



การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม

Screening and efficacy of endophytic bacteria for inhibition of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing canker disease of Tup Tim Siam Pomelo

ชัยสิทธิ์ ปรีชา¹, นภัสวรรณ เลี่ยมนิมิตร¹ และ พรศิลป์ สีเผือก^{1*}

Chaisit Preecha¹, Napassawan Liamnimitr¹ and Pornail Seephueak^{1*}

¹ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จ. นครศรีธรรมราช

¹ Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat Campus, Nakhon Si Thammarat

บทคัดย่อ: โรคแคงเกอร์ของส้มโอเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เป็นปัญหารุนแรงและสำคัญในการปลูกพืชตระกูลส้ม เชื้อเข้าทำลายใบ กิ่ง และผลส้มโอ เกิดเป็นแผลจุดสีเหลือง ตกสะเก็ด การนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคจะช่วยลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ เพื่อควบคุมเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion และ agar well diffusion พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุเท่ากับ 77.17 และ 72.53% เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ส่วนการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 75.73 และ 72.97% ผลการตรวจติดตามอัตราการรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบส้มโอทับทิมสยามหลังพ่นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มโอทับทิมสยามทั้ง 2 ชุดการทดลอง หลังทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทุกๆ 15 วัน คือ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน พบว่า เชื้อสาเหตุโรคนี้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* และเจริญแข่งขันด้านแหล่งที่อยู่อาศัยได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค

คำสำคัญ: แบคทีเรียเอนโดไฟท์; การควบคุม; โรคแคงเกอร์; ส้มโอทับทิมสยาม

ABSTRACT: Canker disease of pomelo caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. is a serious disease and a major problem in *Citrus* spp. Pathogens can infect leaves, branches and fruits, citrus canker symptoms are mostly yellow spot and scab. Biological control by endophytic bacteria will decrease disease and reduce the use of chemicals causing harm to the environment. This research aimed to screen antagonistic endophytic bacteria for control *X. citri* subsp. *citri* in laboratory conditions. The effectiveness of endophytic antagonists to control canker disease were tested in a laboratory by paper disc diffusion and agar well diffusion method. The results showed that endophytic bacteria, S1-4 and S3-5 gave the highest percentage of inhibition. The inhibition value of S1-4 and S3-5 were 77.17 and 72.53%, respectively, measured by paper disc diffusion and 75.73 and 72.97%, respectively, measured by agar well diffusion. The survival and colonization of endophytic bacteria on the Tup Tim Siam pomelo leaf surface were monitored after being sprayed with bacterial suspension. The results, found that survival rate and colonization are different two set of experiments of Tup Tim Siam pomelo leaves were randomly collected after inoculation with the pathogen every 15 days at 0, 15, 30, 45, and 60 days. The populations of pathogens were less than endophytic

* Corresponding author: pornsil.s@rmutsv.ac.th

Received: date; December 21, 2022 Accepted: date; June 15, 2023 Published: date; September 28, 2023

bacteria. This study showed that the endophytic bacteria S1-4 and S3-5 have a high potential for control of citrus canker caused by *X. citri* subsp. *citri*.

Keywords: endophytic bacteria; control; canker disease; Tup Tim Siam Pomelo

บทนำ

ส้มโอทับทิมสยาม (*Citrus maxima* cv. 'Tub Tim Siam' (Burm.) Merr.) เป็นส้มโอสายพันธุ์ท้องถิ่นของอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ขึ้นทะเบียนเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indication, GI) ลักษณะประจำพันธุ์ คือ เนื้อสีชมพู ค่อนข้างแดง หรือมีเนื้อสีแดงเข้มเหมือนสีทับทิม รสชาติหวานนุ่ม เนื้ออ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ ผิวผลส้มโอมีขนอ่อนปกคลุมคล้ายกำมะหยี่ (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7, 2552) ปัจจุบันเป็นที่ต้องการของตลาดและผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย ผลส้มโอมีมูลค่าสูง ราคาจำหน่ายหน้าสวน กิโลกรัมละ 150-200 บาท จึงทำให้เกษตรกรทั้งในและนอกพื้นที่สนใจและหันมาปลูกส้มโอทับทิมสยามมากขึ้น พื้นที่ปลูกส้มโอในจังหวัดนครศรีธรรมราช มีประมาณ 22,000 ไร่ ให้ผลผลิตแล้ว 18,000 ไร่ สร้างรายได้ประมาณ 100 ล้านบาท โดยในอำเภอปากพนัง มีเกษตรกรปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พื้นที่ 67.5 ไร่ จำนวนเกษตรกร 40 ราย (อุทัย และ ขวัญชนก, 2565)

โรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) ก่อให้เกิดความเสียหายกับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก พบระบาดทุกระยะของการเจริญเติบโต และมักเข้าทำลายอย่างรุนแรงในช่วงฤดูฝน เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เชื้อเข้าทำลายได้ทุกส่วนของส้มโอ เช่น ใบ กิ่ง ลำต้น และผล หากเชื้อเข้าทำลายส่วนของใบและกิ่ง พืชจะแสดงอาการแผลจุดตกสะเก็ด เกิดโรครภายใน 10-12 วัน และหากเชื้อสาเหตุเข้าทำลายลำต้น ทำให้ต้นแสดงอาการทรุดโทรม ใบร่วง ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ (Leksomboon et al., 2001) การป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ เบื้องต้นเกษตรกรนิยมใช้สารเคมี เช่น คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องจะทำให้เชื้อเกิดความต้านทาน และก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จากปัญหาข้างต้น ปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจนำการควบคุมโรคด้วยชีววิธีมาใช้มากขึ้น

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิต โดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Sturz et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถเจริญแก่งแย่งพื้นที่อาศัย ผลิตสารปฏิชีวนะ หรือสารบางชนิดออกมา เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค หรือสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (defense-related gene) ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรค (Gaiero et al., 2013) ทั้งนี้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคแบบยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเมล็ดเปลือยและพืชดอกบางชนิดสามารถยับยั้ง *X. citri* subsp. *citri* (Islam et al., 2019; จรัสลักษณ์ และคณะ, 2563) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบ กิ่ง ราก และรากฝอยที่ติดอยู่กับดินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์

เก็บตัวอย่างใบส้มโอทับทิมสยามที่มีลักษณะของโรคแคงเกอร์ จากสวนส้มโอทับทิมสยามในพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ฆ่าเชื้อที่ผิวใบส้มโอด้วยแอลกอฮอล์ 70% ตัดชิ้นใบส่วนที่เป็นโรค ขนาด 3 × 3 มล. ผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำของเหลวที่ได้มาแยกเชื้อด้วยวิธี streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชม. คัดเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองที่เจริญบนอาหาร NA และนำโคโลนีสีเหลืองดังกล่าวทดสอบเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Modified Wakimoto's medium (M-PPA), Modified medium for *X. campestris* pv. *phaseoli* (M-MXP) และ Yeast extract dextrose CaCO₃ (YDC) ศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร เพื่อยืนยันขั้นต้นว่าเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรค หลังจากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบการเกิดโรค โดยการปลูกเชื้อบนใบส้มโอทับทิมสยามด้วยวิธี detached leaf (นพพล, 2551) พิสูจน์โรค

ตามกรรมวิธี Koch's postulation และตรวจยืนยันเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ อมรรรัตน์ และคณะ (2561)

การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างใบ กิ่ง และราก ซึ่งไม่แสดงอาการโรคในแปลงปลูกส้มโอทับทิมสยามของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาล้างทำความสะอาด ส่วนของกิ่งและรากตัดเป็นท่อน ประมาณ 1 ซม. ส่วนใบจะทำการตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 x 5 มม. ส่วนตัวอย่างรากฝอยที่ติดอยู่กับดินของต้นส้มโอทับทิมสยาม (นำตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด โดยล้างผ่านน้ำไหล เพื่อเอาดินที่ติดมากับรากฝอยออก) ตัดเป็นท่อน ยาวประมาณ 1 ซม. และฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของตัวอย่างพืช โดยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำตัวอย่างพืชที่เตรียมได้อย่างละ 10 ก. ใส่ในโถงและบดให้ละเอียด (หยดน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1-2 มล. เพื่อให้บดได้ง่าย) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ 100 มล. เจือจางเชื้อด้วยวิธี dilution plate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} และนำมาเกลี่ยบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 48 ชม. เมื่อเชื้อเจริญให้แยกเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ (จรัสลักษณ์ และคณะ, 2563; วราภรณ์ และ บุชญา, 2562)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอทับทิมสยาม บนอาหาร NGA อายุ 48 ชม. โดยตรวจสอบลักษณะต่างๆ ได้แก่ สี และลักษณะรูปร่างสัโคโลนี คุณสมบัติการติดสี (Gram's stain) และรูปร่างเซลล์ ตามวิธีการของ Schaad (1988) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือการทดสอบการใช้ออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยา catalase production, motility, starch hydrolysis, levan formation, lipolytic activity test (Tween 80), salt tolerance, endospore forming, potato soft rot, citrate utilization, gelatin hydrolysis และ oxidase test (Gerhardt, 1981) โดยใช้วิธี API® 50 CHB และนำผลที่ได้อ่านผลจากฐานข้อมูล apiweb® (<https://apiweb.biomerix.com>) (ชัยสิทธิ์ และคณะ, 2553) และการจำแนกระดับสปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. เพื่อใช้ประกอบการยืนยันสายพันธุ์ (พรพรรณ, 2550)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri*

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละสายพันธุ์ ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 20 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชม. ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (cell suspension) โดยวัดการดูดกลืนแสง (O.D.=0.2) ที่ความยาวคลื่น 600 nm มีเชื้อโดยประมาณ 10^8 cfu/ml จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion และ agar well diffusion ตามลำดับ

ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ผสมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 มล. ลงในขวดที่บรรจุอาหาร NA และเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วหยดเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมข้างต้น ปริมาตร 10 µl หยดลงบน paper disc (กระดาษกรองเบอร์ 1) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 4 ชิ้นต่อจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชม. บันทึกผลการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบในกรรมวิธีทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองชุดละ 5 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและหาความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละไอโซเลทโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) $\text{ค่าความเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{ชุดทดสอบ (R1)} - \text{ชุดควบคุม (R2)}}{\text{ชุดทดสอบ (R1)}} \times 100$ เมื่อ R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางความกว้างบริเวณที่ยับยั้งได้ทั้งหมด และ R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดกระดาษกรองกลม

ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เลี้ยงเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกับวิธี paper disc diffusion หลังจากเทอาหารลงในจานและปล่อยให้ผิวหน้าแห้ง เจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะหลุมอาหารจำนวน 4 จุด (วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) แล้วหยดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เตรียมแต่ละหลุม นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชม. (รัชฎาภรณ์ และ สุดฤดี, 2548) สังเกตบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหาร

ทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อหยดลงในหลุมทดสอบแทน ตรวจและบันทึกผล นำข้อมูลมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) วิเคราะห์หาความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติ โดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

การศึกษาประชากรเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์และเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บริเวณผิวใบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri* และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชม. ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (cell suspension) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นพ่นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ลงบนต้นส้มโอทับทิมสยามที่ปลูกในกระถางอายุประมาณ 6 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 พ่นเฉพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์อย่างเดียว และชุดการทดลองที่ 2 พ่นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์และตามด้วยการปลูกเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่ปรับค่าความขุ่น เท่ากับ 0.2 O.D. (10^8 cfu/ml) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4, กรรมวิธีที่ 2 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S3-5 และกรรมวิธีที่ 3 กรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ใบ จากนั้นย้ายต้นส้มโอทับทิมสยามที่ผ่านการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ไปเก็บรักษาไว้ในสภาพธรรมชาติ สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มโอทับทิมสยามทั้ง 2 ชุดการทดลอง หลังทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ 15 วัน คือ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน จากนั้นตรวจสอบจำนวนประชากรเชื้อที่ผิวใบ โดยการนำตัวอย่างใบส้มโอดูดซับด้วยวิธี Leaf wash technique ดัดแปลงจาก วิลลาร์ธน์ (2551) ทำการเจือจางความเข้มข้นของน้ำล้างใบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำล้างใบแต่ละความเจือจาง ปริมาตร 100 μ l หยดลงบนจานอาหาร NA และทำการ spread plate ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและนำมาคำนวณเป็นค่า cfu/ml

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์

เมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ จากลักษณะอาการแผลจุดบนใบส้มโอทับทิมสยาม สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ทั้งหมดจำนวน 48 ไอโซเลท พบโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA มีสีเหลือง ผิวมันวาว กลมมน ขอบเรียบ โคโลนีที่เจริญบนอาหาร M-MXP มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน กลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน และขอบเรียบ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีที่เจริญบนอาหาร M-PPA มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน กลม นูน ผิวเรียบเป็นมันเยิ้ม และขอบเรียบ ไม่สร้างสปอร์ และโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร YDC สร้างโคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงสีเหลืองเข้ม สร้าง Pigment สีเหลือง Xanthomonadin เป็นมันนูนขอบเรียบ เซลล์มีรูปร่างแท่งและติดสีแกรมลบ (Figure 1) ซึ่งมีตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อทดสอบการเกิดโรคโดยวิธี detached leaf และพิสูจน์โรคตามกรรมวิธีของ Koch พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้สามารถทำให้เกิดแผลบนใบส้มโอทับทิมสยามหลังปลูกเชื้อ เป็นเวลา 7 -14 วัน ปรากฏอาการแผลแคงเกอร์ของส้มโอ (Figure 2) ที่เกิดจากเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* (ฉันทภูมิมา และคณะ, 2560; Naqvi et al., 2022) และผลตรวจยืนยันเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ XACF (5'- CGTCGCAATACGATTGGAAC-3' และ XACR (5'- CGGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3') ที่จำเพาะบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 512 คู่เบส บน agarose gel 1.5% ซึ่งตรงกับการศึกษาของ อมรรัตน์ และคณะ (2561) รายงานว่า การตรวจสอบเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 16S rDNA พบแถบดีเอ็นเอขนาด 512 คู่เบส

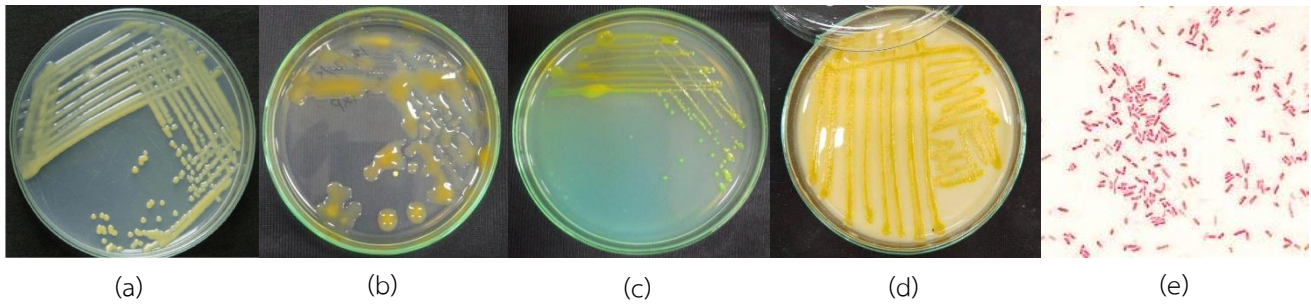


Figure 1 Colonies of *X. citri* subsp. *citri* on NA media (a), M-MXP (b), M-PPA (c) YDC (d) and cell of bacteria (e)

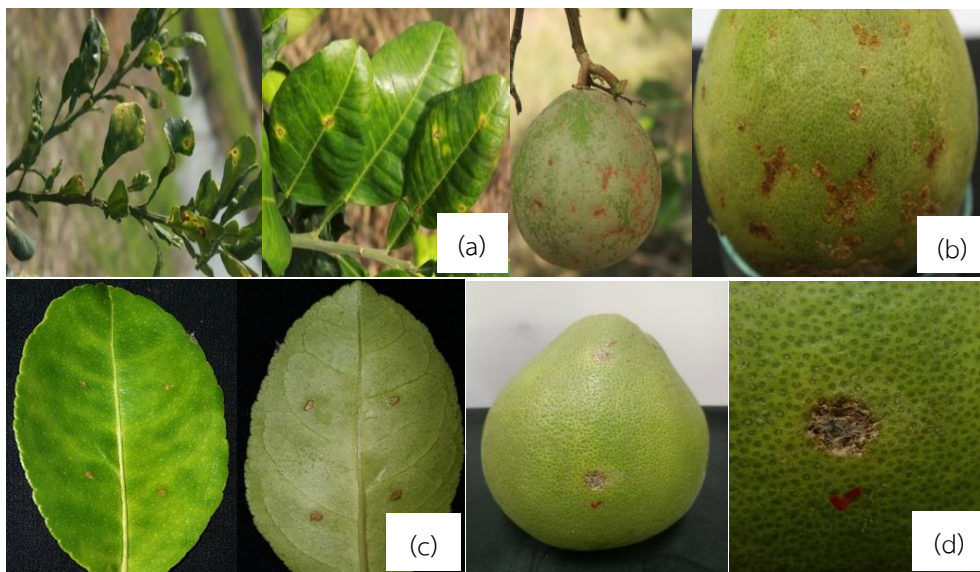


Figure 2 Canker diseases on leaf (a) and fruits (b) of Tup Tim Siam Pomelo caused by *X. citri* subsp. *citri* and Koch's postulates were confirmed canker disease on leaves (c) and fruits (d)

การแยกเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์จากดินและส่วนต่าง ๆ ของต้นส้มโอ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์ รวมทั้งหมด 208 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น ราก ใบ กิ่ง และรากผอย (ติดมากับดิน) จำนวน 80, 57, 51 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ (Table 1) จำนวนแบคทีเรียแอนโตไฟท์ที่แยกได้ค่อนข้างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Doungfu et al. (2019) รายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์ 170 ไอโซเลท จากดินและส่วนต่าง ๆ จากพืชตระกูลส้มที่ไม่เป็นโรค โดยพบมากที่สุดบนกิ่ง ใบ และราก โดยที่ 77.65% เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ 22.35% เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์ที่แยกได้ จำนวน 208 ไอโซเลท แบ่งตามลักษณะของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก สีขาวผิวด้าน จำนวน 80 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีลักษณะโคโลนิ่มันเยิ้ม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น จำนวน 75 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีลักษณะโคโลนิ่มิวด้าน ตรงกลางยุบตัว ขอบเรียบ สีขาวขุ่น จำนวน 53 ไอโซเลท (Figure 3) Senthikumar et al. (2011) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียแอนโตไฟท์ที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในเนื้อเยื่อพืช และไม่ทำให้เกิดโรคกับพืช ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าสู่พืชได้หลายทาง เช่น ปากใบ รอยแตกของเซลล์ บาดแผล และราก เป็นต้น ชนิดของแบคทีเรียแอนโตไฟท์ที่มีรายงานว่ามีรายงานว่า สามารถยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ ได้แก่ *Bacillus velezensis* (Rabbee et al., 2019), *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* (Wang et al., 2022)

Table 1 The number of endophytic bacteria isolates from Tup Tim Siam Pomelo plantations

Samples	Number of isolates	Sampling Sources
Leaves	30	Plot No. 1
Leaves	27	Plot No. 2
Twig	25	Plot No. 2
Twig	26	Plot No. 4
Roots	36	Plot No. 2
Roots	44	Plot No. 1
Fibrous root	20	Plot No. 3
Total	208	

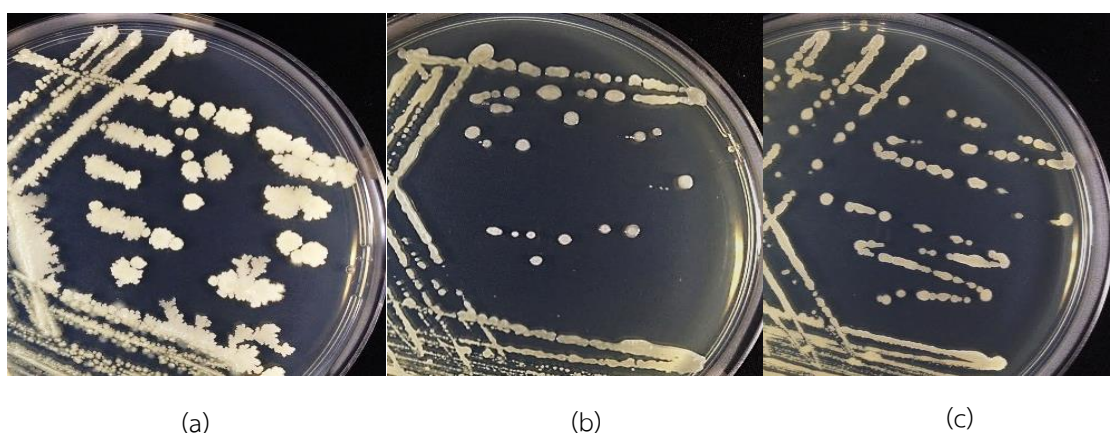


Figure 3 Colonies of endophytic bacteria on NA; irregular shape, rough opaque, jagged edges (a); colonies flat or slightly convex, gray- white (b); rough colonies, smooth edges, gray-white (c)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการควบคุมยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* subsp. *citri*

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอที่เกิดจากเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* มีเพียง 36 ไอโซเลท (17.31%) แบ่งออกเป็นเชื้อที่แยกได้จากใบ กิ่ง ราก และรากฝอยจำนวน 3, 2, 17 และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีในระดับท้องปฏิบัติการ คือ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากรากฝอยที่ติดอยู่กับดิน คือ ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 2.19 และ 1.86 ซม. ตามลำดับ การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเท่ากับ 77.17 และ 72.53% ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Copper hydroxide และชุดควบคุมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค เท่ากับ 56.14% (1.14 ซม.) และ 0.00% (0.05 ซม.) และเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 2.06 และ 1.85 ซม. ตามลำดับ การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เท่ากับ 75.73 และ 72.97% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับการใช้ Copper hydroxide (60.32%) ในขณะที่ชุดควบคุม (0%) (Table 2)

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 เป็นเชื้อที่แยกได้จากรากฝอยติดมากับดิน โดยใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ คือ การใช้ออกซิเจน และการใช้คาร์บอนจากแหล่งต่าง ๆ นำไปวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล apiweb® พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 เป็นเชื้อ *B. subtilis* โดยมีระดับ

ความถูกต้องในการจำแนก 99.1 และ 98.8% ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยใช้ B-K1/F (5'-TCACCAAGGCACGATGCG-3') และ B-K1/R1 (5'-CGTATTACC GCGGCATG-3') และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA ขนาด 595 bp พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็น *B. subtilis* 100% ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Lugtenberg and Kamilova (2009) รายงานว่า ไรโซแบคทีเรียบางชนิดเป็นเชื้อเอนโดไฟต์ สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณ ของรากพืชได้ โดยไรโซแบคทีเรียบางชนิดมีความจำเพาะต่อชนิดของพืชอีกด้วย จากการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Daungfu et al. (2019) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์เอนโดไฟต์ *B. subtilis* LE24 และ *B. amyloliquefaciens* LE109 ที่แยกได้จากพืชตระกูล ส้ม (*Citrus aurantiifolia*) ที่สมบูรณ์แข็งแรง มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวที่เกิดจากเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเชื้อ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่ม lipopeptides ได้แก่ surfactins, fengycins และ iturins สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ (Szczeczek and Shoda, 2006; Mahadnanapuk et al., 2007; Torres et al., 2016; Wang et al., 2022) ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ อมรรัตน์ และ คณะ (2561) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* ต่อการควบคุมโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม พบแบคทีเรีย *Bacillus* ไอโซเลท PSD-2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้สูงถึง 85.29% เมื่อเทียบกับ Copper hydroxide ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตได้สูงสุดเพียง 58.33% โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Bacillus* จัดเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีการ นำมาประยุกต์ ใช้เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคพืชอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เชื้อ *Bacillus* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่สามารถมีชีวิตรอดใน สิ่งแวดล้อมได้ดี โดยที่ Kalita et al. (1996) รายงานว่า *B. subtilis* ที่แยกได้จากต้นมะนาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ในห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี และสามารถลดการเกิดโรคแคงเกอร์ในสภาพแปลงปลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *B. amyloliquefaciens* ก็มีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* และยังสามารถ นำให้พืชเกิดความต้านทานโรคได้อีกด้วย (Soares et al., 2016)

Table 2 Inhibition zones of the endophytic bacteria against *X. citri* subsp. *citri* using paper disc diffusion and agar well diffusion method on nutrient agar at 7 days after inoculation

Endophytic bacteria	Growth inhibition of <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>			
	Paper disc diffusion		Agar well diffusion	
	Diameter (cm)	Inhibition (%)	Diameter (cm)	Inhibition (%)
No.1REN	0.98	48.97 ^{efghi1/}	1.01	50.49 ^{efgh}
No.2REN	1.57	68.15 ^{bcd}	1.35	62.96 ^{bcdef}
No.4-REN	1.02	50.98 ^{efghi}	1.02	50.98 ^{cdefg}
No.6REN	1.36	63.24 ^{bcdef}	1.41	64.54 ^{bcdef}
No.9REN	1.08	53.70 ^{cdefgh}	1.10	54.54 ^{cdefg}
No.10REN	1.61	68.94 ^{abc}	1.49	66.44 ^{bcdef}
No.3S	0.98	48.97 ^{efghi}	0.99	49.50 ^{efgh}
No. 5S	1.10	54.54 ^{bcdefgh}	1.62	69.14 ^{bcde}
No. 7S	1.48	66.22 ^{bcde}	1.40	64.22 ^{bcde}
No. 8S	1.04	51.92 ^{defgh}	1.06	52.83 ^{cdefg}
EN-1231	1.38	63.77 ^{bcdef}	1.27	60.63 ^{bcdefg}
EN-1232	0.99	49.49 ^{efghi}	0.99	49.50 ^{efgh}
EN-R1	1.22	59.02 ^{bcdef}	1.19	57.98 ^{bcdefg}
EN-R11	1.13	55.75 ^{cdefgh}	1.08	53.70 ^{cdefg}
R1-3	1.31	61.83 ^{bcdef}	1.26	60.32 ^{bcdefg}
R1-4	1.58	68.35 ^{bcd}	1.56	67.94 ^{bcdef}
R2-1	1.05	52.38 ^{cdefgh}	1.03	51.46 ^{defg}
R2-2	1.21	58.68 ^{bcdefg}	1.13	55.75 ^{bcdefg}
R2-3	1.30	61.54 ^{bcdef}	1.29	61.24 ^{bcdefg}
R2-5	0.85	41.18 ^{fghi}	0.77	35.06 ^{hi}
R2-6	0.91	45.05 ^{fghi}	0.92	45.65 ^{sh}
R2-8	1.25	60.00 ^{bcdef}	1.27	60.62 ^{bcdefg}
R3-1	1.02	50.98 ^{efghi}	1.01	50.49 ^{efgh}
S1-3	0.98	48.97 ^{efghi}	0.97	48.45 ^{efgh}
S1-4	2.19	77.17 ^a	2.06	75.73 ^a
S1-5	1.19	57.98 ^{bcdefg}	1.18	57.63 ^{bcdefg}
S1-6	1.14	56.14 ^{bcdefg}	1.15	56.52 ^{bcdefg}
S2-1	0.87	42.53 ^{fgh}	1.01	50.49 ^{efgh}
S2-2	1.01	50.49 ^{efgh}	1.02	50.98 ^{efgh}
S2-3	1.18	57.63 ^{bcdefg}	1.14	56.14 ^{bcdefg}
S3-2	1.14	56.14 ^{bcdefg}	1.16	56.90 ^{bcdefg}
S3-4	0.76	34.21 ⁱ	0.72	30.55 ⁱ
S3-5	1.82	72.53 ^{ab}	1.85	72.97 ^{ab}
L1-1	1.57	68.15 ^{bcd}	1.58	68.35 ^{bcde}
L1-5	1.19	57.98 ^{bcdefg}	1.17	57.26 ^{bcdefg}
L1-7	0.78	35.90 ⁱ	1.13	55.75 ^{cdefg}
Copper hydroxide	1.14	56.14 ^{bcdefg}	1.26	60.32 ^{bcdefg}
Control (ชุดควบคุม)	0.50	0.00 ^j	0.50	0.00 ⁱ
F-test		**		**
C.V. (%)		17.26		16.29

^{1/} = Means in a same column followed by the different letters are significantly different by DMRT. (P<0.01)

**= Significantly different (P<0.01)

การศึกษาประชากรเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์และเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บริเวณผิวใบ

การตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิต และการครอบครองผิวใบส้มโอทับทิมสยามของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เมื่อพ่นด้วย เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 หลังจากพ่นเชื้อเป็นเวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน พบว่า ประชากรเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 เท่ากับ 5.9×10^3 , 5.2×10^3 , 5.0×10^3 , 4.8×10^3 และ 2.6×10^3 cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการพ่นด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S3-5 ประชากรเชื้อ เท่ากับ 3.0×10^3 , 2.0×10^2 , 2.2×10^3 , 2.3×10^3 และ 1.5×10^2 cfu/ml ตามลำดับ (Table 3) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ในขณะที่ผลการตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิต และครอบครองผิวใบส้มโอทับทิมสยามของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ร่วมกับการปลูกเชื้อก่อโรค *X. citri* subsp. *citri* พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบมีความแตกต่างกัน ที่ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน โดยที่จำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 เท่ากับ 1.9×10^2 , 2.7×10^3 , 3.3×10^3 , 3.1×10^3 และ 2.2×10^3 cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มของจำนวนประชากรมากกว่าการพ่นด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S3-5 โดยที่การพ่นด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S3-5 จำนวนประชากร เท่ากับ 2.0×10^2 , 2.8×10^3 , 1.9×10^3 , 2.6×10^2 และ 2.4×10^2 cfu/ml ตามลำดับ (Table 3) ส่วนเชื้อก่อโรค *X. citri* subsp. *citri* เมื่อผ่านระยะเวลานานขึ้น จำนวนประชากรเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง และเมื่อครบระยะเวลา 60 วัน ของการตรวจนับ เท่ากับ 0.6×10^2 cfu/ml ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีศักยภาพในการแข่งขันด้านแหล่งที่อยู่อาศัยได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งผลการทดลองกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เพียงอย่างเดียว เพื่อดูแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* บนใบส้มโอทับทิมสยาม ผลปรากฏว่าปริมาณเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เริ่มต้นที่ 4.2×10^3 cfu/ml ปริมาณเชื้อสาเหตุมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อสิ้นสุดการตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งสุดท้ายที่ 60 วัน จำนวนเชื้อก่อโรค เท่ากับ 2.4×10^3 cfu/ml (Table 3) การรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ มีความผันแปรแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ และรูปแบบการใช้สอดคล้องกับการศึกษาของสุนันทนาถ (2555) รายงานการทดสอบการเจริญและการมีชีวิตรอดของเชื้อบนผิวใบถั่วเหลืองของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ว่ามีอัตราการเจริญดีกว่า *B. amyloliquefaciens* KPS46 ในทุกระยะ อัตราการเจริญครอบครองผิวถั่วเหลืองมีการพัฒนา โดยที่ระยะทดสอบ 24 ชั่วโมงแรก จะมีประชากรเชื้อที่ตรวจสอบสูงสุด และหลังจากนั้นประชากรจะลดลงและเริ่มเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 96-168 ชม. นอกจากนี้ Rabbee et al. (2022) รายงานว่าเชื้อ *B. velezensis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคแคงเคอร์ ที่เกิดจากเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* โดยทำให้โรคแคงเคอร์ลดลง 26.30% และปริมาณประชากรเชื้อก่อโรคลดลง 81.68% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่พ่นเชื้อ *B. velezensis* จากการตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิต และครอบครองผิวใบส้มโอทับทิมสยามของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เจริญร่วมกับ *X. citri* subsp. *citri* พบว่า การรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบมีความแตกต่างกัน จำนวนเชื้อโรคน้อยกว่าเชื้อเอนโดไฟท์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีศักยภาพ ในการแข่งขันด้านแหล่งที่อยู่อาศัยดีกว่าเชื้อก่อโรค

Table 3 The population of endophytic bacteria isolate S1-4, S3-5 and *X. citri* subsp. *citri* (XCC) on Tup Tim Siam Pomelo leaves after inoculation

Treatments	Population of endophytic bacteria/leaf (cfu/ml)				
	Time after inoculation (days)				
	0	15	30	45	60
Spray only endophytic bacteria					
S1-4	$5.9 \times 10^{3a1/}$	5.2×10^{3a}	5.0×10^{3a}	4.8×10^{3a}	2.6×10^{3a}
S3-5	3.0×10^{3bc}	2.0×10^{2bc}	2.2×10^{3bc}	2.3×10^{3bc}	1.5×10^{2bc}
Spray endophytic bacteria and pathogens					
S1-4 + XCC					
S1-4	1.9×10^{2d}	2.7×10^{3b}	3.3×10^{3b}	3.1×10^{3b}	2.2×10^{3b}
XCC	2.5×10^{3bc}	2.2×10^{2bc}	2.0×10^{2d}	1.1×10^{2d}	0.6×10^{2c}
S3-5 + XCC					
S3-5	2.0×10^{2d}	2.8×10^{3b}	1.9×10^{3c}	2.6×10^{2d}	2.4×10^{2c}
XCC	3.1×10^{3bc}	2.5×10^{3b}	2.3×10^{3bc}	2.0×10^{2d}	1.3×10^{2c}
Spray only pathogens					
XCC	4.2×10^{3b}	3.3×10^{3b}	2.9×10^{3bc}	2.6×10^{3bc}	2.4×10^{3b}
F-test	*	*	*	*	*
C.V. (%)	24.67	27.35	42.52	6.14	9.05

^{1/} = Means in a same column followed by the different letters are significantly different by DMRT. (P<0.01)

* = Significantly different (P<0.05)

สรุป

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนของใบ กิ่ง ราก และดินบริเวณแปลงปลูกส้มโอทับทิมสยาม สามารถแยกได้ทั้งหมด จำนวน 208 ไอโซเลท มีเพียงจำนวน 36 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* โดยที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion การยับยั้งเท่ากับ 77.17 และ 72.53% และเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion การยับยั้งเท่ากับ 75.73 และ 72.97% จำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาและยืนยันระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิคโมเลกุล พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท S1-4 และ S3-5 เป็นเชื้อ *B. subtilis* การตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิต และครอบครองผิวใบส้มโอทับทิมสยามของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ร่วมกับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* พบว่า เชื้อสาเหตุโรคนี้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ในรูปแบบสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ ที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้ พร้อมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามในสภาพแปลงปลูก

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ประจำปีงบประมาณ 2564

เอกสารอ้างอิง

- จรัสลักษณ์ เพชรวัง, สุรพล ฐิติธนากุล, อติพล พัฒิยะ, นิพาดา สุภาพ, อโณทัย บำรุง และปริญช ชุมแก้ว. 2563. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว. *แก่นเกษตร*. 48 (ฉบับพิเศษ 1): 1197-1202.
- ชัยสิทธิ์ ปรีชา, เวที วิสุทธิแพทย์ และพรศิลป์ สีเผือก. 2553. รายงานการวิจัย “การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้ในการควบคุมโรครากขาว (*Rigidoporus lignosus*) ของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) โดยชีววิธี”. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. นครศรีธรรมราช.
- ชูศักดิ์ จอมพุก. 2551. สถิติการวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชไร่. ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 319 น.
- ณัฐริมา ไขษิตเจริญกุล, ทิพวรรณ กันหาญาติ, บุรณี พัวงษ์แพทย์, รุ่งนภา ทองเคิ่ง และบุญปิยะธิดา คล่องแคล่ว. 2560. การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเกอร์. *วารสารวิชาการเกษตร*. 35: 74-90.
- นพพล สัทยาสัย. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. กรุงเทพฯ.
- พรพรรณ อุสุวรรณ. 2550. การใช้ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ ดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*. นครราชสีมา.
- วารภรณ์ สุทธิสา และบุษยา วาปี. 2562. การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวจากดินบริเวณรอบรากต้นบานไม่รู้รุ่ยป่า (*Gomphrena celosioides* Mart.). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 21(3): 86-94.
- วิลาวรรณ เชื้อบุญ. 2551. ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและ. *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. กรุงเทพฯ.
- รัชฎาวรรณ เดชมนี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แถบ Thin-layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. 2548, น. 313 -320. ใน: รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุนันทนา นุราภักดิ์. 2555. สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคใบจุดบนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. กรุงเทพฯ.
- สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7. 2552. การจัดการองค์ความรู้เทคโนโลยีการผลิตส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช. *กรมวิชาการเกษตร*. แหล่งข้อมูล: <https://www.doa.go.th/ac/nakhonsithammarat/wp-content/uploads/2022/04/>. ค้นเมื่อ 21 ธันวาคม 2565.
- อมรรัตน์ กุศลางกูรวัฒน์, ปัฐวิภา สงกุมาร, ศรีเมฆ ชาวโพพาง และอำไพวรรณ ภราตร์นุวัฒน์. 2561. ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์พืชตระกูลส้มและการควบคุมโรคด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. แหล่งข้อมูล: http://www.thai-explore.net/search_detail/result/5804. ค้นเมื่อ 6 พฤศจิกายน 2565.
- อุทัย หมื่นซ้ำ และขวัญชนก บุปผากิจ. 2565. คลังความรู้. *กรมวิชาการเกษตร*. แหล่งข้อมูล: <http://pakphanang.nakhonsri.doae.go.th/pomelolo.htm>. ค้นเมื่อ 21 ธันวาคม 2565.
- Daungfu, O., S. Youpensuk, and S. Lumyong. 2019. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Tropical Life Science Resources*. 30: 73-88.
- Gaiero, J.R., C.A. McCall, K.A. Thompson, N.J. Day, A.S. Best, and K.E. Dunfield. 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*. 2013: 1738-1750.
- Gerhardt, P. 1981. *Manual of methods of general bacteriology*. American Society of Microbiology, Washington DC, 127 p.

- Islam, N.M., M.S. Ali, S.J. Choi, J.W. Hyun, and K.H. Baek. 2019. Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*. *Plant Pathology*. 35: 486-497.
- Kalita, P., L.C. Bora, and K.N. Bhagabati. 1996. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology*. 49: 234-237.
- Leksomboon, C., N. Thaveechai, and W. Kositratana. 2001. Potential of plant extracts for controlling citrus canker of lime. *Kasetsart Journal*. 35: 392-396.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.
- Mahadatanapuk, S., R.W. Cutler, M. Sanguansersri, V. Sardud, B. College, and S. Anuntalabhochai. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum usaeon*, *Curcumaalis matifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 2: 54-61.
- Naqvi, S.A., J. Wang, M.T. Malik, U.D. Umar, A.U. Rehman, A. Hasnain, M.A. Schail, M.T. Shakeel, M. Nauman, H. Rehman, M.Z. Hassan, M. Fatima, and R. Datta. 2022. Citrus canker-distribution, taxonomy, epidemiology, disease cycle, pathogen biology, detection, and management: a critical review and future research agenda. *Agronomy*. 12: 1075. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051075>. Accessed 2 March. 2023.
- Rabbee, M.F., N. Islam, and K.H. Baek. 2019. Endophyte *Bacillus velezensis* Isolated from *Citrus* spp. controls streptomycin-resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*. 9: 470.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society St. Paul MN. 245 p.
- Senthilkumar, M., R. Anandham, M. Madhaiyan, V. Venkateswaran, and T. Sa. 2011. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. PP. 61-96. In: D.K. Maheshwari. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin.
- Soares, M.A., H. Li, M. Bergen, J.M. Silva, K.P. Kowalski, and J.F. White. 2016. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). *Plant and Soil*. 405: 107-123.
- Sturz, A.V., B.R. Christie, and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 1-30.
- Szczzech, M., and M. Shoda. 2006. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB 14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology*. 154: 370-377.
- Torres, M.J., C.P. Brandan, G. Petroselli, R. Erra-Balsells, and M.C. Audisio. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*. 182: 31-39.
- Wang, X., L. Liang, H. Shao, X. Ye, X. Yang, X. Chen, Y. Shi, L. Zhang, L. Xu, and J. Wang. 2022. Isolation of the novel strain *Bacillus amyloliquefaciens* F9 and identification of lipopeptide extract components responsible for activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plants*. 11: 457.