เจือจาง (serial dilution) แล้วเกลี่ยสารละลายจากไหลสตรอว์เบอร์รีที่เจือจางเท่ากับ 10^{-3} - 10^{-7} ลงบนอาหาร Tryptic soya agar (TSA) อาหาร King's B agar และอาหาร Luria-Bertani agar (LB Agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) เป็นเวลา 5-7 วัน ทำการแยกแบคทีเรียจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 °C

การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตและการผลิต Indole-acetic acid (IAA)

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตด้วยการวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Pikovskaya's agar (PVK) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตและวัดขนาดรัศมีของบริเวณวงใสรอบโคโลนี นำโคโลนีที่ปรากฏวงใสมาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว โดยเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 2.5 มล. (ความเข้มข้นประมาณ 10^7 - 10^8 CFU/ml) ลงในอาหารเหลว PVK (ค่า pH เท่ากับ 7) ปริมาตร 50 มล. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยใช้วิธี Molybdenum-blue method วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร (Murphy and Riley, 1962) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบความสามารถในการผลิต IAA

ทำการทดสอบความสามารถในการผลิต IAA ตามวิธีการของ Rashid et al. (2012) โดยการเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในอาหาร Yeast Malt Broth (YM Broth) ที่มีส่วนประกอบของ 0.1% L-Tryptophan และ YM Broth ที่ไม่มีการเติม L-Tryptophan โดยนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เติร์ยมส่วนใส ปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski's Reagent (2% 0.5M FeCl_3 ใน 35% HClO_4) ปริมาตร 2 มล. บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร บันทึกผลเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน IAA (Mohite, 2013) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา

วิธี dual culture

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน และแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว รวมถึงแบคทีเรียที่มีการผลิต IAA มาทำการทดสอบกับเชื้อราก่อโรคในดิน *Rhizoctonia solani* 1406 (ได้รับการอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร) และเชื้อราที่แยกได้จากการศึกษาได้แก่ *Fusarium* sp. FB3-3 (ดินบริเวณรอบรากสตรอว์เบอร์รี) และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 (ผลสตรอว์เบอร์รี) บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 4 วัน ทำการเจาะขึ้นวุ้นด้วยพลาสติกเจอร์ปิเปตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. แล้วย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราไปวางบนอาหาร PDA โดยมีระยะห่างจากขอบจานอาหารเท่ากับ 2 ซม. จากนั้นขีดแบคทีเรียให้มีระยะห่างจากเชื้อราเท่ากับ 4.5 ซม. ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ บ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth; PIRG) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Montealegre et al., 2003) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิธี Agar well diffusion

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากการทดลอง 3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร T1 (Kwon and Kim, 2014) อาหารสูตร T2 (Sohn et al., 2008) อาหารสูตร T3 (Yan et al., 2016; Li et al., 2016) อาหารสูตร NB (Guo et al., 2014) และอาหารสูตร LB (Li et al., 2012) บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร โดยการทดสอบเชื้อรา *R. solani* 1406 นั้น ให้เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 48 ชม. แล้วเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ให้มีระยะห่างจากขอบจานอาหารเท่ากับ 2 ซม. จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองลงในแต่ละหลุม หลุมละ 20 μL แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองเมื่อครบ 4 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Cycloheximide ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g}/\text{disc}$) สำหรับการทดสอบเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 นั้น ให้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 สปอร์/มล. ทำการป้าย (Swab) ให้ทั่วอาหาร PDA ทั้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ให้ได้หลุมละ 20 μL บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลโดยการวัดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟต์

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต การผลิต IAA และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา มาจำแนกชนิดโดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่บริษัท MacroGen (ประเทศเกาหลีใต้) โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer 1 คู่ คือ 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' (Jumpathong et al., 2019) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) เพื่อทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอร์เบอร์รี่สายพันธุ์พระราชทาน 80

จากการศึกษาแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอร์เบอร์รี่จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้จำนวน 264 ไอโซเลต เมื่อสังเกตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ดังนี้ 1) อาหาร Tryptic soya agar (TSA) แยกได้จำนวน 69 ไอโซเลต 2) อาหาร King's B agar แยกได้จำนวน 88 ไอโซเลต และ 3) อาหาร Luria-Bertani agar (LB Agar) แยกได้จำนวน 107 ไอโซเลต ซึ่งอาหารสูตรดังกล่าวมีรายงานว่า สามารถใช้ในการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชได้หลายชนิด (Majeed et al., 2015; Egamberdieva et al., 2017; Barman and Dkhar, 2019)

การศึกษาศามารถในการละลายฟอสเฟตและการผลิต Indole-acetic acid (IAA)

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium พบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมด 117 ไอโซเลตที่แสดงวงใสรอบโคโลนี และเมื่อนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวด้วยวิธี Molybdenum-blue method พบว่า มีเพียง 77 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวที่มีปริมาณการละลายฟอสเฟตมากกว่า 100 µg/ml โดยไอโซเลต DB021 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูงที่สุดเท่ากับ 234.64 ± 2.64 µg/ml ในขณะที่ไอโซเลต DB016 และ DB035 มีค่าการละลายฟอสเฟตรองลงมา เท่ากับ 175.31 ± 2.09 µg/ml และ 131.19 ± 1.93 µg/ml ตามลำดับ (Table 1) จากการศึกษาของ Amaresan et al. (2012) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ในจีนัส *Bacillus* หลายชนิดที่แยกได้จากมะเขือเทศและพริกมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium ในช่วงเวลาต่อมา ได้มีการรายงานผลการศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในจีนัส *Enterobacter*, *Pseudomonas* และ *Microbacterium* ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Ali et al., 2014; Eljounaidi et al., 2016; Borah et al., 2021)

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต ช่วยเปลี่ยนสารประกอบฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยอาศัยกลไกสำคัญคือ การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ช่วยละลายฟอสเฟตเพื่อให้พืชใช้งานได้ (Chen et al., 2006; Zeng et al., 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการบันทึกค่า pH ของส่วนใสที่ได้หลังจากการบ่มเชื้อ ซึ่งวิธีการดังกล่าวช่วยบ่งชี้ทางอ้อมว่ามีการผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างที่มีการเจริญในอาหารเหลว PVK ได้หรือไม่ (Elvia et al., 2008; Mendoza-Arroyo et al., 2020) จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.00 เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่า มีค่า pH ระหว่าง 4.27-5.73 แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียอาจผลิตกรดและเกิดการละลายฟอสฟอรัสมากขึ้น ดังที่มีการรายงานจากการศึกษาในแบคทีเรีย *Bacillus firmus* B-7650 และ B-7651 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว sucrose-calcium เป็นเวลา 10 วัน พบว่า มีการผลิตกรด 2-ketogluconic, succinic, oxalic ขึ้น (Banik and Dey, 1982) นอกจากนี้ มีรายงานว่า *Enterobacter aerogenes* สามารถผลิตกรด gluconic ได้ (Stella and Halimi, 2015) จากการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในจีนัส *Bacillus* และ *Enterobacter* เหมาะสมสำหรับนำมาศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการผลิต IAA

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากไหลสตรอร์เบอร์รี่สามารถผลิต IAA ในอาหารเหลว YM Broth ที่มีการเติม 0.1% L-tryptophan ได้เมื่อนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Salkowski's reagent และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน IAA (Table 1) พบว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดคือ ไอโซเลต DB041 มีค่าเท่ากับ 322.10 ± 0.87 µg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลต DB035 และ DB044 มีค่าเท่ากับ 264.28 ± 1.86 และ 264.19 ± 0.92 µg/ml ตามลำดับ แบคทีเรียมีชีวสังเคราะห์ที่ผ่านวิถี Tryptophan-dependent pathway และ Tryptophan-independent pathway (Patten and Glick., 2002) ในการทดลองนี้พบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลตผลิต IAA ได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อมีการเติม L-tryptophan ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Idris et al. (2007) ที่แสดงให้เห็นว่า tryptophan มีส่วนทำให้แบคทีเรียผลิต IAA ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติม tryptophan

แบคทีเรียเอนโดไฟต์หลายชนิดเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชอาศัยและผลิต IAA ทำให้รากเจริญได้ดีและช่วยเพิ่มพื้นที่รากเพื่อนำสารอาหารและแร่ธาตุในดินมาใช้ประโยชน์ (Spaepen et al., 2007) แบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด Khalifa et al. (2016) รายงานว่า แบคทีเรีย *Enterobacter* sp. MSR1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากต้นอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*) สามารถผลิต IAA ได้ เมื่อนำไปทดสอบด้วยการปลูกเชื้อ MSR1 ร่วมกับเมล็ดถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) พบว่า MSR1 สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของรากถั่วลันเตาได้เมื่อเปรียบเทียบกับความยาวรากและน้ำหนักแห้งของรากระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม นอกจากนี้ de Melo Pereira et al. (2012) ระบุว่า *B. subtilis* NA-108 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของส่วนต่าง ๆ ของพืชกับชุดควบคุม สำหรับجينัส *Microbacterium* นั้น นอกจากจะผลิต IAA ได้แล้วยังสามารถเจริญอยู่รอดในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักได้อีกด้วย (Corretto et al., 2020)

Table 1 Characterization of endophytic bacteria for plant growth promoting (PGP) traits

Bacterial isolate	Phosphate	pH	IAA production ($\mu\text{g/ml}$) ^{1/}	
	solubilization ($\mu\text{g/ml}$) ^{1/}	(supernatant-PVK)	YM	YM L-tryptophan
DB016	175.31 $\pm$ 2.09b	5.04	28.21 $\pm$ 0.80e	203.25 $\pm$ 1.13d
DB021	234.64 $\pm$ 2.64a	4.27	49.76 $\pm$ 0.90c	196.81 $\pm$ 1.00e
DB035	131.19 $\pm$ 1.93c	5.47	44.39 $\pm$ 1.74d	264.28 $\pm$ 1.86b
DB041	116.85 $\pm$ 2.59de	5.62	56.00 $\pm$ 2.12b	322.10 $\pm$ 0.87a
DB044	121.80 $\pm$ 2.59d	5.73	46.72 $\pm$ 0.19cd	264.19 $\pm$ 0.92b
DB051	109.60 $\pm$ 6.12e	4.75	67.59 $\pm$ 0.41a	256.57 $\pm$ 0.45c
DB065	0.00 $\pm$ 0.00g	6.84	10.20 $\pm$ 0.72g	20.93 $\pm$ 0.63f
DB071	120.93 $\pm$ 1.75d	4.78	23.65 $\pm$ 3.54f	24.94 $\pm$ 1.29f

^{1/}Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P < 0.05$ in Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา

วิธี dual culture assay

เชื้อราที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในดิน (*Rhizoctonia solani* และ *Fusarium* spp.) และเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยว (*Colletotrichum gloeosporioides*) สร้างความเสียหายให้กับพืชปลูกได้ ดังนั้น การคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติด้านการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ด้วย ในการทดลองนี้ ได้นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการผลิต IAA จำนวน 8 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture พบว่า ไอโซเลต DB065 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* 1406 ได้ดีที่สุดเท่ากับ 42.67 $\pm$ 1.59% ในขณะที่ไอโซเลต DB071 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 43.05 $\pm$ 0.18% และ 54.92 $\pm$ 0.26% ตามลำดับ (Table 2, Figure 1)

Table 2 Antifungal activity of selected bacterial isolates by dual culture

Bacterial isolate	Percentage inhibition of radial growth (%) ^{1/}		
	<i>R. solani</i> 1406	<i>Fusarium</i> sp. FB3-3	<i>C. gloeosporioides</i> DBCS-01
DB016	31.41±0.98c	29.71±0.45c	41.12±1.30b
DB021	2.56±2.56d	0.00±0.00g	5.87±2.05f
DB035	36.53±1.30b	20.59±1.51e	27.89±1.03c
DB041	38.58±0.59b	22.56±0.19d	14.34±4.46de
DB044	28.61±0.46c	10.09±0.20f	12.19±0.47e
DB051	31.00±0.19c	28.27±0.55c	45.66±0.45b
DB065	42.67±1.59a	38.72±0.30b	18.29±0.69d
DB071	37.61±0.59b	43.05±0.18a	54.92±0.26a

^{1/}Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at P<0.05 in Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

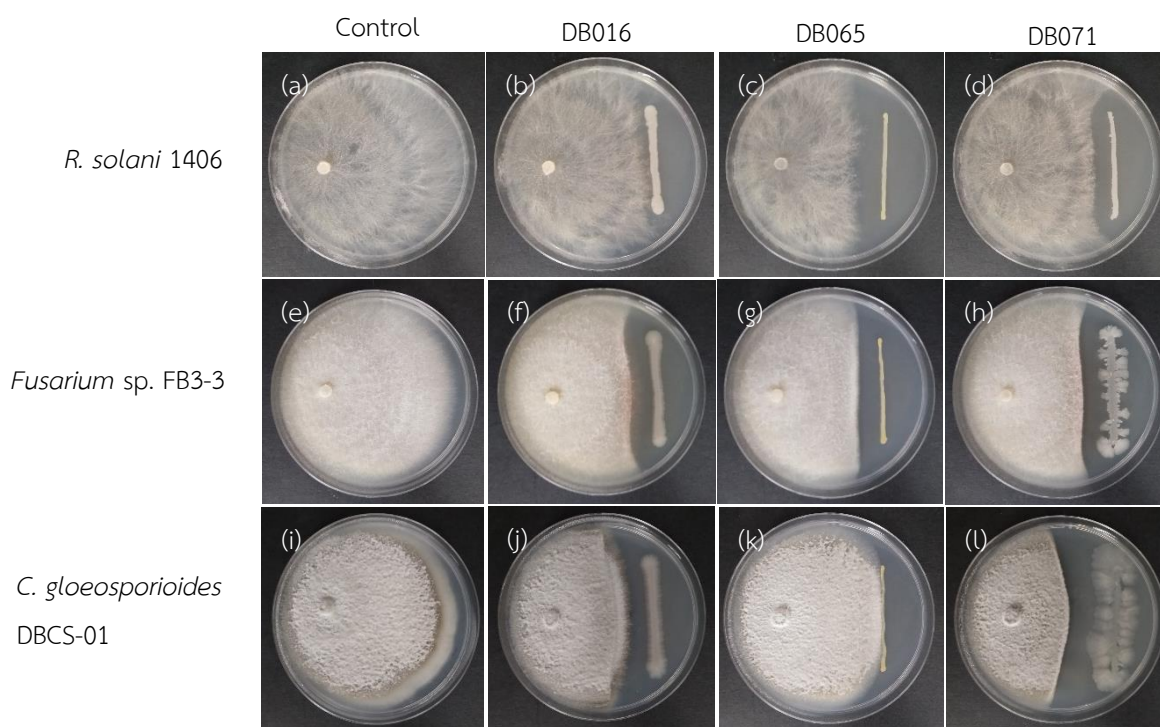


Figure 1 Antifungal activity of selected bacterial isolates a-d: Inhibition of *Rhizoctonia solani* 1406 on PDA at 4 days e-h: *Fusarium* sp. FB3-3 on PDA at 10 days i-l: *C. gloeosporioides* DBCS-01 on PDA at 14 days

มีการนำแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* หลายชนิดมาศึกษาการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในดิน เช่น *P. aeruginosa* (GRC~1) ที่แยกได้จากรากมันฝรั่ง โดยแบคทีเรียสามารถผลิต siderophore ชนิด hydroxamate และกรด hydrocyanic เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ (Gupta et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *P. aeruginosa* MML2212 สามารถ

ผลิต phenazine-1-carboxamide (PCN) เพื่อยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* ได้อีกด้วย (Shanmugaiah et al., 2010) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาโดย Devi et al. (2017) ระบุว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *P. aeruginosa* AL2-14B มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *Fusarium oxysporum* เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture assay

แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรค เช่น *R. solani*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* โดยมีการศึกษาเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า แบคทีเรียจีส *Bacillus* ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็งที่มี colloidal chitin เป็นส่วนประกอบ โดยสังเกตจากการปรากฏวงใสบริเวณรอบโคโลนีและเกิดบริเวณยับยั้งของเชื้อราสาเหตุโรค (Velusamy and Kim, 2011; Suryanto et al., 2014) นอกจากนี้ การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว สามารถทดสอบได้จากการนำน้ำเลี้ยงมาทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion อีกด้วย (Velusamy and Kim, 2011) จากผลการศึกษาที่ผ่านมา อาจเป็นแนวทางที่ชี้ให้เห็นว่า กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของไอโซเลต DB065 และ DB071 ที่ได้จากการทดลองนี้ จะต้องทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

วิธี Agar well diffusion

จากการนำน้ำเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ที่ผ่านการกรองมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราพบว่า น้ำเลี้ยงจากไอโซเลต DB071 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทุกชนิดและเป็นเพียงไอโซเลตเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *R. solani* 1406 ได้ ทั้งนี้ ผลการยับยั้งดังกล่าวไม่แตกต่างจากชุดควบคุม เมื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อราด้วยน้ำเลี้ยงจากไอโซเลต DB016 และไอโซเลต DB071 ในอาหารสูตร T1 และ T2 ปรากฏว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 ได้ไม่แตกต่างกัน (Table 3) บริเวณวงใสที่แสดงบนจานอาหารแข็งทดสอบปรากฏในลักษณะบริเวณวงใสชัดเจนและบริเวณวงใสบางส่วน แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ในการต้านเชือรานั้น ขึ้นอยู่กับกลไกและชนิดของสารต้านเชื้อรา ซึ่งจะต้องทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป (Figure 2)

Table 3 Antifungal activity of selected bacterial isolates by Agar well diffusion

Cell-free Supernatant	Media ^{3/}	Diameter of inhibition zone (mm) ^{1/2/}		
		<i>R. solani</i> 1406	<i>Fusarium</i> sp. FB3-3	<i>C. gloeosporioides</i> DBCS-01
DB016	(T1)	0.00±0.00b	17.10±0.42b	23.63±0.54ab
	(T2)	0.00±0.00b	18.25±0.22ab	25.23±0.23a
	(T3)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	12.33±0.23ij
	(LB)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	11.57±0.18j
	(NB)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	14.27±0.97gh
DB021	(T1)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	23.73±0.33ab
	(T2)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	17.83±0.79ef
DB051	(T1)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	23.82±0.30ab
	(T2)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	21.05±0.23c
	(T3)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	13.77±0.70hi
DB071	(T1)	0.00±0.00b	17.33±0.09b	23.17±0.23b
	(T2)	21.15±0.16a	18.53±0.50a	23.97±0.81ab
	(T3)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	19.97±0.92cd
	(LB)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	15.80±0.44g
	(NB)	0.00±0.00b	0.00±0.00c	17.50±0.15f
Control ^{4/}	-	20.80±0.42a	0.00±0.00c	19.20±0.64de

^{1/} Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at P<0.05 in Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} Diameter of inhibition zone *R. solani* 1406 for 4 days, *Fusarium* sp. FB3-3 and *C. gloeosporioides* DBCS-01 for 2 days

^{3/} T1 (Kwon and Kim, 2014), T2 (Sohn et al, 2008), T3 (Li et al., 2016), NB (Guo et al., 2014) and LB (Li et al., 2012)

^{4/} Control = cycloheximide (20 µg/disc)

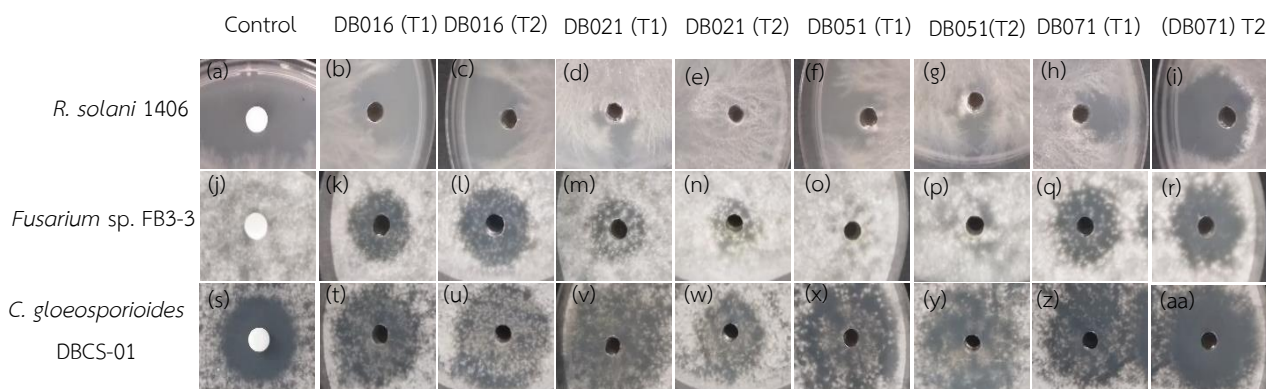


Figure 2 Antifungal activity of selected bacterial isolates by Agar well diffusion a-i: Inhibition of *Rhizoctonia solani* 1406 on PDA j-r: *Fusarium* sp. FB3-3 on PDA s-aa: *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 on PDA Control = cycloheximide (20 µg/disc)

ไอโซเลต DB016 และไอโซเลต DB071 ที่ได้จากการทดลองนี้ ได้รับการจำแนกชนิดและจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* ซึ่งจีนัสดังกล่าวได้มีการรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิดด้วยการผลิตสารกลุ่ม lipopeptides ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในจีนัส *Colletotrichum*, *Fusarium* และ *Rhizoctonia* ได้ (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan et al. 2021; Huang et al., 2022) อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *B. subtilis* บางสายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ส่งผลให้มีการผลิตสารกลุ่ม lipopeptides ได้หลายชนิดแตกต่างกัน (Dunlap et al., 2011; Kwon and Kim, 2014) นอกจากนี้ ได้มีรายงานว่า จีนัส *Bacillus* อาทิ *B. subtilis* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารในกลุ่ม macrolactin ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีคีไทด์ โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* อีกด้วย (Li et al., 2016)

สำหรับไอโซเลต DB021 นั้นจัดอยู่ใน *Microbacterium* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ไม่แตกต่างจากไอโซเลต DB016, DB051 และ DB071 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร T1 เมื่อไม่นานมานี้ มีการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรียจีนัส *Microbacterium* โดย Ouertani et al. (2020) ซึ่งระบุว่า มียีนสำคัญหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การผลิตไลติกเอนไซม์รวมถึงยีนที่สังเคราะห์สารประกอบโพลีคีไทด์ ซึ่งสนับสนุนแนวคิดที่ว่า ไอโซเลต DB021 อาจเป็นตัวแทนของจีนัสดังกล่าวที่สามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและควบคุมโรคพืชสำหรับสตรอว์เบอร์รี่ต่อไป

การจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟต์

จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบางประการ ได้นำแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่า สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ *Bacillus subtilis* DB016, *Bacillus siamensis* DB051, *B. siamensis* DB071, *Microbacterium enclense* DB021, *Pseudomonas aeruginosa* DB065, *Enterobacter quasirogerkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 และ *Enterobacter* sp. DB044 (Table 4)

Table 4 Similarity of nucleotide sequences of 16S rRNA gene sequence against database using EzBioCloud program

Bacterial Isolate	Accession number	Closely Related Species	Similarity (%)	Completeness (%)	Identified Bacteria
DB016	ON394615	<i>Bacillus subtilis</i> strain NCIB 3610	99.86	100	<i>Bacillus subtilis</i>
DB021	ON394616	<i>Microbacterium enclense</i> strain NIO-1002	100	100	<i>Microbacterium enclense</i>
DB035	MK530207	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i> strain WCHECL-1060	99.86	100	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>
DB041	MK537359	<i>Enterobacter chengduensis</i> strain WCHECL-C4	99.86	100	<i>Enterobacter</i> sp.
DB044	MK537360	<i>Enterobacter chengduensis</i> strain WCHECL-C4	99.73	100	<i>Enterobacter</i> sp.
DB051	ON394617	<i>Bacillus siamensis</i> strain KCTC 13613	99.86	100	<i>Bacillus siamensis</i>
DB065	ON394618	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain JCM 5962	100.00	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DB071	ON394619	<i>Bacillus siamensis</i> strain KCTC 13613	99.86	100	<i>Bacillus siamensis</i>

แบคทีเรียเอนโดไฟต์หลายชนิดถูกนำมาคัดกรองคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและมีการจำแนกชนิดก่อนนำไปศึกษาระดับโรงเรือน โดยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่อยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Enterobacter* ได้มีการรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเป็นจำนวนมาก รวมถึงการประเมินประสิทธิภาพเพื่อนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพและสารชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคพืช (Woźniak et al., 2019; Cui et al., 2020; Cipriano et al., 2021)

สรุป

จากการแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีจำนวน 264 ไอโซเลตพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบางประการ ได้แก่ ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและความสามารถในการผลิต IAA รวมถึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อราเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่ได้รับจากการศึกษานี้จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium* และ *Pseudomonas* ทั้งนี้ จะนำไอโซเลตที่มีศักยภาพดีที่สุดไปทดสอบร่วมกับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รีในระดับโรงเรือน ไอโซเลตที่จะนำไปพัฒนาเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพเพื่อลดความรุนแรงของโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตของสตรอว์เบอร์รีตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการ “พัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.)” รหัสโครงการ วิจัย “6022093” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาโทเพื่ออุตสาหกรรมและวิสาหกิจชุมชน ท่องเที่ยวเชิงเกษตรเขาคว่ำซึ่งเป็นผู้ร่วมให้ทุน และขอขอบคุณ Professor Bernard Dell ที่ช่วยปรับปรุงบทความฉบับภาษาอังกฤษ

เอกสารอ้างอิง

- คลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1. 2562. โรคเหี่ยวสตรอเบอรี่. จาก แหล่งข้อมูล: <http://oard1.doa.go.th/pdf>. สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2565.
- ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวรงค์, เป็ญ จารัตต ทองยี่น, เวช เต้จ๊ะ, สาวิตรี ทิววงศ์ และ Hiroshi Akagi. 2554. สตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 56(1): 22-28.
- Adeleke, B.S., O.O. Babalola, and B.R. Glick. 2021. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*. 20: 100433.
- Ali, S., T.C. Charles, and B.R. Glick. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*. 80: 160-167.
- 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 annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*. 62(2): 805-810.
- Banik, S., and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*. 69(3): 353-364.
- Barman, D., and M.S. Dkhar. 2019. Plant Growth-Promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Costus speciosus* in tropical deciduous forest of eastern Himalaya. In *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 89(3): 841-852.
- Borah, M., S. Das, S.S. Bora, R.C. Boro, and M. Barooah. 2021. Comparative assessment of multi-trait plant growth-promoting endophytes associated with cultivated and wild *Oryza* germplasm of Assam, India. *Archives of Microbiology*. 203(5): 2007-2028.
- Brader, G., S. Compant, B. Mitter, F. Trognitz, and A. Sessitsch. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 27: 30-37.
- Campodónico, V.L., N.J. Llosa, M. Grout, G. Döring, T. Maira-Litrán, and G.B. Pier. 2010. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infection and Immunity*. 78(2): 746-755.
- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai, and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil Ecology*. 34(1): 33-41.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran, and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1720-1726.
- Cipriano, M.A.P., R.D.P. Freitas-Lório, M.R. Dimitrov, S.A.L. de Andrade, E.E. Kuramae, and A.P.D.D. Silveira. 2021. Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar N-metabolites in sugarcane seedling. *Microorganisms*. 9(3): 479.

- Corretto, E., L. Antonielli, A. Sessitsch, C. Höfer, M. Puschenreiter, S. Widhalm, K. Swarnalakshmi, and G. Brader. 2020. Comparative genomics of *Microbacterium* species to reveal diversity, potential for secondary metabolites and heavy metal resistance. *Frontiers in Microbiology*. 1869.
- Cossus, L., F. Roux-Dalvai, I. Kelly, T.T.A. Nguyen, H. Antoun, A. Droit, and R.J. Tweddell. 2021. Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. *Biological Control*. 154: 104497.
- Cui, L., C. Yang, L. Wei, T. Li, and X. Chen. 2020. Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab. *Biological Control*. 141: 104156.
- De Curtis, F., G. Lima, D. Vitullo, and V. De Cicco. 2010. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Protection*. 29(7): 663-670.
- de Melo Pereira, G.V., K.T. Magalhães, E.R. Lorenzetti, T.P. Souza, and R.F. Schwan. 2012. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microbial Ecology*. 63(2): 405-417.
- Devi, K.A., G. Pandey, A.K.S. Rawat, G.D. Sharma, and P. Pandey. 2017. The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1897.
- Dunlap, C.A., D.A. Schisler, N.P. Price, and S.F. Vaughn. 2011. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of Fusarium head blight. *The Journal of Microbiology*. 49(4): 603-609.
- Egamberdieva, D., S.J. Wirth, V.V. Shurigin, A. Hashem, and E.F. Abd_Allah. 2017. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1887.
- 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.
- Elvia, J.C., P. Ortega-Rodés, and E. Ortega. 2008. Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(1): 111-121.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*. 41(2): 109-117.
- Guo, Q., W. Dong, S. Li, X. Lu, P. Wang, X. Zhang, Y. Wang, and P. Ma. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*. 169(78): 533-540.
- Gupta, C.P., A. Sharma, R.C. Dubey, and D.K. Maheshwari. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* (GRC~ 1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. *Cytobios-Cambridge*. 99(392):183-189.
- Hallmann, J., and G. Berg. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Microbial Root Endophytes*. 15-31.
- Huang, Y., X. Zhang, H. Xu, F. Zhang, X. Zhang, Y. Yan, L. He, and J. Liu. 2022. Isolation of lipopeptide antibiotics from *Bacillus siamensis*: A potential biocontrol agent for *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 99(999): 1-9.

- Hussain, T., and A.A. Khan. 2021. Biocontrol prospective of *Bacillus siamensis*-AMU03 against Soil-borne fungal pathogens of potato tubers. *Indian Phytopathology*. 1-11.
- Idris, E.E., D.J. Iglesias, M. Talon, and R. Borriss. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(6): 619-626.
- Jumpathong, J., N. Nuengchamnong, K. Masin, N. Nakaew, and N. Suphrom. 2019. Thin layer chromatography-bioautography assay for antibacterial compounds from *Streptomyces* sp. TBRC 8912, a newly isolated actinomycin D producer. *Chiang Mai Journal of Science*. 46: 839-849.
- Khalifa, A.Y., A.M. Alsyeeh, M.A. Almalki, and F.A. Saleh. 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23(1): 79-86.
- Khan, Z., and S.L. Doty. 2009. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and Soil*. 322(1): 197-207.
- Kwon, J.W., and S.D. Kim. 2014. Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that suppresses *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(1): 13-18.
- Li, L., M. Ma, R. Huang, Q. Qu, G. Li, J. Zhou, K. Zhang, K. Lu, X. Niu, and J. Luo. 2012. Induction of chlamydospore formation in *Fusarium* by cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* C2. *Journal of Chemical Ecology*. 38(8): 966-974.
- Li, W., X.X. Tang, X. Yan, Z. Wu, Z.W. Yi, M.J. Fang, X. Su, and Y.K. Qiu. 2016. A new macrolactin antibiotic from deep sea-derived bacteria *Bacillus subtilis* B5. *Natural Product Research*. 30(24): 2777-2782.
- Ludueña, L.M., M.S. Anzuay, J.G. Angelini, M. McIntosh, A. Becker, O. Rupp, A. Goesmann, J. Blom, A. Fabra, and T. Taurian. 2019. Genome sequence of the endophytic strain *Enterobacter* sp. J49, a potential biofertilizer for peanut and maize. *Genomics*. 111(4): 913-920.
- Majeed, A., M.K. Abbasi, S. Hameed, A. Imran, and N. Rahim. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*. 6: 198.
- Mendoza-Arroyo, G.E., M.J. Chan-Bacab, R.N. Aguila-Ramírez, B.O. Ortega-Morales, R.E. Canché Solís, A.O. Chab-Ruiz, K.I. Cob-Rivera, B. Dzib-Castillo, R.E. Tun-Che, and J.C. Camacho-Chab, 2020. Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*. 10(9): 383.
- Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13(3): 638-649.
- Montealegre, J. R., R. Reyes, L.M. Pérez, R. Herrera, P. Silva, and X. Besoain. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(2): 115-127.
- Mukherjee, S., and D.B. Kearns. 2014. The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*. 48: 319-340.

- Murphy, J., and J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
- Ouertani, R., A. Ouertani, M. Mahjoubi, Y. Bousselmi, A. Najjari, H. Cherif, A. Chamkhi, A. Mosbah, H. Khdhira, H. Sghaier, H. Chouchane, A. Cherif, and M. Neifar. 2020. New plant growth-promoting, chromium-detoxifying *Microbacterium* species isolated from a tannery wastewater: performance and genomic insights. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 521.
- Passari, A.K., V.K. Mishra, V.K. Gupta, M.K. Yadav, R. Saikia, and B.P. Singh. 2015. In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS one*. 10(9): e0139468.
- Pattern, C.L., and B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* in lactic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3795-3801.
- Rashid, S., T.C. Charles, and B.R. Glick. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*. 61: 217-224.
- Rojas-Solís, D., E. Zetter-Salmón, M. Contreras-Pérez, M. del Carmen Rocha-Granados, L. Macías-Rodríguez, and G. Santoyo. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13: 46-52.
- Sainju, U.M., and S.Y. Alasinrin. 2020. Changes in soil chemical properties and crop yields with long-term cropping system and nitrogen fertilization. *Agrosystems, Geosciences & Environment*. 3(1): e20019.
- Santoyo, G., G. Moreno-Hagelsieb, M. del Carmen Orozco-Mosqueda, and B.R. Glick. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183: 92-99.
- Shanmugaiyah, V., N. Mathivanan, and B. Varghese. 2010. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *Journal of Applied Microbiology*. 108(2): 703-711.
- Sohn, M.J., C.J. Zheng, and W.G. Kim. 2008. Macrolactin S, a new antibacterial agent with Fab G-inhibitory activity from *Bacillus* sp. AT28. *The Journal of Antibiotics*. 61(11): 687-691.
- Spaepen, S., and J. Vanderleyden. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3(4): a001438.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31(4): 425-448.
- Stella, M., and M. Halimi. 2015. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. 43(1): 41-53.
- Suryanto, D., S. Wahyuni, E.B.M. Siregar, and E. Munir. 2014. Utilization of chitinolytic bacterial isolates to control anthracnose of cocoa leaf caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *African Journal of Biotechnology*. 13(15): 1631-1637.

- Susilowati, A.R.I., A.T. Wahyudi, Y. Lestari, A. Suwanto, and S. Wiyono. 2011. Potential *Pseudomonas* isolated from soybean rhizosphere as biocontrol against soilborne phytopathogenic fungi. HAYATI Journal of Biosciences. 18(2): 51-56.
- Velusamy, P., and K.Y. Kim. 2011. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. International Research Journal of Microbiology. 2(6): 206-214.
- Woźniak, M., A. Gałązka, R. Tyśkiewicz, and J. Jaroszek-Ścisł. 2019. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biotest microplate™ test. International Journal of Molecular Sciences. 20(21): 5283.
- Xu, Q., N. Ling, H. Chen, Y. Duan, S. Wang, Q. Shen, and P. Vandenkoornhuyse. 2020. Long-term chemical-only fertilization induces a diversity decline and deep selection on the soil bacteria. Msystems. 5(4): e00337-20.
- Yan, X., Y.X. Zhou, X.X. Tang, X.X. Liu, Z.W. Yi, M.J. Fang, Z. Wu, F.Q. Jiang, and Y.K. Qiu. 2016. Macrolactins from marine-derived *Bacillus subtilis* B5 bacteria as inhibitors of inducible nitric oxide and cytokines expression. Marine Drugs. 14(11): 195.
- Zeng, Q., X. Wu, and X. Wen. 2016. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2, and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. Annals of Microbiology. 66(4): 1343-1354.
- Zhang, N., K. Wu, X. He, S.Q. Li, Z.H. Zhang, B. Shen, X.M. Yang, R.F. Zhang, Q.W. Huang, and Q.R. Shen. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. Plant and Soil. 344(1): 87-97.