

กลไกที่หลากหลายของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่จากดินบริเวณรากข้าวต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว

Multi-Mechanism of New Antagonistic Bacteria from Rice Rhizosphere Soil for Enhanced Plant Growth and Controlling Bacterial Blight Disease of Rice

อนุสร่า จันทรแสง¹ และ สุพจน์ กาเซ็ม¹
Anusara Jansaeng¹ and Supot Kasem¹

บทคัดย่อ

Bacillus cereus N55314 และ *Serratia* sp. N43203 ที่แยกและคัดเลือกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวที่เก็บจากจังหวัดปทุมธานี สุพรรณบุรี และอยุธยา มีศักยภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยกลไกสำคัญคือ การผลิตสารทุติยภูมิยับยั้งเชื้อโรค เจริญในสภาวะไนโตรเจนต่ำ (N-free medium) ละลายฟอสเฟสในอาหาร pikovskaya ส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้าข้าว ซึ่งปริมาณออกซินที่เชื้อผลิตมีความสัมพันธ์กับการสะสมออกซินในเนื้อเยื่อกล้าข้าวที่มีผลต่อการพัฒนาของกล้าข้าว และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวภายใต้สภาพโรงเรือนพบว่า *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 มีประสิทธิภาพป้องกันและลดการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ถึง 67.47 และ 46.73% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ซึ่งลดการเกิดโรคได้เพียง 8.74% ผลจากการศึกษาดังกล่าวสามารถนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตไปพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวต่อไป

คำสำคัญ: โรคข้าว ความแข็งแรงของต้นกล้า กลไกการควบคุมโรคโดยชีววิธี การจัดการโรค การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์

Abstract

Bacillus cereus N55314 and *Serratia* sp. N43203 were isolated and screened from rice rhizosphere soil samples in Pathumthani, Supanburi and Ayuthaya. Two isolates showed the highest efficiency to suppressed of bacterial blight (BB) of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), and it also showed enhanced plant growth. The main mechanisms of these two isolates were controlled BB by secondary metabolites production. Moreover, they grew well on N-free medium, solubilized phosphate on pikovskaya medium. Furthermore, enhanced seed germination and rice seedling growth could be observed. The level of auxin production by each isolate was related to plant growth and accumulation of auxin in plant tissue. *B. cereus* N55314 and *Serratia* sp. N43203 showed the high effectiveness regarding the protection and reduction of BB disease incidence under greenhouse conditions with percentage of 67.47 and 46.73% respectively, when compared with copper hydroxide treatment which reduced BB disease incidence only 8.74% The obtained results can be used for further formula development to control bacterial blight of rice.

Keywords: rice disease, seedling vigor, biocontrol mechanism, disease management, microbial application

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

คำนำ

โรคขอบใบแห้งของข้าว (bacterial blight) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบัน (สถาบันการพัฒนาระบบไทย, 2556) และเป็นโรคสำคัญที่ระบาดรุนแรงในระยะกล้า โดยเฉพาะพันธุ์อ่อนแอที่ทำให้เกิดอาการกล้าไหม้ (seedling blight) และในระยะแตกกอและออกรวงจะส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของเมล็ดข้าว (กรมการข้าว, 2559) นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรสดังกล่าวยังเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ปนเปื้อนและติดมากับเมล็ดพันธุ์อีกด้วย (Sakthivel *et al.*, 2001) การจัดการโรคที่ปนเปื้อนติดมากับเมล็ดพันธุ์ การจัดการโรคในระยะกล้าข้าวและการส่งเสริมความแข็งแรงให้กับกล้าข้าวจึงมีความสำคัญและเป็นแนวทางในการลดความเสียหายของโรสดังกล่าว ทั้งนี้วิธีการจัดการโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เกษตรกรนิยมคือ การใช้สารเคมีโดยเฉพาะในกลุ่มสารประกอบทองแดงและสารปฏิชีวนะพ่นควบคุมโรคทางใบเป็นหลัก ซึ่งหากใช้ผิดวิธีจะส่งผลให้เชื้อมีความต้านทานและแสดงความรุนแรงมากขึ้น (Yasin *et al.*, 2007) การจัดการโรคข้าวโดยชีววิธีเป็นวิธีการทางเลือกที่สามารถนำมาใช้เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้และมีรายงานจำนวนมากที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งแต่ยังไม่เห็นผลหรือประสิทธิภาพที่ชัดเจน เนื่องจากหลายปัจจัยโดยเฉพาะการปรับตัวและการแสดงออกของกลไกสำคัญเมื่อเชื้ออยู่ที่ผิวพืช การใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์และมีกลไกที่หลากหลายทั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเป็นปฏิปักษ์ยับยั้งหรือควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาปรับใช้ในการผลิตข้าวในทุกขั้นตอน โดยเฉพาะการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ปนเปื้อนติดมากับเมล็ดพันธุ์และการเกิดโรสดังกล่าวในระยะกล้า การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมแบคทีเรีย Xoo สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ตลอดจนศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์สำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวและลดการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

แยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าวที่เก็บจากจังหวัดปทุมธานี สุพรรณบุรี และอยุธยา ด้วยวิธี soil dilution plate (Majeed *et al.*, 2015) โดยใช้อาหาร Burk's N - free medium (Wilson and Knight, 1952) ซึ่งเป็นอาหารคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไนโตรเจนต่ำ (Park *et al.*, 2005) นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สายพันธุ์ 1-1 สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยการประยุกต์ใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อและโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มตรงไนโตรเจนและลงบนผิวอาหาร peptone sucrose agar (PSA) ที่ผสมแบคทีเรีย Xoo ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (EL-shakh *et al.*, 2015) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้ง Xoo ทั้งในลักษณะการเจริญคลุมทับและผลิตสารยับยั้งมาทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรมและปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบ และจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย universal primer จำเพาะบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี nucleotide sequencing analysis เปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast และ Alignment (Barghouti, 2011) นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและกลไกที่เกี่ยวข้องดังนี้

- 1) ทดสอบคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟสบนอาหาร pikovskaya's medium (Paul and Rao, 1971)
- 2) ทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้าข้าวซึ่งประยุกต์จากวิธี blotter (ISTA, 2014) วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) โดยแช่เมล็ดข้าวเปลือก

1 กรัม ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทดสอบโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยที่ optical density (O.D) 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (ประมาณ 108 cfu/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้วย้ายเมล็ดข้าวลงบนกระดาษเพาะขึ้น (rolled towel paper) ประเมินผลโดยนับอัตราเมล็ดข้าวงอกในแต่ละกรรมวิธี ความยาวราก และความสูงต้นที่ 14 วัน หลังเพาะเมล็ด

3) การตรวจสอบปริมาณออกซิน (IAA) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ luria bertani broth (LB) ที่ผสม L-tryptophan 50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง และนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง hi-speed centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ Salkowski's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อทดสอบสามารถผลิต IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer เพื่อเปรียบเทียบกับ IAA standard curve (Ghevariya and Desai, 2014)

4) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อลำข้าวที่คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยดัดแปลงจากวิธี blotter ตามวิธีการข้างต้น เปรียบเทียบการคลุกเมล็ดด้วยสาร IAA สังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อกำข้าวอายุ 7 วัน จึงนำมาประเมินการสะสม IAA ในเนื้อเยื่อลำข้าวโดยการบดด้วย homogenization buffer (0.1M Tris – HCl buffer, pH 7, 0.1 M KCl, 1 mM PMSF, 1 % (v/v) Triton X – 100 3 % (w/v) PVPP) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ Salkowski's reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกับ IAA standard curve

5) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี paper disc diffusion โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทและแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งในอาหารเหลว nutrient broth (NB) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยที่ O.D 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 หยดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบัติการบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/แผ่น และนำมาวางลงบนผิวหน้าอาหาร PSA ที่ผสมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 72-48 ชั่วโมง ประเมินผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (clear zone)

6) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัติการในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่ติดมากับเมล็ดข้าว วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแช่เมล็ดข้าวเปลือก 1 กรัม ที่ผ่านการล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox %10 ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสาเหตุโรคปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้งและนำเมล็ดข้าวติดเชื้อไปคลุกเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบัติการที่ปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยที่ O.D 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 และ 0.2 (ประมาณ 107 และ 108 cfu/มิลลิลิตร) ผึ่งเมล็ดให้แห้ง นำเมล็ดข้าวติดเชื้อวางลงบนอาหารทดสอบ 2 ชนิด คือ yeast extract dextrose calcium carbonate (YDC) และ water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 72-48 ชั่วโมง ประเมินอัตราการงอกของเมล็ดบนอาหาร WA และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ติดมากับเมล็ดด้วยอาหาร YDC เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เมล็ดข้าวติดเชื้อที่คลุกสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ โดยมีการวิธีที่เป็นเมล็ดข้าวที่ติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว (positive control) และกรรมวิธีเมล็ดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (negative control) เป็นชุดควบคุม ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 เมล็ด นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 23

7) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัติการในการป้องกันและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวในสภาพโรงเรือนทดลอง เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบัติการและแบคทีเรียสาเหตุโรค Xoo ปรับความเข้มข้นของเซลล์

แขวนลอยที่ O.D 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ทำการจุ่มรากกล้าข้าวที่อายุ 14 วัน ลงในสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากนั้นรดดินด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่กล้าข้าวอายุ 21 วัน และพ่นด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่กล้าข้าวอายุ 28 วัน เมื่อกล้าข้าวที่อายุ 30 วัน ทำการพ่นแบคทีเรีย Xoo สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ชุดการทดลองที่ 2 ทำการพ่นแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่กล้าข้าวอายุ 30 วัน เมื่อกล้าข้าวอายุ 32 วัน พ่นด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ซึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ กล้าข้าวที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวเพียงอย่างเดียว (positive control) และกล้าข้าวที่ไม่มีการปลูกเชื้อใดๆ (negative control) ในแต่ละกรรมวิธีใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์และแบคทีเรียสาเหตุโรค Xoo ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกระถาง และสารเคมีใช้ตามคำแนะนำบนฉลาก โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง กระถางละ 3 ต้น ทำการประเมินการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวตาม Standard Evaluation System for rice 5th edition (IRRI, 2013) หลังจากทำการทดสอบ 7 วัน และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 23

ผลการทดลองและวิจารณ์

แบคทีเรีย 42 ไอโซเลท แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวที่เก็บจากแปลงนาในจังหวัดปทุมธานี สุพรรณบุรี และอยุธยา สามารถเจริญบนอาหาร Burk's N - free medium ได้แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มตรงในโตรเจนได้ จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ในเบื้องต้นพบว่า มีเพียง 20 ไอโซเลท ที่แสดงบริเวณยับยั้งบนอาหารผสมแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว ในลักษณะการเกิดบริเวณยับยั้งร่วมกับการเจริญของโคโลนี จึงนำแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (HR) บนใบยาสูบพบว่า มีเพียง 12 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยไม่ก่อให้เกิด HR บนใบยาสูบ โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 2 ไอโซเลท (N33307 และ N43203) และแกรมบวก 10 ไอโซเลท (N13111, N13301, N25204, N43119, N43316, N53108, N53121, N53304, N55314 และ N55204) จึงนำตัวแทนแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งแกรมลบและแกรมบวกอย่างละหนึ่งไอโซเลทคือ ไอโซเลท N55314 และ N43203 ที่มีแนวโน้มยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวชัดเจนที่สุดมาจำแนกชนิด โดยวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย universal primer ที่จำเพาะบริเวณ 16S rDNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี nucleotide sequencing analysis เปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast และ Alignment พบว่า ไอโซเลท N55314 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus cereus* AR156 100% ส่วน N43203 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Serratia* sp. Z6 100% ซึ่งมีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวสูงสุดเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวต่อไป

1) เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์มาศึกษาคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟสพบว่า มีเพียง *Serratia* sp. N43203 ปรากฏบริเวณ clear zone รอบๆ โคโลนีบนอาหาร pikovskaya แสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถละลายฟอสเฟสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ฟอสเฟสเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชรองจากไนโตรเจน ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟสได้ ได้แก่ สกุล *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Serratia* sp., *Erwinia* sp. และ *Xanthomonas* sp. เป็นต้น (Sharma *et al.*, 2013)

2) เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยทดสอบการส่งเสริมการงอกของเมล็ด พบว่า การใช้แบคทีเรีย *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 คลุกเมล็ดข้าวมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดที่ 98.89 และ 91.11% มีความยาวราก 6.42 และ 4.77 เซนติเมตร มีความสูงต้น 4.91 และ 3.19 เซนติเมตร ตามลำดับ

3) ปริมาณออกซิน (IAA) ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตของกล้าข้าวในข้อ 2) โดยปริมาณออกซิน (IAA) ที่ *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 0.06 และ 1.44 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ IAA ดังกล่าวมีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญของรากข้าวได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 1)

Table 1 Screening mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria and their effect on rice seedlings.

Bacteria	Tested parameter				Growth parameter			
	HR ^{1/}	Gram	N	P	IAA (µg/ml)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Seed germination (%) ^{2/}
N43203	-	-	+	+	1.44	4.77b	3.19e	91.11b
N55314	-	+	+	-	0.06	6.42a	4.91b	98.89a
R18 ^{3/}	+	-	+	+	7.97	2.59d	4.13c	91.11b
HS105 ^{4/}	-	+	+	-	3.11	3.99c	5.13a	92.22b
control	-	-	-	-	0.00	4.14c	3.78d	85.56c

^{1/} Hypersensitive response (HR)

^{2/} Germination (%) = (mean of each treatment x 100)/total number of each treatment

^{3/} *Pseudomonas fluorescens* strain R18

^{4/} *Bacillus amyloliquefaciens* strain HS105

^{5/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) by Duncan's New Multiple Range Tests.

4) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ IAA ในกล้าข้าวที่อายุ 7 วัน พบว่า ต้นกล้าที่คลุกเมล็ดด้วย *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 มีปริมาณ IAA สะสมในกล้าข้าวอยู่ที่ 132.32 และ 128.81 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม มีความยาวราก 7.79 และ 8.44 เซนติเมตร และมีความสูงต้น 6.21 และ 5.49 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร IAA มาตรฐาน พิสูจน์ให้เห็นว่า ผลกระทบจากการผลิต IAA ในกล้าพืชขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นต่ำอาจกระตุ้นการเจริญเติบโต ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA สูงอาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ อีกทั้งต้นกล้าพืชที่ต่างชนิดกันจะตอบสนองต่อชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของ IAA ที่แตกต่างกัน (Solano *et al.*, 2008)

Table 2 The efficiency of new plant growth promoting rhizobacteria isolates on IAA production and its effect on shoot and root length of rice seedlings.

Treatment	IAA production in rice seedling (µg/ml)	Growth rate (cm)	
		Shoot length	Root length
PGPR isolates			
N43203	128.81	5.49b	8.44b
N55314	132.32	6.21a	7.79c
R18 ^{1/}	153.99	4.61d	4.86d
HS105 ^{2/}	112.50	5.37b	10.48a
Non-treated ^{3/}	144.17	5.07c	7.61c
IAA standard (mg/ml.)			
0	194.73	4.37cd	2.27c
25	175.84	5.79a	4.59b
50	180.06	5.50b	4.94a
100	161.49	4.25d	1.38d
150	162.93	4.56c	0.95e

^{1/} *Pseudomonas fluorescens* strain R18^{2/} *Bacillus amyloliquefaciens* strain HS105^{3/} Sterile distilled water.^{4/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's New Multiple Range Tests.

5) เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า *Serratia* sp. N43203 ผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* ได้ดีที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Bacillus amyloliquefaciens* (HS105) 9.96 มิลลิเมตร และ *Pseudomonas fluorescens* (R18) 8.33 มิลลิเมตร ซึ่งแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้งสองสายพันธุ์มีรายงานว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ (เฉลิมเกียรติ และคณะ, 2557 ; อนิสรา และคณะ, 2557) และ *B. cereus* N55314 สามารถเจริญแข่งขันคลุมทับ (competition) 25.29 มิลลิเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ซึ่งไม่พบบริเวณยับยั้ง

6) เมื่อนำแบคทีเรียปฏิชีวนะดังกล่าวมายับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคบนเมล็ดข้าวติดเชื้อพบว่า การคลุกเมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยของ *Serratia* sp. N43203 ที่ O.D 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 (ประมาณ 10^1 cfu/มิลลิลิตร) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ติดมากับเมล็ดได้ถึง 93.33% และส่งเสริมการงอกของเมล็ดได้ดีถึง 96.67% เปรียบเทียบกับเมล็ดติดเชื้อและการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์คลุกเมล็ดตามอัตราแนะนำบนฉลากสามารถยับยั้งเชื้อ *Xoo* ที่ติดมากับเมล็ดได้เพียง 63.33% อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดปลอดเชื้อพบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3)

Table 3 The efficacy of different antagonistic bacteria to inhibit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) by paper disc diffusion method and suppress growth of Xoo on inoculated seeds of rice.

Treatment	Inhibition zone (mm)	Inhibited mechanism	Percent of Xoo suppression on seed ^{1/}		Plant growth parameter					
			Seed germination (%) ^{2/}		Root length		Shoot length			
			OD 0.1 ^{3/}	OD 0.2	OD 0.1	OD 0.2	OD 0.1	OD 0.2	OD 0.1	OD 0.2
N43203	10.50	AT ^{4/}	93.33a	70.00a	96.67a	96.67a	3.41a	3.89a	1.98bc	2.20ab
N55314	25.29	CP ^{5/}	86.67a	83.33a	93.33a	93.33a	3.99a	3.90a	2.05bc	1.87c
R18 ^{6/}	8.33	AT	56.67b	83.33a	96.67a	96.67a	3.67a	4.31a	0.85d	0.85d
HS105 ^{7/}	9.96	AT	53.33b	56.70a	90.00a	90.00a	4.26a	3.88a	2.34ab	1.19cd
copper hydroxide	0	no	63.33b	63.33a	96.67a	96.67a	3.38a	3.38a	0.89d	0.89d
Xoo	0	no	0.00c	0.00b	86.67a	86.67a	3.55a	3.55a	0.85d	0.85d
Non-treated	0	no	0.00c	0.00b	96.67a	96.67a	3.86a	3.86a	2.92a	2.92a

^{1/} Germination (%) = (mean of inhibition in each treatment x 100)/total number of each treatment

^{2/} Germination (%) = (mean of germinated seed in each treatment x 100)/total number of each treatment

^{3/} OD is optical density at 600 nm = 0.1 and 0.2 (around 10¹ and 10² cfu/ml)

^{4/} Antibiotic mechanism (AT)

^{5/} Competition mechanism (CP)

^{6/} *Pseudomonas fluorescens* strain R18

^{7/} *Bacillus amyloliquefaciens* strain HS105

^{8/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) by Duncan's New Multiple Range Tests.

7) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบักระทั้งสองไอโซเลทในการป้องกันและควบคุมโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองพบว่า *B. cereus* N55314 มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ดีที่สุดถึง 67.47% และรองลงมาคือ *Serratia* sp. N43203 ป้องกันการเกิดโรคได้ 46.73% เมื่อใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิบักระในการจุ่มราก การราดดิน และการพ่นใบข้าวก่อนการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ตามอัตราแนะนำบนฉลากซึ่งลดการเกิดโรคได้เพียง 8.74% (Table 4)

Table 4 The efficacy of new isolates of antagonistic bacteria to control bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under greenhouse conditions.

Treatment	Disease incidence (%) ^{1/}	Disease reduction (%)	Scale of disease severity ^{2/}
Pre-inoculated pathogen			
N43203	32.00bc	46.73	7
N55314	19.54cd	67.47	6
R18 ^{3/}	50.22ab	16.40	7
HS105 ^{4/}	38.06abc	36.64	7
Post- inoculated pathogen			
N43203	37.52abc	37.54	7
N55314	49.42ab	17.73	7
R18	31.29bc	47.91	7
HS105	47.05ab	21.67	7
Copper hydroxide	54.82ab	8.74	8
Positive control (Xoo.)	60.07a	0.00	8
Negative control (H ₂ O)	0.00d	100	1

^{1/} Disease incidence (%) = (mean of diseased leaf area in each treatment / mean of total leaf area) x 100

^{2/} Scale of disease severity followed by Standard Evaluation System for rice 5th edition

^{3/} *Pseudomonas fluorescens* strain R18

^{4/} *Bacillus amyloliquefaciens* strain HS105

^{5/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's New Multiple Range Test.

สรุป

การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียปฏิบักระในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวพบว่าแบคทีเรีย *B. cereus* N55314 และ *Serratia* sp. N43203 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวมีกลไกหลากหลายคือ มีแนวโน้มในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟสให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ สามารถผลิตออกซินทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเนื้อเยื่อลำข้าว สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ด ชักน้ำให้รากและลำต้นเจริญเติบโตได้ดีซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ IAA ที่เชื้อผลิต และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

ทั้งที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และกล้าข้าว โดยจากการศึกษาแสดงให้เห็นกลไกหลักของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชและควบคุมโรคคือ *Serratia* sp. N43203 สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง Xoo ได้อย่างชัดเจน และ *B. cereus* N55314 มีการเจริญแข่งขัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สามารถลดการเกิดโรคและความเสียหายได้เมื่อคลุกเมล็ดติดเชื้อด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ อีกทั้งแบคทีเรียไอโซเลท *B. cereus* N55314 มีประสิทธิภาพในการป้องกันและลดการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าวได้ และดีกว่าการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์เมื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง จากการศึกษาดังนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีกลไกที่หลากหลายทั้งในด้านการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าว ซึ่งสามารถนำไปศึกษาการอยู่ร่วมกันของทั้ง 2 ไอโซเลท ต่อไป และแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและลดการใช้สารเคมีในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่สนับสนุนสายพันธุ์แบคทีเรียสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดสอบ และงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2559. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. องค์ความรู้เรื่องข้าว แหล่งที่มา (Available Source) : <https://www.brrd.in.th/rkb/contents/view/category:2/title:index.php-file=content.php&id=120.htm>, 13 กุมภาพันธ์ 2560
- เฉลิมเกียรติ อุระพานัก จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์ สุพจน์ กาเข็ม ศรีเมฆ ชาวโพรงพวง และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2557. การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการเกิดโรคข้าว. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 (สาขาพืช). 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 181-189.
- สถาบันการพัฒนาประเทศไทย. 2556. ยุทธศาสตร์ข้าวไทย การวิจัยและพัฒนาข้าวไทยและการมองไปข้างหน้า. แหล่งที่มา (Available Source) : <https://www.tdri.or.th/research/a149/>, 13 กุมภาพันธ์ 2560
- อนิสรา สุไลมาน จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์ สุพจน์ กาเข็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2557. การเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาวะแล้งที่มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์พันธุ์อื่น. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 (สาขาพืช). 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 216-223.
- Barghouthi, S.A. 2011. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian Journal of Microbiology*. 51(4):430-444.
- El-shakh, A. S., Kakar, K.U., Wang, X., Almoneafy, A., A., Ojaghian, M.R., Li B. and G.L. Xie. 2015. Controlling bacterial leaf blight of rice and enhancing the plant growth with endophytic and rhizobacterial *Bacillus* strains. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 97(6): 766-785.
- Ghevariya, K.K. and P.B. Desai. 2014. Rhizobacteria of sugarcane: *In vitro* screening for their plant growth promoting potentials. *Res. J. Recent. Sci*. 3: 52-58.
- International Rice Research Institute. 2013. Standard Evaluation System for Rice. fifth edition. International Rice Research Institute. Philippines.
- International Seed Testing Association. 2014. The International Rules for Seed Testing. Available Source : https://www.seedtest.org/en/international-rules-_content-1--.html, January 7, 2016.
- 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.
- Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim. and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growthpromoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*. 160(2): 127-133.

- Paul, N.B. and W.S. Rao. 1971. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and soil*. 35(1-3): 127-132.
- Sakthivel, N., C. Mortensen. and S. Mathur. 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Applied microbiology and biotechnology*. 56(3-4): 435-441.
- Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi. and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*. 2(1): 1-14.
- Solano, B.R., J.B. Maicas and F.G. Mañero. 2008. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant-bacteria Interactions-Strategies and techniques to promote plant growth*. Weinheim. Wiley VCH. 41-54.
- Wilson P.W. and S.C. Knight. 1952. *Experiments in bacterial physiology*. Burgess. Minneapolis. USA.
- Yasin, S.I., J.A. Shah, S.S. Ali. and K. Fatima. 2007. Effect of different chemicals and antibiotics on bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) of rice. *Pakistan Journal of Phytopathology*.