

การคัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุม

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวดำSelection and Characterization of Antagonistic Bacteria as a High Potential Control Agent for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causing Bacterial Leaf Blight Disease in Purple Riceชยามร ถาวร¹ และ อังสนา อัครพิศาล^{1*}Chayamorn Thaworn¹ and Angsana Akarapisan^{1*}

บทคัดย่อ

โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) เป็นโรคที่สำคัญของข้าว มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งข้าวดำเป็นข้าวอีกชนิดหนึ่งที่พบการเข้าทำลายของแบคทีเรียภายในสภาพแปลงปลูก การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรจึงมีความสำคัญในการนำไปใช้ควบคุมโรคเพื่อลดการระบาดของ ความเสียหายของผลผลิต โดยคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าว ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมดจำนวน 48 ไอโซเลท และคัดเลือกด้วยวิธี dual culture พบว่า ไอโซเลท KY16 และ KY17 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยมีรัศมีรอบวงบริเวณที่แสดงการยับยั้งของแบคทีเรีย (inhibition growth zone) เท่ากับ 12.70 mm และ 11.95 mm ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. เมื่อจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากยีนทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 16S rRNA *gyrA* และ *rpoB* พบว่า จัดจำแนกเป็น *Bacillus siamensis* และจากการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมียีนที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในกลุ่ม iturin A และ surfactin ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวดำในระดับแปลงปลูกต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวดำ แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช โรคขอบใบแห้งของข้าว *Bacillus siamensis*

Abstract

Bacterial leaf blight disease is one of the most serious diseases in rice, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Purple rice is one of the rice varieties that has been infected by this pathogen. Thus, screening and selecting highly efficient antagonistic bacteria for controlling the pathogen is necessary for disease control to reduce epidemics and crop loss. Forty-eight isolates of antagonistic bacteria were isolated from rice rhizosphere soil. The highly effective antagonistic bacteria were selected by using the dual culture method. The results showed the bacteria KY16 and KY17 were the most effective antagonists that inhibited *X. oryzae* pv. *oryzae*. The inhibition growth zone of antagonists were approximately 12.70 mm and 11.95 mm, respectively. The morphological and some biochemical characteristics of antagonistic bacteria belong to *Bacillus* sp. group. Additionally, the antagonists KY16 and KY17 were identified as *Bacillus siamensis* based on 16S rRNA, *gyrA*, and *rpoB* gene sequences. Antimicrobial biosynthesis genes of the antagonistic bacteria were also examined. The results revealed that iturin A and surfactin biosynthesis genes were detectable. Following this study, the most effective antagonistic bacteria can be applied to control the bacterial leaf blight disease of purple rice in rice paddy fields.

Keywords: purple rice, rhizobacteria, bacterial leaf blight disease, *Bacillus siamensis*

¹ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

¹ Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

* Corresponding author, E-mail: angkana.aka@gmail.com

คำนำ

ข้าวกล้อง เป็นหนึ่งในพันธุ์ข้าวที่เพาะปลูกในทวีปเอเชียเป็นหลัก เช่น อินเดีย ศรีลังกา บังกลาเทศ ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ลาว จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และไทย โดยในประเทศไทยมักพบมีการเพาะปลูกในบริเวณพื้นที่ภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวกล้องจะมีลักษณะสีม่วงถึงสีดำปรากฏตามส่วน pericarp ขึ้นอยู่กับปริมาณการสะสมของสารประเภท phenolic acids flavonoids และ anthocyanin (Pusadee et al., 2019; Senakun et al., 2018) ข้าวกล้องมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด แต่สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ anthocyanin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ มะเร็ง เนื้ออก และอื่น ๆ ได้ (Fongfon et al., 2021) นอกจากข้าวกล้องจะเป็นพืชที่มีความสำคัญทั้งด้านการบริโภค การดำรงชีวิต และคุณค่าทางเศรษฐกิจแล้วยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงซึ่งดีต่อสุขภาพผู้บริโภคอีกด้วย ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตข้าวกล้องมักได้รับผลกระทบจากหลากหลายปัจจัยทั้งความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต และสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลง เป็นต้น โรคพืชเหล่านี้ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงเป็นอย่างมาก และส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารในระดับโลก (Azizi et al., 2016; Talbot, 2003)

โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) เป็นโรคหลักที่สำคัญของข้าว มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียชนิดสีแกรมลบ โรคขอบใบแห้งจะพบในระยะแตกกอของข้าว อาการบนใบจะมีจุดดำน้ำเล็ก ๆ บริเวณปลายและขอบใบที่โตเต็มที่แล้ว ลักษณะจุดดำน้ำจะขยายไปตามเส้นใบจนเกิดแผลลักษณะขีดขาวจนถึงสีเทา และเนื้อเยื่อตายในที่สุด โดยทั่วไปแผลจะลุกลามจากบริเวณปลายใบลงไปตามขอบใบและเส้นใบ แบคทีเรียสามารถแพร่กระจายผ่านน้ำ ฝน ลม แมลง และอื่น ๆ ได้ (Nino et al., 2006) หากมีการแพร่ระบาดรุนแรงจะส่งผลให้ผลผลิตของข้าวลดลง 10-20% หรืออาจมากกว่า 50% เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ (Sombunjit et al., 2017)

การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปัจจุบันต้องตระหนักถึงความเป็นพิษและผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยังส่งผลกระทบต่อความต้านทานสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค สารเคมีกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดจึงมีแนวโน้มที่จะถูกห้ามนำไปใช้ในการป้องกันกำจัด และการขึ้นทะเบียนสารเคมีชนิดใหม่ก็มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นการควบคุมโรคโดยชีววิธีจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพสูงและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญสำหรับการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Raymaekers et al., 2020) อีกทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพต่อระบบนิเวศเกษตร (Syed Ab Rahman et al., 2018) โดยบริเวณ rhizosphere soil มักพบ plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืชและเป็นส่วนสำคัญในด้านการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ในต้นข้าวมักจะพบแบคทีเรียหลากหลายกลุ่ม เช่น *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Rhizobium* และ *Serratia* แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตพืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่หลากหลายทั้งทางตรงและทางอ้อม (Ngalmat et al., 2021) โดยได้มีการศึกษาการนำแบคทีเรียไปใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ดังเช่น Xie et al. (2018) ได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินในพื้นที่มาเลเซียและอินโดนีเซีย พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ D13 สามารถสร้างสารระเหย alcohol และ 3,5,5-trimethylhexanol ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ นอกจากนี้ Jin et al. (2020) ได้นำแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* ไอโซเลท HN-2 มาใช้ในการควบคุม *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง surfactin ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรีย รวมถึงกระตุ้นกระบวนการผลิต phenylalanine ammonia-lyase (Pal) และ H_2O_2 ในใบข้าวได้ตั้งแต่วัยระยะ 0-72 ชั่วโมง หลังจากการฉีดพ่นสาร C15 surfactin ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ลงบนใบข้าวก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากของข้าวที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวกล้อง และศึกษาลักษณะของแบคทีเรียไปใช้ รวมทั้งตรวจสอบยืนยันที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียไปใช้เพื่อเป็นแนวทางป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธี

วิธีการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลท UN12 แยกจากอาการขอบใบแห้งของข้าวกล้า พันธุ์เจ้าแม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าว

เก็บตัวอย่างรากข้าว จากนั้นนำดินส่วนเกินออกจากรากให้เหลือเฉพาะส่วนที่ติดกับรากข้าว ชั่งรากข้าวและดินที่ติดอยู่บริเวณรอบ ๆ ราก (adhering soil) ปริมาณ 10 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ที่มีน้ำอยู่ปริมาตร 90 ml และนำไปเขย่าบน shaker ที่ความเร็ว 180 rpm นาน 30 นาที แยกแบคทีเรียด้วยวิธี dilution plating method ดูดส่วนใสบริเวณด้านบน (supernatant) ปริมาตร 1 ml ลงในน้ำปริมาตร 9 ml นำไปเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5} หยดสารแขวนลอยปริมาตร 20 μ l ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และ King's medium B (KB) จากนั้นใช้เทคนิค spread plate โดยใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วทั้งจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง แยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค single colony isolation บนอาหาร NA 3-4 ครั้งก่อนเก็บเป็น stock ในน้ำที่มี 0.85% NaCl และ 20% glycerol

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวกล้า

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าวด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลท UN12 นาน 48-76 ชั่วโมง และแบคทีเรียปฏิปักษ์ นาน 24-48 ชั่วโมง บนอาหาร NA จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย (bacterial suspension) ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่น (optical density, O.D.) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าประมาณ 0.2 นำสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมารวมกับอาหาร NA เขย่าให้เข้ากัน และเทลงบนจานอาหารที่มีอาหาร NA เทรองพื้นไว้แล้ว (basal layer) ปริมาตร 5 ml ต่อ 1 จานอาหาร หยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 mm ปริมาตร 10 μ l จากนั้นนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และมีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 5 วัน (ดัดแปลงจาก Jin et al., 2020) สังเกตรัศมีรอบวงบริเวณที่แสดงการยับยั้งของแบคทีเรีย (inhibition growth zone) จากนั้นนำมาคำนวณด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Inhibition growth zone} = \frac{(\text{เส้นผ่านศูนย์กลางรวมบริเวณวงใส} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง})}{2}$$

วางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม Statistix 8.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P=0.05$

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะของโคโลนีแบคทีเรีย ได้แก่ สี ขนาด รูปร่างโคโลนี ขอบโคโลนี การยกตัวของโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี ความโปร่งแสง การย้อมติดสีแบบแกรม ลักษณะแฟลกเจลลา และเอนโดสปอร์ บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48-72 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยา oxidase activity ด้วยวิธีของ Kovacs (1956) ทดสอบ citrate utilization ด้วยวิธีของ Simmons (1926) ทดสอบปฏิกิริยา catalase activity urea utilization carbohydrate utilization starch hydrolysis และ lipase hydrolysis ด้วยวิธีของ Barrow & Feltham (1993) และทดสอบ protease hydrolysis ด้วยวิธีของ Velho et al. (2018)

การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

สกัด DNA จากเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการดัดแปลงจากวิธีของ Cheng & Jiang (2006) และ Kumvinit & Akarapisan (2019) จัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA (16S ribosomal RNA) ยีน *gyrA* (DNA gyrase subunit A) และยีน *rpoB* (RNA polymerase beta subunit) เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ใช้ Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO CO., LTD.) ไพโรเมอร์ และ DNA ต้นแบบ ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 µl ในบริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA ใช้ไพโรเมอร์ 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 16SR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Song et al., 2011) จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตามขั้นตอนดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 64°C นาน 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที ปฏิบัติทั้งหมด 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที ได้ผลผลิต PCR ขนาด 1,500 bp ส่วนบริเวณตำแหน่งยีน *gyrA* ใช้ไพโรเมอร์ *gyrAF* (5'-CAGTCAGAAATGCGTACGTCCTT-3') และ *gyrAR* (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3') (Chun & Bae, 2000) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดย initial denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 45 วินาที annealing อุณหภูมิ 50°C นาน 45 วินาที extension อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที ปฏิบัติทั้งหมด 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที ได้ผลผลิต PCR ขนาด 970 bp และบริเวณตำแหน่งยีน *rpoB* ใช้ไพโรเมอร์ *rpoBF* (5'-AGGTCAACTAGTTTCAGTATGGACG-3') *rpoBRO* (5'-GTCCTACATTGGCAAGATCGTATC-3') (Huynh et al., 2022) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตามขั้นตอนดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 57°C นาน 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72°C นาน 50 วินาที ปฏิบัติทั้งหมด 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที ได้ผลผลิต PCR ขนาด 835 bp จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen, Inc. สาธารณรัฐเกาหลี ด้วยเทคนิค sanger sequencing นำผลข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ด้วยโปรแกรม blastn และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก phylogenetic tree โดยใช้โมเดล maximum likelihood (ML) ที่ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA 11

การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งข้าวกล้า ได้แก่ ยีนที่ควบคุมการผลิตสารในกลุ่ม iturin และ surfactin เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO CO., LTD.) ไพโรเมอร์ และ DNA ต้นแบบ ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 µl ตรวจสอบยีน iturin A (*ituA*) ที่มีผลผลิต PCR ขนาด 647 bp ใช้ไพโรเมอร์ ITUD1F (5'-GATGCGATCTCCTTGGATGT-3') และ ITUD1R (5'-ATCGTCATGTGCTGCTTGAG-3') (Narendra Kumar et al., 2017) และตรวจสอบยีน surfactin (*SrfAA*) ที่มีผลผลิต PCR ขนาด 201 bp ใช้ไพโรเมอร์ SRFA-F (5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3') และ SRFA-R (5'-CCACTCAAACGGATAATCCTGA-3') (Joshi & McSpadden-Gardener, 2006) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตามขั้นตอนดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที denaturation อุณหภูมิ 95°C นาน 45 วินาที annealing ของแต่ละยีนใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ ยีน iturin A

(*ituA*) อุณหภูมิ 58 °C และยีน surfactin (*SrfAA*) อุณหภูมิ 52°C นาน 45 วินาที extension อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที ปฏิกริยาทั้งหมด 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ใช้ 1% agarose ที่กำลังไฟฟ้า 100 V นาน 30 นาที

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าว

แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าวจากข้าวพันธุ์สันป่าตอง และข้าวพันธุ์กำแพงเมืองยอง ซึ่งเก็บตัวอย่างมา จากบ้านรวงใต้ ต.เชิงดอย อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2564 ด้วยวิธี dilution plating method สามารถแยกจากข้าวพันธุ์สันป่าตองได้จำนวน 28 ไอโซเลท และแยกจากข้าวพันธุ์กำแพงเมืองยองได้จำนวน 20 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 48 ไอโซเลท

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว

จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าวทั้งหมด 48 ไอโซเลท ด้วยวิธี dual culture พบว่ามี แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท KY16 และ KY17 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของข้าว พันธุ์กำแพงเมืองยอง ซึ่งมีลักษณะสีของโคโลนีที่ต่างกัน เมื่อบ่มในอุณหภูมิ 28°C นาน 5 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท KY16 และ KY17 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* มากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่มีประสิทธิภาพ ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P=0.05$ รัศมี บริเวณที่แสดงการยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท KY16 และ KY17 กับเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* มี ค่าประมาณ 12.70 mm และ 11.95 mm ตามลำดับ (Table 1) (Figure 1)

Table 1 Inhibition growth zone of the most effective antagonistic bacteria to inhibit *X. oryzae* pv. *oryzae* causal agent of bacterial leaf blight disease in purple rice by using the dual culture method on NA medium under 28°C for 5 days.

Antagonistic bacteria	Inhibition growth zone (mm) ¹
KY16	12.70 a ²
KY17	11.95 a
CV (%)	7.90
LSD	0.92

Note: ¹ The average data was calculated by using ten replications.

² Common latter within the same column indicated not significant differences by LSD at $P=0.05$.



Figure 1 Screening of the most effective antagonistic bacteria inhibited *X. oryzae* pv. *oryzae* causal agent of bacterial leaf blight disease in purple rice on NA medium by using dual culture method under 28°C for 5 days.

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคข้าวกล้าจำนวน 2 ไอโซเลท บนอาหาร NA นาน 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท KY16 และ KY17 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน (bacilli) ลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบ peritrichous เอนโดสปอร์มีลักษณะกลมรี (elliptical) และบวมพอง (bulging) อยู่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ (central endospore) มีลักษณะโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) แบนราบติดผิวหน้าอาหาร (flat) ขอบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) ผิวหน้าเป็นรอยย่น (rugose) ทึบแสง (opaque) เช่นเดียวกัน แต่แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลทมีลักษณะของสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท KY16 โคโลนีมีสีเหลืองครีม และ ไอโซเลท KY17 โคโลนีมีสีขาวขุ่น (Figure 2) จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่ามีความสมบัติเหมือนกัน คือ สามารถเคลื่อนที่ได้ ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา oxidase activity catalase activity urea utilization และ hydrolytic activities ได้แก่ starch hydrolysis lipase hydrolysis และ protease hydrolysis แต่ให้ผลลบกับปฏิกิริยา citrate utilization อีกทั้งมีความสามารถในการใช้น้ำตาล D-glucose แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล D-galactose และ D-trehalose สอดคล้องกับการศึกษาของ Shen et al. (2022) ที่แยกแบคทีเรีย *B. siamensis* ไอโซเลท Gxun-6 จากดินบริเวณรอบรากกล้วย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถย่อย Tween 80 ซึ่งให้ผลบวกกับปฏิกิริยา lipase hydrolysis และใช้น้ำตาล glucose ได้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Feng et al. (2022) ที่แยกแบคทีเรีย *B. siamensis* ไอโซเลท WB1 จากรากของวอลนัท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ โคโลนีมีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน และขอบโคโลนีมีลักษณะย่น ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา oxidase activity catalase activity และ urea utilization ผลิตเอนไซม์ protease สามารถย่อยโปรตีนได้ ซึ่งให้ผลบวกกับปฏิกิริยา protease hydrolysis และสามารถย่อยแป้งได้ซึ่งให้ผลบวกกับปฏิกิริยา starch hydrolysis

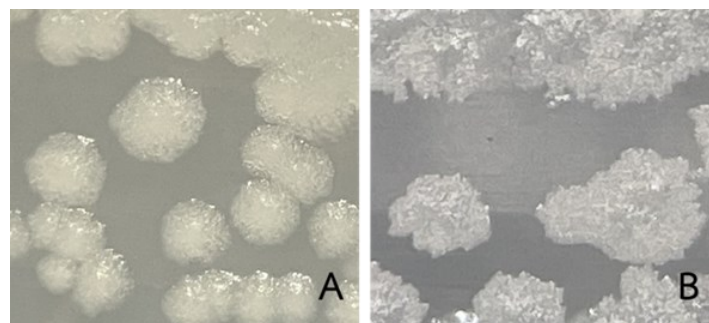


Figure 2 Antagonistic bacterial colonies on NA medium under 28°C for 48 hours.

(A) Isolate KY16. (B) Isolate KY17.

การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีนทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน 16S rRNA *gyrA* และ *rpoB* จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blastn และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ที่ค่า bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง ในบริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Bacillus* spp. ทั้งหมด 1,413 ตำแหน่ง บริเวณตำแหน่งยีน *gyrA* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 919 ตำแหน่ง และบริเวณตำแหน่งยีน *rpoB* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 709 ตำแหน่ง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลทจัดจำแนกเป็น *Bacillus siamensis* โดยไอโซเลท KY16 มีความใกล้เคียงกับ *B. siamensis* ไอโซเลท YB-1631 (CP110268.1) และไอโซเลท KY17 มีความใกล้เคียงกับ *B. siamensis* ไอโซเลท B28 (CP066219.1) (Figure 3) ซึ่งแบคทีเรีย *B. siamensis* มีรายงานว่าสามารถแยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืช (Shen et al., 2022) รากพืช (Feng et al., 2022) และเนื้อเยื่อของพืช (Gorai et al., 2021) อีกทั้งมีการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของพืช เช่น การศึกษาของ Xie et al. (2021) ได้นำ *B. siamensis* ไอโซเลท LZ8 ที่แยกจากดินมาใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria alternata* สาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลในยาสูบ และ Hussain & Khan (2022) ได้นำ *B. siamensis* ไอโซเลท AMU03 แยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันมาใช้ควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne) และเป็นสาเหตุโรคที่สำคัญในหัวมันฝรั่ง

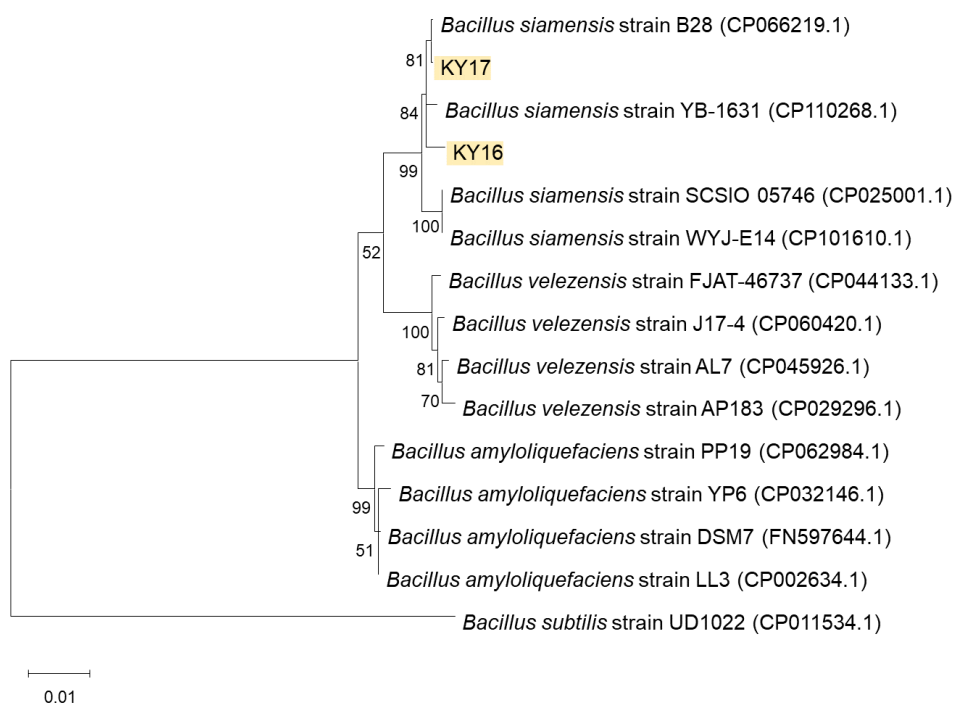


Figure 3 Phylogenetic analysis of antagonistic bacteria based on 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* gene sequences by using maximum likelihood (ML) method with bootstraps 1,000 replications and *Bacillus subtilis* strain UD1022 was used an out group.

การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. siamensis* ไอโซเลท KY16 และ KY17 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมะเร็งมากที่สุด โดยใช้เทคนิค PCR และ specific primer ตรวจสอบยีน *iturin A (ituA)* และ *surfactin (SrfAA)* ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ *iturin A* และ *surfactin* โดย *iturin A* จะปรากฏแถบผลผลิต PCR ที่ตำแหน่งประมาณ 647 bp และ *surfactin* จะปรากฏแถบผลผลิต PCR ที่ตำแหน่งประมาณ 201 bp แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *B. siamensis* ทั้ง 2 ไอโซเลท มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มสาร *iturin* และ *surfactin* สอดคล้องกับการศึกษาแบคทีเรีย *B. siamensis* ไอโซเลท JFL15 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร เช่น กลุ่ม *surfactin (srf)*, *bacillibactin (dhh)* และ *fengycin (fen)* เมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยกระบวนการ LC-MS/MS analysis พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารในกลุ่ม *iturin A* และ *bacillomycin F* (Xu et al., 2018a) อีกทั้งการตรวจสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย *B. siamensis* ไอโซเลท JFL15 ในการผลิตสารกลุ่ม *surfactin fengycin iturin* และ *bacillomycin* จากยีน *sfp srfD fenB ituA ituC* และ *bamD* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า *B. siamensis* ไอโซเลท JFL15 มียีนที่ผลิตสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าว โดยปรากฏแถบ DNA ของยีนเป้าหมาย จากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis (Xu et al., 2018b)

สรุปผลการศึกษา

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าวทั้งหมด 48 ไอโซเลท ด้วยวิธี dual culture พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท KY16 และ KY17 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของข้าวพันธุ์กำแพงเมืองทอง มีประสิทธิภาพมากที่สุดใน การควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวกล้า เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มของ *Bacillus* sp. เมื่อจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากยีนทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน 16S rRNA, *gyrA* และ *rpoB* พบว่าจัดจำแนกเป็น *Bacillus siamensis* และตรวจสอบยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมียีนผลิตสารในกลุ่มของ *iturinA* และ *surfactin* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรคขอบใบแห้งของข้าวกล้าในแปลงปลูกได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนนักศึกษาช่วยสอนและช่วยวิจัย (Teaching Assistant and Research Assistant Scholarship) จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย และศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การอนุเคราะห์และสนับสนุนในการศึกษารั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Azizi, P., Rafil, M. Y., Abdullah, S. N. A., Nejat, N., Maziah, M., Hanafi, M. M., Latif, M. A., & Sahebi, M. (2016). Toward understanding of rice innate immunity against *Magnaporthe oryzae*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36(1), 165-174. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.946883>
- Barrow, G., & Feltham, R. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cheng, H. R., & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*. 28(1), 55-59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>

- Chun, J., & Bae, K. S. (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. 78(2), 123-127. <https://doi.org/10.1023/A:1026555830014>
- Feng, X., Xu, R., Zhao, N., Wang, D., Cun, M., & Yang B. (2022). Isolation, identification, and characterization of endophytic *Bacillus* from walnut (*Juglans sigillata*) root and its biocontrol effects on walnut anthracnose. **Agriculture**. 12(12), 1-18. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122102>
- Fongfon, S., Pusadee, T., Prom-u-thai, C., & Rerkasem, B. (2021). Diversity of purple rice (*Oryza sativa* L.) landraces in Northern Thailand. **Agronomy**. 11(10), 1-14. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102029>
- Gorai, P. S., Ghosh, R., Mandal, S., Ghosh, S., Chatterjee, S., Gond, S. K., & Mandal, N. C. (2021). *Bacillus siamensis* CNE6- a multifaceted plant growth promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad spectrum antifungal activities and host colonizing potential. **Microbiological Research**. 252, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126859>
- Hussain, T., & Khan, A. A. (2022). Biocontrol prospective of *Bacillus siamensis*-AMU03 against soil-borne fungal pathogens of potato tubers. **Indian Phytopathology**. 75(1), 179-189. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00447-8>
- Huynh, T., Voros, M., Kedves, O., Turbat, A., Sipos, G., Leitgeb, B., Kredics, L., Vagvolgyi, C., & Szekeres A. (2022). Discrimination between the two closely related species of the operational group *B. amyloliquefaciens* based on whole-cell fatty acid profiling. **Microorganisms**. 10(2), 1-13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020418>
- Jin, P., Wang, Y., Tan, Z., Liu, W., & Miao, W. (2020). Antibacterial activity and rice-induced resistance, mediated by C15surfactin A, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 169, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104669>
- Joshi, R., & McSpadden Gardener, B. B. (2006). Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**. 96(2), 145-154. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0145>
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**. 178, 703. <https://doi.org/10.1038/178703a0>
- Kumvinit, A., & Akarapisan, A. (2019). Characterization of blackleg and soft rot from potato in northern Thailand. **Journal of Phytopathology**. 167(11-12), 655-666. <https://doi.org/10.1111/jph.12859>
- Narendra Kumar, P., Swapna, T. H., Khan, M. Y., Reddy, G., & Hameeda B. (2017). Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. **Saudi Journal Biological Sciences**. 24(7), 1722-1740. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.014>
- Ngalimat, M. S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Mohd Zainudin, N. A. I., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. **Microorganisms**. 9(4), 1-23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>
- Nino-Liu, D. O., Ronald, P. C., & Bogdanove, A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. **Molecular Plant Pathology**. 7(5), 303-324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x>
- Pusadee, T., Wongtamee, A., Rerkasem, B., Olsen, K. M., & Jamjod, S. (2019). Farmers drive genetic diversity of Thai purple rice (*Oryza sativa* L.) landraces. **Economic Botany**. 73(1), 76-85. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102029>
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D. Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**. 144, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- Senakun, C., Chunta, S., Somboonwattanakul, I., Yodsiri, S., Kurukodt, J., & Senakun, A. (2018). Diversity, utilization and cultural significance of purple rice in northeastern Thailand. **International Journal of Agricultural Technology**. 14(7), 1893-1904.
- Shen, N., Li, S., Li, S. Y., Zhang, H., & Jiang, M. (2022). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus siamensis* Gxun-6, has an antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and promotes the growth of banana. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. 32(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00533-7>
- Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi: with colored plate. **The Journal of Infectious Diseases**. 39(3), 209-214. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.3.209>

- Sombunjitt, S., Sriwongchai, T., Kuleung, C., & Hongtrakul, V. (2017). Searching for and analysis of bacterial blight resistance genes from Thailand rice germplasm. **Agriculture and Natural Resources**. 51(5), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.11.001>
- Song, Z., Liu, K., Lu, C., Yu, J., Ju, R., & Liu, X. (2011). Isolation and characterization of a potential biocontrol *Brevibacillus laterosporus*. **African Journal of Microbiology Research**. 5(18), 2675-2681. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.335>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**. 267, 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Talbot, N. J. (2003). On the trial of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaprothe grisea*. **Annual Review of Microbiology**. 57, 177-202. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090957>
- Velho, A. C., Mondino, P., & Stadnik, M. J. (2018). Extracellular enzymes of *Colletotrichum fructicola* isolates associated to apple bitter rot and Glomerella leaf spot. **Mycology**. 9(2), 145-154. <https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1464525>
- Xie, S., Zang H., Wu, H., Uddin Rajer, F., & Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**. 19(1), 49-58. <https://doi.org/10.1111/mpp.12494>
- Xie, Z., Li, M., Wang, D., Wang, F., Shen, H., Sun, G., Feng, C., Wang X., Chen, D., & Sun X. (2021). Biocontrol efficacy of *Bacillus siamensis* LZ8 against brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*. **Biological Control**. 154, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104508>
- Xu, B. H., Lu, Y. Q., Ye, Z. W., Zheng, Q. W., Wei, T., Lin, J. F., & Guo, L. Q. (2018a). Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15. **Plos One**. 13(8), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202893>
- Xu, B. H., Ye, Z. W., Zheng, Q. W., Wei, T., Lin, J. F., & Guo, L. Q. (2018b). Isolation and characterization of cyclic lipopeptides with broad-spectrum antimicrobial activity from *Bacillus siamensis* JFL15. **3 Biotech**. 8(444), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1443-4>

วันรับบทความ (Received date) : 18 พ.ย. 65

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 19 เม.ย. 66

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 4 พ.ค. 66

<https://doi.org/10.55003/kmaj.2023.12.28.006>