ประสิทธิภาพของสายพันธุ์กลายที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งแยกจากดินรอบรากในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

Efficacy of Mutant Strain Derived from Antagonistic Bacteria Isolated from Rhizosphere Soil for the Control of Cucumber Seedling Damping-off Caused by *Pythium aphanidermatum*

อนุสรา ตะเคียนเกลี้ยง[1] วรรณวิไล อินทนู[1,*] และ จิระเดช แจ่มสว่าง[1]
Anusara Thakhiankliang[1], Wanwilai Intanoo[1,*] and Chiradej Chamswarng[1]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
รับเรื่อง: กรกฎาคม 2560 Received: July 2017
รับตีพิมพ์: พฤศจิกายน 2560 Accepted: November 2017
* Corresponding author: agrwli@ku.ac.th

ABSTRACT: Mutation of antagonistic bacteria isolate KR7 (wild type strain) was induced by using ultraviolet (UV) radiation. Cell suspension of bacteria isolate KR7 was exposed at a distance of 15 cm under the UV lamp for 1–5 minutes before serial diluted and spread onto nutrient glucose agar (NGA). Fourty-seven mutant isolates were obtained from UV-induced mutation and among these isolates, thirty-three isolates were resistant to 100 ppm Rifampicin antibiotic. All these isolates were tested for the efficacy to inhibit mycelial growth of *Pythium aphanidermatum* (Pa), the causal agent of cucumber seedling damping–off by dual culture technique on potato dextrose agar (PDA). The result showed that nine mutant isolates effectively inhibited mycelial growth of a pathogen by 40.38%–52.38%. These nine mutant isolates were further tested for the disease control efficacy under greenhouse condition. Cucumber seeds were soaked in 10^8 cfu/ml antagonistic bacterial cell suspension for 15 minutes before sowing in Pa-infested soil and compared with the Pa-inoculated control (+Pa), metalaxyl and Larminar® (*Bacillus subtilis*). After sowing for 7 days, nine mutant isolates provided 73.33%–100% of seed germination with were higher than a Pa-inoculated control (+Pa). After sowing for 14 days mutant isolates KRM7.31–Rif and KRM7.13–Rif provided 99.33% and 86.67% of survived seedlings respectively. These survival percentanges were significantly higher than the Pa-inoculated control (+Pa) but were comparable to the wild type isolate KR7. Both isolates also reduced pathogen inoculum in soil, increase percentanges of root colonization and promoted growth of cucumber seedlings as compared with the Pa-inoculated control (+Pa).

Keywords: Bacteria, ultraviolet radiation, mutation, damping-off, biocontrol

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยวางเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี 15 เซนติเมตร เป็นเวลา 1–5 นาที จากนั้นนำไปเจือจางและเกลี่ยบนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์พบแบคทีเรียสายพันธุ์กลายจำนวน 47 โอโซเลต และในจำนวนดังกล่าวพบ 33 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa) สาเหตุโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าแตงกวา ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย จำนวน 9 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค Pa ได้ ในระดับ 40.38%–52.38% จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองโดยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรค Pa เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (+Pa) สารเคมี metalaxyl และ Larminar® (*Bacillus subtilis*) จากผลการทดลองหลังการปลูก 7 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์ต้นงอกอยู่ระหว่าง 73.33%–100% ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียว (+Pa) และที่ 14 วัน พบว่าไอโซเลต KRM7.31–Rif และ KRM7.13–Rif แสดงเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 93.33% และ 86.67% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (+Pa) อย่างมีนัยสำคัญ และเทียบเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม (KR7) ทั้งสองไอโซเลตสามารถลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากสูง และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าแตงกวา เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค (+Pa)

คำสำคัญ: แบคทีเรีย, รังสีอัลตราไวโอเลต, การกลายพันธุ์, โรคเน่าระดับดิน, การควบคุมโดยชีววิธี

บทนำ

โรคเน่าระดับดินของกล้าแตงกวา มีสาเหตุหลักจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Oomycetes พบการเข้าทำลายในระยะเมล็ดหรือต้นกล้าส่วนที่อยู่ใต้ดิน และต้นอ่อนที่โผล่พ้นดินประมาณ 1–2 สัปดาห์ หลังจากปลูก ทำให้ต้นกล้าไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมแก้ไขปัญหาด้วยการใช้สารเคมีควบคุมโรค ซึ่งนับว่าเป็นผลกระทบในระยะยาว ทำให้สารเคมีตกค้างในดินมีการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม ปัจจุบันจึงพยายามลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช แล้วหันมาให้ความสนใจจุลินทรีย์กันมากขึ้น จึงได้มีการคัดเลือกจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหล่านี้ และปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชมากยิ่งขึ้น และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบการเกษตรได้นานขึ้น วิธีการหนึ่งที่นิยมใช้คือ การชักนำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต จากการทดลองของ Srihattagum and Aurairong (2012) ที่ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี ผลการทดลองพบ 117 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* และ *Sclerotium rolfsii* ได้มากยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสียูวี ในจำนวนนี้พบทั้งที่สร้างสารพิษรุนแรงทำให้ปลายเส้นใยของ *M. phaseolina* บริเวณ clear zone ตายเป็นสีเหลืองและชะงักการเจริญของเส้นใยได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 ชนิดแกรมบวก มาชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin เพื่อง่ายต่อการติดตามตรวจสอบมาศึกษาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ และการควบคุมโรคเน่าระดับดินในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strain)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การชักนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 สายพันธุ์ดั้งเดิมชนิดแกรมบวก ที่แยกได้จากดินรอบรากแตงกวา (rhizosphere soil) และผ่านการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การละลายฟอสเฟต การสร้างสารไซเดอโรฟอร์ และการทดสอบในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง แล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *P. aphanidermatum* มาชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และดัดแปลงการทดลองของ Kositratana (2006) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหารเหลว Nutrient glucose broth (NGB) หมุนเหวี่ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) ที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดใส่หลอดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย 0.1 M $MgSO_4$ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปฉายรังสีอัลตราไวโอเลต หรือ รังสียูวี (ขนาด 30 วัตต์ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 1–5 นาที โดยวางจานเลี้ยงเชื้อห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี 15 เซนติเมตร จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยดังกล่าวมาเจือจางที่ 10^{-7} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (cfu/ml) และใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร NGA ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ผ่านการฉายรังสี และแยกเก็บโคโลนีของเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารที่ผสมด้วยสารปฏิชีวนะ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 100 ppm ต่อไป

2. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และเก็บไว้ในอาหารเอียง NGA ข้างต้นมา streak ลงบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ความเข้มข้น 1 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารดังกล่าวมา streak ซ้ำ 2–3 ครั้ง ที่ความเข้มข้นเดิมเพื่อให้เกิดความคงตัวและเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะขึ้นเป็น 5, 10, 20, 50 และ 100 ppm ตามลำดับ (Meeglinhom, 2003) นำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย (mutant strains) มาเก็บรักษาไว้ในอาหารเอียง NGA ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเช่นเดียวกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strain) ต่อไป

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจาก Saowapak, 2009)

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธีการ dual culture (ดัดแปลงจาก Royse and Ries, 1978) โดยใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายมาขีดบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ 2 แนวในทิศทางขนานกัน ระยะห่าง 4 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปวางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยวัดรัศมีของเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่เจริญออกมาจากจุดศูนย์กลางและความกว้างของบริเวณใส (clear zone, inhibition zone) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยจากสูตร (R1-R2/R1)x100 โดยที่ R1 คือ

รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุม และ R2 คือ รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีทดสอบ จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ไปทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

4. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในเรือนปลูกพืชทดลอง (ดัดแปลงจาก Saowapak, 2009; Kumyod, 2014)

เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย โดย cross streak บนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และนำมาวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ optical density (OD) ที่ 0.2 (10^8 cfu/ml)

เตรียมเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตัดเส้นใยของเชื้อราที่เจริญอยู่บนอาหารให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และใส่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตรา 1 จานเลี้ยงเชื้อ ต่อน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จนละเอียด เป็นเวลา 1 นาที

เตรียมดินปลูก โดยการใช้ดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที บรรจุดิน 350 กรัม ลงกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว ที่ผ่านการล้างให้สะอาดแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 10 ลิตร เป็นเวลา 15–30 นาที นำเมล็ดแตงกวาพันธุ์ลูกผสมไมโครเวฟ 55 แช่ในเซลล์แขวนของลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เป็นเวลา 15–20 นาที ก่อนปลูกลงในกระถางและปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเส้นใยแขวนลอย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อกระถาง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) มีกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ตรวจบันทึกผลเปอร์เซ็นต์ต้นงอกและต้นรอดตาย ที่ 7 วัน และ 14 วัน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม R (R- language and environment for statistical computing and graphics) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากกรรมวิธีต่าง ๆ โดย Least significant difference (LSD) ($P>0.05$) ดังนี้

กรรมวิธี 1 กรรมวิธีควบคุมแช่เมล็ดด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่ปลูกเชื้อรา (-Pa)
กรรมวิธี 2 กรรมวิธีควบคุมแช่เมล็ดด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 3 แช่เมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 4 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KR7 wt และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 5 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.6-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 6 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.10-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 7 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.12-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 8 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.13-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 9 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.20-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 10 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.22-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 11 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.24-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 12 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.31-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 13 แช่เมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KRM7.32-Rif และปลูกเชื้อรา (+Pa)
กรรมวิธี 14 แช่เมล็ดด้วย Larminar® (*B. subtilis*) และปลูกเชื้อรา (+Pa)

5. การตรวจนับปริมาณเชื้อและการเจริญครอบครองราก

ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายในดินหลังปลูก 14 วัน โดยทำการสุ่มดินจาก 3 กระถาง ๆ ละ 1 กรัม ใส่ในหลอดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นที่ 10^{-2} เท่า ก่อนนำไปตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Surface Soil Dilution Plate (SSDP) บนอาหารจำเพาะ modified BNPRA (Chamswarng *et al*., 1985) สำหรับตรวจเชื้อราสาเหตุโรค และบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 50 ppm สำหรับตรวจแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24–72 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณโคโลนีของเชื้อ (cfu/g)

การเจริญครอบครองราก สุ่มรากแตงกวาหลังจากปลูก 14 วัน นำรากมาล้างผ่านน้ำไหลให้สะอาด ซับรากให้แห้ง ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางบนอาหารจำเพาะ modified BNPRA สำหรับตรวจนับเชื้อราสาเหตุโรค ส่วนการตรวจนับแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายใช้วิธีการวางรากบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 50 ppm บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24–72 ชั่วโมง ก่อนตรวจนับปริมาณการครอบครองรากโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การชักนำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

การชักนำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่ามีแบคทีเรียรอดตายหลังการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต 47 ไอโซเลต คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 38.52% จากผลการทดลองใน (Table 1) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตให้นานขึ้นทำให้ปริมาณเชื้อหรือจำนวนโคโลนีลดลง อาจมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตและการกลายพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่นปริมาณเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย โดยเฉพาะเซลล์แขวนลอยที่อยู่ด้านบนที่ได้รับรังสีมากกว่าเซลล์แขวนลอยที่อยู่ด้านล่าง ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ระยะห่างของรังสีที่ใช้วางจนถึงเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย เวลาที่ใช้ในการฉายรังสี และปริมาณรังสียูวีที่เหมาะสม ปัจจัยที่กล่าวมานี้อาจมีความเกี่ยวเนื่องกับสารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิกในแบคทีเรีย ที่ดูดกลืนหรือดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตได้มากหรือน้อย ถ้าดูดซับรังสีได้มากจะทำให้เกิดการตายของเซลล์มาก แต่ถ้าดูดซับรังสีได้น้อยและในปริมาณที่พอเหมาะ จะทำให้นิวเคลียสของเซลล์เกิดการกลายพันธุ์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในเบส ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่จับกับเบสเกิดการแตกหักได้ Cleaver (2003) รายงาน ถึงแม้จะเกิดความเสียหายที่กรดนิวคลีอิกไปบางส่วนแต่กระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ยังดำเนินต่อไป เนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์สามารถซ่อมแซมตัวเองจากความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์สามารถฟื้นตัวได้หลังจากผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต หรือ รังสียูวี

Table 1 Time rate and percentage of survival bacteria KR7 after radiating with ultraviolet (UV) radiation

UV radiation time (minute)	Survival isolate found (isolate/colonies)	Survival percentage (%)
0	122	100.00
1	26	21.31
2	8	6.56
3	6	4.92
4	4	3.28
5	3	2.46
total	47	38.52

2. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย KR7 หลังจากฉายรังสียูวีพบโคโลนีรอดชีวิตรวมทั้งหมด 47 ไอโซเลต เมื่อนำมาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin พบแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายจำนวน 33 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถต้านทานได้ จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่อไป

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture ทั้งหมด 33 ไอโซเลต ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin พบแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย 9 ไอโซเลต แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ KRM7.6–Rif, KRM7.12–Rif, KRM7.22–Rif และ KRM7.32–Rif โดยมีเปอร์เซ็นต์เท่ากันคือ 52.38% รองลงมาได้แก่ KRM7.24–Rif และ KRM7.10–Rif มีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 47.67% และ 45.24% ตามลำดับ และไอโซเลต KRM7.13–Rif, KRM7.20–Rif และ KRM7.31–Rif มีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 40.38% การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีอาจทำให้บางไอโซเลตสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยไป และอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษหรือสารทุติยภูมิต่าง ๆ แต่ในขณะเดียวกันบางไอโซเลตก็มีความสามารถในการยับยั้งเส้นใยดีขึ้น หรือมีผลทำให้มีการสร้างสารพิษหรือสารปฏิชีวนะที่รุนแรงยิ่งขึ้น โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย KRM7.32–Rif, KRM7.22–Rif, KRM7.12–Rif และ KRM7.6–Rif มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งทำให้เกิดบริเวณ clear zone มีขนาดเท่ากับ 0.58, 0.57, 0.57 และ 0.56 เซนติเมตร (Figure 1) ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่ผ่านรังสียูวีซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Srihattagum and Aurairong, 2012) (Table 2)

Figure 1 Inhibition of *Pythium aphanidermatum* mycelial growth on Potato dextrose agar (PDA) by antagonistic mutant bacteria KRM7.31–Rif (A) and KRM7.32–Rif (B)

Table 2 Percentang of seed germination at 7 days, survived cucumber seedling and plant height at 14 days after soaking in cell suspension of antagonistic mutant bacteria under greenhouse condition

Treatment	Inhibition (%)	Clear zone (cm)	Seed germination 7 days (%)	Survived seedling 14 days (%)	Plant height 14 days (cm)
Control (–Pa)[1/]	Nd[2/]	Nd	100.00[a3/]	100.00[a]	25.67[ab]
Control (+Pa)[1/]	0.00[f]	0.00	66.67[c]	20.00[cd]	17.67[g]
metalaxyl + Pa	Nd	Nd	93.33[ab]	100.00[a]	20.67[f]
KR7 wt + Pa	32.52[e]	0.00	86.67[a-c]	80.00[ab]	24.67[b-d]
KRM7.6–Rif + Pa	52.38[a]	0.56	80.00[a-c]	26.67[cd]	22.67[d-f]
KRM7.10–Rif + Pa	45.24[c]	0.44	100.00[a]	0.00[d]	Ns[2/]
KRM7.12–Rif + Pa	52.38[a]	0.57	100.00[a]	0.00[d]	Ns
KRM7.13–Rif + Pa	40.48[d]	0.36	93.33[ab]	86.67[ab]	23.67[b-d]
KRM7.20–Rif + Pa	40.48[d]	0.35	73.33[bc]	0.00[d]	Ns
KRM7.22–Rif + Pa	52.38[a]	0.57	93.33[ab]	0.00[d]	Ns
KRM7.24–Rif + Pa	47.67[b]	0.48	100.00[a]	53.33[bc]	23.50[b-e]
KRM7.31–Rif + Pa	40.48[d]	0.36	100.00[a]	93.33[ab]	24.00[b-d]
KRM7.32–Rif + Pa	52.38[a]	0.58	86.67[a-c]	26.67[cd]	23.00[c-f]
Larminar® + Pa	Nd	Nd	100.00[a]	80.00[ab]	25.00[a-d]
C.V.	1.33	Nd	19.44	42.91	4.61

[1/] Control treatments with the uninoculation (-Pa) and inoculation (+Pa) of *Pythium aphanidermatum*
[2/] Not determined (Nd) and Not survived seedling (Ns)
[3/] Means in each column followed by the same letter (s) are not significantly different according to Least significant difference (LSD) ($P > 0.05$)

4. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในเรือนปลูกพืชทดลอง

ทดสอบด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย 9 ไอโซเลต ที่ยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต ดังกล่าวช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ต้นงอกที่ 7 วัน ได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (+Pa) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่งเสริมการงอกของเมล็ดได้ดีในขณะที่ปลูกร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค และจากการตรวจนับเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วัน พบว่า KRM7.31–Rif แสดงเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูงสุด (93.33%) รองลงมาคือ KRM7.13–Rif (86.67%) ซึ่งไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (+Pa) ที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ (Table 2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียสามารถครอบครองบนผิวเมล็ดและรากได้ดี อยู่รวมกับรากพืชหรือปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อม สร้างสารยับยั้งโรค ส่งผลให้ต้นพืชมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูง แต่ในขณะเดียวกัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายบางไอโซเลตไม่ช่วยให้มีต้นรอดตาย อาจมีสาเหตุมาจากช่วงปลูกเป็นฤดูร้อน อุณหภูมิเหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับการรายงานของ Van Der Plaats-Niterink (1981) ที่พบว่าเชื้อรา *P. aphanidermatum* ชอบและเข้าทำลายพืชได้ดีในอุณหภูมิที่สูงประมาณ 35–40 °C และจากการศึกษาของ Georgakopoulos *et al*. (2002) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สกุล *Bacillus* ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในห้องปฏิบัติการอาจจะควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีในเรือนปลูกพืชทดลอง ด้วยวิธีการผลิตสารระเหยต่อต้านเชื้อรา (volatile antifungal compound) และอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถใช้อาหารรอบรากพืชได้ดี ผลิตสารทุติยภูมิในการควบคุมโรค และสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญได้ (Timmusk, 2003) นอกจากนี้การตรวจความสูงของต้นที่ 14 วัน พบว่าต้นพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพที่มีเชื้อราสาเหตุโรคปลูกร่วมอยู่ด้วย อาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตทำให้มีความสูงต้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียว มีการรายงานว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas* สามารถละลายฟอสเฟต และ ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ (Oteino *et al*., 2015) จึงทำให้มีปริมาณฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเพิ่มขึ้น สารไซเดอโรฟอร์ก็มีคุณสมบัติไปจับธาตุเหล็กในดินทำให้เชื้อราสาเหตุโรคไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ได้ ส่งผลต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพและส่งเสริมต้นพืชให้มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ KR7 ก็มีคุณสมบัติดังกล่าวเช่นกัน

5. การตรวจนับปริมาณเชื้อและการเจริญครอบครองราก

การตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายในดิน พบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคมีปริมาณเชื้อสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ส่วนกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อร่วมกับการแช่เมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายพบว่าทุกกรรมวิธีมีปริมาณเชื้อโรคลดลงประมาณ 10–20 เท่า และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย KRM7.31–Rif และ KRM7.24–Rif ตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินที่สูง 7.33×10^3 cfu/g และ 3.00×10^3 cfu/g จึงส่งผลให้ตรวจพบปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคลดลง

เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก พบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียวตรวจพบปริมาณรากที่มีเชื้อโรคสูงถึง 93.33% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย KRM7.32–Rif (86.67%) ในขณะที่ KRM7.6–Rif, KRM7.13–Rif และ KRM7.31–Rif ตรวจไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคเลย ส่วนแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากได้ดีคือ KRM7.31–Rif, KRM7.24–Rif และ KRM7.6–Rif โดยมีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากเท่ากับ 73.33, 66.67 และ 53.33% ตามลำดับ ส่วน Larminar® มีการครอบครองราก 40% (Table 3) จากการทดลองนี้พบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับการแช่เมล็ดด้วยเชื้อ KRM7.31–Rif มีศักยภาพในด้านต่างๆ ทั้งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย ต้นรอดตาย ความสูงต้น ตลอดจนปริมาณเชื้อและการครอบครองรากได้ในปริมาณที่สูงกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ในเรือนปลูกพืชทดลอง อาจเป็นเพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ ความชื้นอากาศ และความเป็นกรดด่าง ฯลฯ ทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลายสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ดีในสภาพแวดล้อมเช่นนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ก็ยังมีกลไกที่สำคัญในการยับยั้งโรคได้ เช่น การแข่งขัน การเป็นปรสิตโดยตรง การสร้างสารปฏิชีวนะ และการชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (Whipps, 2001) ซึ่งกิจกรรมกรรมเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันที่ซับซ้อน ระหว่าง พืช จุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อม (Chamswarng, 2006)

Table 3 Population and root colonization of antagonistic mutant bacteria and *Pythium aphanidermatum* after planting 14 days under greenhouse condition

Treatment	Population (cfu/g)		Root colonization (%)	
	Antagonistic bacteria	Pa	Antagonistic bacteria	Pa
Control (–Pa)[1/]	0.00	0.00	00.00	00.00
Control (+Pa)[1/]	0.00	3.20×10^3	00.00	93.33
metalaxyl + Pa	0.00	0.00	00.00	00.00
KR7 wt+Pa	Nd[2/]	1.00×10^1	Nd	33.33
KRM7.6–Rif+Pa	2.67×10^3	0.00	53.33	00.00
KRM7.10–Rif+Pa	0.00	0.00	Nd	Nd
KRM7.12–Rif+Pa	1.00×10^3	0.67×10^1	Nd	Nd
KRM7.13–Rif+Pa	5.00×10^2	0.00	33.33	00.00
KRM7.20–Rif+Pa	1.67×10^3	0.00	Nd	Nd
KRM7.22–Rif+Pa	6.70×10^2	1.67×10^2	Nd	Nd
KRM7.24–Rif+Pa	3.00×10^3	1.33×10^2	66.67	53.33
KRM7.31–Rif+Pa	7.33×10^3	1.00×10^1	73.33	00.00
KRM7.32–Rif+Pa	6.70×10^2	0.10×10^1	33.33	86.67
Larminar®+Pa	Nd	0.00	Nd	40.00

[1/] Control treatments with the uninoculation (-Pa) and inoculation (+Pa) of *Pythium aphanidermatum*
[2/] Not determined (Nd)

สรุป

แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต KRM7.31–Rif สายพันธุ์กลายจากรังสีอัลตราไวโอเลต และต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม การแช่เมล็ดแตงกวาด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย KRM7.31–Rif ก่อนปลูกช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ต้นงอก (100%) และต้นรอดตายสูง (93.33%) รวมทั้งมีความสูงต้น (24 cm) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียว และยังเทียบเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม KR7 นอกจากนี้ยังตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินและการเจริญครอบครองรากพืชของแบคทีเรียในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ส่งผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคลดลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ และเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่อนุเคราะห์สถานที่ในทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Chamswarng, C., P. Leeprasert and S. Chantana-o-tan. 1985. Population assesments of soil borne plant pathogens, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. in soil and their correlation to disease incidence on intercropping system. *In* Cropping Programmes KU- ACNARP. Faculty of Agriculture, Kasetsart Univ., Bangkok, Thailand. 80 p.

Chamswarng, C. 2006. Biological control of plant disease. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 323 p. (in Thai).

Cleaver, J.E. 2003. Photoreactivation. DNA Repair 2: 629 – 638.

Georgakopoulos, D.G., P. Fiddaman, C. Leifert and N.E. Malathrakis. 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. J. Appl. Microbiol. 92: 1078 – 1086.

Kositratana, W. 2006. Laboratory in Bacterial Diseases of Plants. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 174 p. (in Thai)

Kumyod, N. 2014. Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Damping-off of Cucumber Seedlings Caused by *Pythium aphanidermatum.* M.S. Thesis, Kasetsart University, Nakhon Pathom. (in Thai)

Meeglinhom, J. 2003. Screening and Application of Phylloplane Microorganisms for the Control of *Colletotrichum* spp. Causing Anthracnose of Chilli. M.S. Thesis, Kasetsart University, Nakhon Pathom. (in Thai)

Oteino, N., R.D. Lally, S. Kiwanuka, A. Lloyd, D. Ryan, K.J. Germaine and D.N. Dowling. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. Front. Microbiol. 6: 745.

Royse, D.J. and S.M. Ries. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cinota*. Phytopathology 68: 603–607.

Saowapak, P. 2009. Efficacy of Root Colonizing Bacteria for the Control of Root Rot on Hydroponically Grown Lettuce Caused by *Pythium aphanidermatum*. M.S.Thesis, Kasetsart University, Nakhon Pathom. (in Thai)

Srihattagum, M. and H. Aurairong. 2012. Generalized Mutagenesis of *Bacillus subtilis*. Biotechnology Research and Development office, Department of Agriculture. 1–25 p. (in Thai)

Timmusk, S. 2003. Machanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. PhD Thesis, Uppsala University, Sweden.

Van Der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 242.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487–511.

Zuber, P., M.M. Nakano and M.A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics, p. 897–917. *In* Sonenshein, A.C., J.A. Hooh and R. Losick. eds. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA.