รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : -

2. **โครงการวิจัย** : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Efficacy of Actinomyces in Controlling Importance Economic Disease For Seed Production Field

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต
   ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวสุมนา จำปา
   ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
   นายจิระ สุวรรณประเสริฐ
   สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

5. **บทคัดย่อ**

ศึกษาผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Streptomyces aminophillus, Streptomyces alboniger* และ *Streptomyces avellaneus* และเชื้อที่แยกได้ 19 ไอโซเลตจากดินรอบรากถั่วเหลืองต่อการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคสำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. แต่เชื้อที่แยกได้มี 1 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้แก่ PSL 49 เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปทำการทดสอบการควบคุมโรคในถั่วเหลืองภายใต้โรงเรือนตามกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก ใส่ในดินก่อนปลูก โรยข้างต้น และฉีดพ่นบนใบถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

Abstract

The effect of actinomycetes; *Streptomyces aminophillus, Streptomyces alboniger* and *Streptomyces avellaneus* and 19 isolated from rhizospheric soil in controlling *Cercospora kikuchii* and *Phomopsis* sp. for importance economic disease of soybean seed production. It was found that 3 actinomycetes could not inhibit *C. kikuchii* and *Phomopsis* sp. Whereas, one Isolates, PSL 49, suppressed the growth of *C. kikuchii* and *Phomopsis* sp.. The identification of isolate PSL49 by morphology biochemical test and carbohydrate utilization by API 50 CHB it was *Bacillus subtilis*. This species is tested in the green house by various methods, such as soaking before planting, put in the soil before planting and spray on the soybean leaves. The results showed that the antagonistic spraying process at seedling stage V1 showed 41% infection of *C. kikuchii*, compared with control (51.5% infection), it was suitable to applied to spraying to control the fungus in soybean seed production field.

6. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โรคที่เกิดกับเมล็ดถั่วเหลืองที่สำคัญ ได้แก่โรคเมล็ดสีม่วงเกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* เป็นโรคที่ระบาดทั่วไปกับถั่วเหลือง และการระบาดจะรวดเร็วมากหากอากาศมีอุณหภูมิและมีความชื้นสูงในขณะที่ถั่วเหลืองเจริญเติบโตอยู่ในระยะตั้งแต่ออกดอกจนกระทั่งถึงจุดสุกแก่ทางสรีระ เชื้อราสาเหตุของโรคนี้สามารถทำลายลำต้น ฝัก เมล็ดและใบ และทำให้เกิดอาการบนเมล็ดมีสีชมพู ม่วง ถึงม่วงเข้ม บนผิวเปลือกของเมล็ด ถ้ารอยสีม่วงครอบคลุมเกินครึ่งหนึ่งของพื้นผิวเมล็ด เมล็ดถั่วเหลืองจะเสียความงอก แต่ถ้าพบเพียงส่วนน้อยเมล็ดจะสามารถงอกได้แต่ต้นกล้าจะไม่แข็งแรง และเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อราสาเหตุได้ ต่อไปอาจพบว่าเปลือกเมล็ดมีรอยแตกซึ่งจะทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายได้ง่ายไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ มีการแพร่ระบาดโดยเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดเจริญเข้าไปในกลีบเลี้ยงและสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่ปลิวไปได้ในอากาศระบาดทางน้ำฝนและน้ำชลประทาน เมื่อสปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ดอกจะเจริญเข้าไปอาศัยบนเปลือกหุ้มเมล็ดและทำให้เกิดโรคระบาดได้ต่อไปดังนั้นวิธีการกำจัดโรคโดยการใช้สารเคมีจึงมีประสิทธิภาพต่ำ นอกจากนี้โรคที่สำคัญที่ทำความเสียหายกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง คือ โรคเมล็ดโฟมอบซิส เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis longicolla* Hobbs มีรายงานการเกิดโรคนี้ในประเทศบราซิล แคนาดา จีน อียิปต์ ญี่ปุ่น เกาหลี เซเนกัล โคลัมเบีย และไทย ถั่วเหลืองที่แก่ในขณะที่อากาศบริเวณแหล่งปลูกมีความร้อนและความชื้นสูง

และการเก็บเกี่ยวช้าเกินไป เป็นสาเหตุที่ทำให้โรคนี้เกิดขึ้นอย่างรุนแรงและระบาดมาก เมล็ดถั่วเหลืองที่ติดเชื้อนี้จะมีลักษณะเมล็ดที่ยาวเรียว มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดปกติ มีรอยแตกหรือรอยแยกลึกลงไป และอาจจะพบเส้นใยสีขาวปกคลุมเมล็ด นอกจากนี้ทำให้เมล็ดถั่วเหลืองเน่า อัตราการงอกและคุณภาพเมล็ดลดลง ปัจจุบันการควบคุมโรคส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีทางการเกษตรซึ่งเกษตรกรนิยมใช้กันอย่างมาก เนื่องจากให้ผลในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็วแต่การใช้สารเคมีมากเกิน ความจำเป็นนอกจากจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิตแล้วยังส่งผลต่อสุขภาพของผู้ใช้ และเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุโรคพืชเกิดการกลายพันธุ์อีกด้วย ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวคือ การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี นำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะการใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพ Antimicrobial peptides (AMPs) ซึ่งมีรายงานว่ามีเชื้อที่สามารถผลิตได้ เช่น *Bacillus* spp. และมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเชื้อในอากาศ ในดิน และโรคหลังเก็บเกี่ยว รวมทั้งยังสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้อีกด้วย AMPs มีลักษณะเป็น cyclic lipopeptides เช่น fengycin, iturin, bacillomycin, และ surfactin สารประกอบเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และยังมีกิจกรรมเป็นสารลดแรงตึงผิวได้จึงมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช นอกจากนี้สารประกอบ peptidic อื่นๆ มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น bacilysin, a dipeptide ที่มีรายงานในเชื้อ *B. amyloliquefaciens* FZB42 และ subtilin, a lantibiotic ที่พบในเชื้อ *B. subtilis* จากรายงานในเชื้อ *Bacillus* sp. หลายๆสายพันธุ์ที่นำมาใช้ควบคุมโรคพืชจะเกี่ยวข้องกับ AMP biosynthetic genes bmyB, fenD, ituC, srfAA, และ srfAB การผลิตที่พร้อมกันของ AMPs ต่างๆ เป็นสิ่งสำคัญต่อประสิทธิภาพการควบคุมโรคและความครอบคลุมของกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ Bacillus โดยเฉพาะการผลิตผสมผสานกันของ bacillomycin, fengycin และ iturin A โดยเชื้อ *B. subtilis* ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Podosphaera fusca* สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตง และการผลิต bacilysin, iturin และ mersacidin ของเชื้อ *B. subtilis* ME488 ในการยับยั้งเชื้อ Fusarium สาเหตุโรคเหี่ยวในแตงกวา และ Phytophthora blight ของพริกไทย (Chung *et al*., 2008) มีรายงานว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มียีนที่สังเคราะห์ AMP จะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Pythium ultimum* มากกว่า Bacillus ที่ไม่มียีนสังเคราะห์ AMP เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์จีโนมเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* FZB42 ที่จำหน่ายทางการค้าพบว่ามียีนที่สามารถสังเคราะห์สารประกอบ antimicrobial compounds หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีส *Streptomyces plicatus* ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยทำการแยกเชื้อจากดินจำนวน 372 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซมไคติเนส พบวา *S. plicatus* เปนเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อดังกลาวในอาหารเหลวที่มีสารไคติน ซูโครส และแคลเซียม ซึ่งเปนแหลงคารบอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบวา สามารถยับยั้งการงอกของสปอรการยืดตัวของ germ tube และการเจริญของเสนใยของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Alternaria alternate* และ *Verticillium alboatrum* เช่นเดียวกับรายงานของ Krishnasamy และ Sabaratnam (2002) ไดศึกษาประสิทธิภาพของ *Streptomyces violaceusniger* strain G10 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp.

cubense race 4 จากการทดลองในสภาพหองปฏิบัติการโดยวิธี Dual Method พบการสราง clear zone บริเวณที่เสนใยของเชื้อราที่เจริญแผออกมาระหวางเชื้อทั้งสองชนิดนั้น เมื่อตรวจสอบภายใตกลองจุลทรรศนพบเสนใยของเชื้อราถูกยอยสลายจากนั้นทำการเลี้ยง *S. violaceusniger* strain G10 ในอาหารเหลวรวมกับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 พบวาเสนใยของเชื้อราดังกลาวไมมีการเจริญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. violaceusniger* strain G10 มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองมาใช้ควบคุมโรคที่สำคัญที่ทำให้คุณภาพและผลผลิตเมล็ดพันธุ์ลดลง

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้ปลอดเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ

7.2 วิธีการ

7.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, และ *Phomopsis* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 25 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในเมล็ดถั่วเหลือง ได้แก่ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราขนาดเส้นผ่านศนูย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ก่อน (เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคมีอัตราการเจริญช้า) แล้วทำการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ โดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภมูห้อง นาน 24 - 48 ชั่วโมง มาขีดบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราไว้แล้ว 4 ด้าน ส่วนในกรรมวิธีควบคุมไม่มีการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทำการทดลอง 10 จานเลี้ยง เชื้อ/ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆ ในวุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp.

7.2.2 การจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี

การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรม ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB (bioMerieux, France)

7.2.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 เมล็ด

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หรือเติมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในดินก่อนปลูกในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 โรยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รอบโคนต้นในระยะต้นกล้า V1 ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นเตรียมสารละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

2. ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 3 กระถางต่อกรรมวิธีหยอดเมล็ดกระถางละ 2 เมล็ด หลังจากหยอดเมล็ดและกลบหลุมดีแล้ว หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 และปฏิบัติตามกรรมวิธีทดลองต่างๆ ดูแลรักษาจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

การบันทึกข้อมูล

- เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp.

- องค์ประกอบผลผลิต ประกอบด้วย ความสูง จำนวนกิ่งต่อต้น จำนวนข้อต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น ผลผลิตต่อต้น

เวลาและสถานที่

ปีเริ่มต้น ตุลาคม 2561 – สิ้นสุด กันยายน 2562

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ ได้เชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *streptomyces aminophillus, streptomyces alboniger* และ *streptomyces avellaneus* และเชื้อที่แยกได้ 19 ไอโซเลตต่อการยับยั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. พบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. แต่พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญได้ดี โดย PSL 49 ยับยั้งได้ดีที่สุด (Figure 1) มีเพียง 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. kikuchii* ได้แก่ PSL 18, PSL 24 และ PSL 119

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture ทั้งหมด 19 ไอโซเลท พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 16 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดี โดยมี 5 ไอโซเลท ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 175 และ PSL 423 (Figure 2) แต่อย่างไรก็ตามมี 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้แก่ PSL 18, PSL 24 และ PSL 119 จากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. จะเห็นได้ว่าเชื้อไอโซเลท PSL 49 สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองได้ดี ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท PSL 49 ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2. การจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบชีวเคมี

การจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ PSL 49 พบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีแห้ง เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น และสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ สามารถสร้าง catalase สร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้ง ย่อยเคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับ The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 สามารถจัดอยู่ในสกุล Bacillus และทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และแปรผลการทดลองดวยโปรแกรมสำเร็จรูป APIWEB พบวาไอโซเลต PSL 49 จัดจำแนกเปน *Bacillus subtilis* โดยมีเปอรเซ็นตการจัดจำแนก (% ID) 99.9 เปอรเซ็นต (Figure 3-4)

3. ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้สายพันธุ์ PSL 49 ต่อการควบคุมโรคโดยกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก ใส่หรือเติมเชื้อลงในดินก่อนปลูก โรยเชื้อรอบโคนต้นในระยะต้นกล้า V1 พ่นเชื้อในระยะต้นกล้า V1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว ผลการทดสอบพบว่า ทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด เมล็ดดีเมล็ดเสีย ความงอก และปริมาณเชื้อ *C. kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุด 41% ในขณะที่กรรมวิธีแช่เมล็ดก่อนปลูกและชุดควบคุมพบการติดเชื้อ *C. kikuchii* สูงสุดเท่ากับ 60% และ 52% ตามลำดับ (Table 1) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PSL 49 ซึ่งเป็นเชื้อสกุล Bacillus เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ได้รับความนิยมในอันดับต้นๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีความทนต่ออุณหภูมิ ช่วงกว้างตั้งแต่ -5 ถึง 75 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ใน pH 2-8 ทนความเค็มของเกลือ NaCl ได้ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *B. subtilis* ยังมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ที่สำคัญหลายรูปแบบ เช่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin (Zhao *et al*., 2013; Thasana *et al*., 2010; Gong *et al*., 2014; Cao *et al*., 2012) สารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้นอกจากนั้นยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucans และ chitinase ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus subtilis* บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาพที่ขาด

ธาตุเหล็ก จะสามารถสร้างสาร siderophoreได้ซึ่งสารดังกล่าวจะไปจับกับ ferric iron แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวรับ (receptor) ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งจะรบกวนกระบวนการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่บริเวณเดียวกันทำให้การเกิดโรคของพืชลดลงนอกจากนี้ ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หลายชนิด เป็น PGPR ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ข้าวฟ่าง พริก มะเขือ เทศ และในพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น (กฤติเดช อนันต์และคณะ, 2559; Domenech *et al*., 2006) ดังนั้นเชื้อ PSL 49 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่อาจจะต้องฉีดพ่นหลายครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- ผลการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 18 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญได้ดี โดยไอโซเลท PSL 49 ให้ผลยับยั้งได้ดีที่สุด

- ผลการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 19 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลืองบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 16 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดี โดยมี 5 ไอโซเลท ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 175 และ PSL 423

- สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 ซึ่งยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง และเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสได้ดี

- เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 สามารถจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลทดสอบชีวเคมีและการใช้น้ำตาลด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดี

- กรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่อาจจะต้องฉีดพ่นหลายครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำความรู้ไปถ่ายทอดให้เกษตกรหรือผู้สนใจสามารถนำเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปใช้ฉีดพ่นในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงและโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสได้

11. เอกสารอ้างอิง

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินุวัฒน์ 2559. การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24 (5): 793-812.

Cao, Y., Z. Xu, N. Ling, Y. Yuan, X. Yang, L. Chen, B. Shen and Q. Shen. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. Sci. Hortic. 135: 32-39.

Chung, S. H. Kong, J. S. Buyer, D. K. Lakshman, J. Lydon, S.D. Kim and D. P. Roberts. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:115-123.

Domenech, J., M.S. Reddy, J.W. Kloepper, B. Romos and J. Gutierrez Manero. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil borne diseases in pepper and tomato. Biocontrol. 51: 245-258.

Gong, Q. C. Zhang and F. Lu. 2014. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against Aspergillus flavus. Food Control. 36:8-14.

Krishnasamy G. and V. Sabaratnam. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 303-310.

Thasana, N., B. Prapagdee, N. Rangkadilok, R. Sallabhan, S.L. Aye, S. Ruchirawat and S. Loprasert. 2010. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtulene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid. FEBS Lett. 584: 3209-3214.

Zhao, X. Z. j. Zhou, Y. Han, Z. Wang, J. Fan and H. Xiao. 2013. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiol. Res. 168:598-606.

12. ภาคผนวก

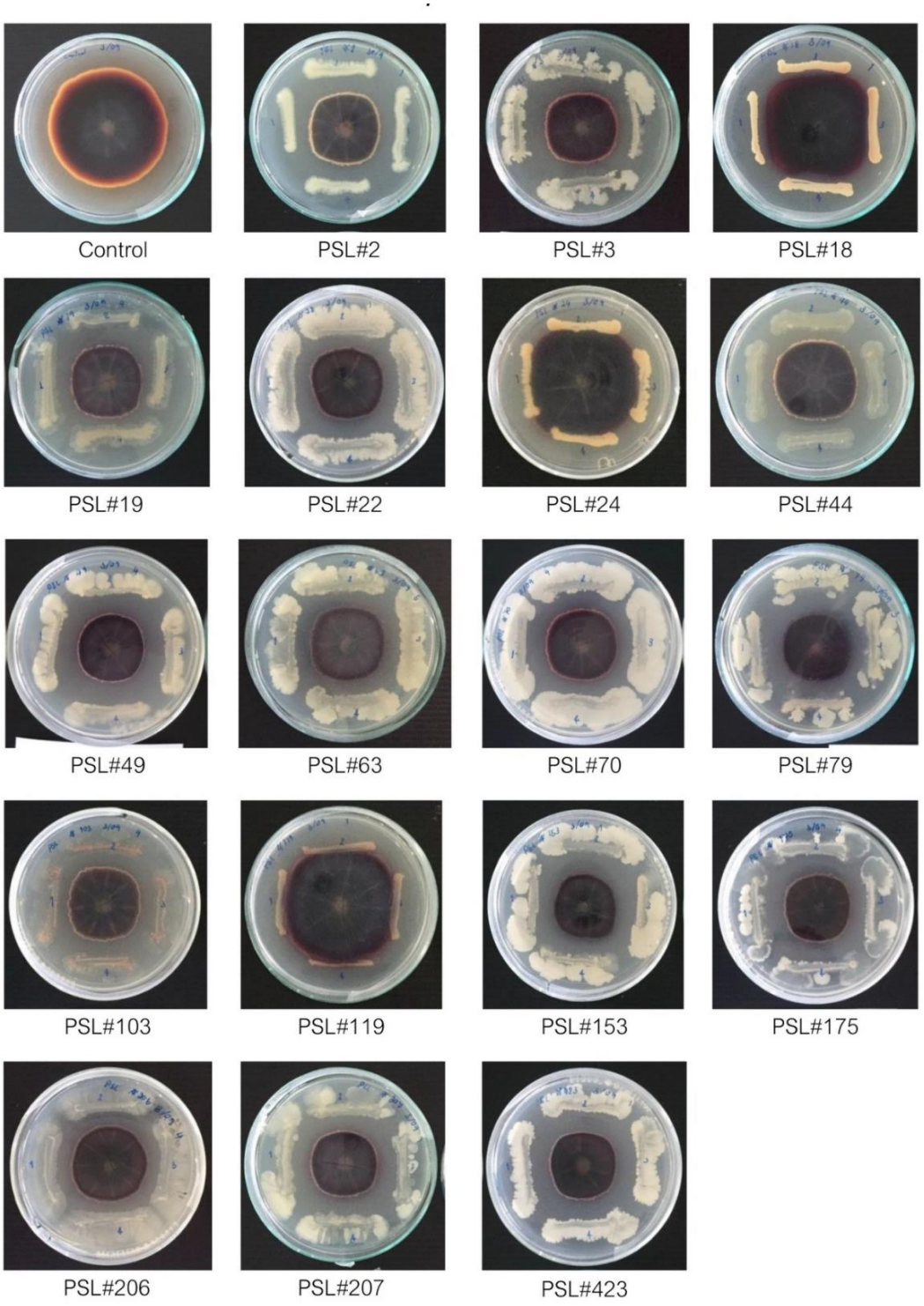
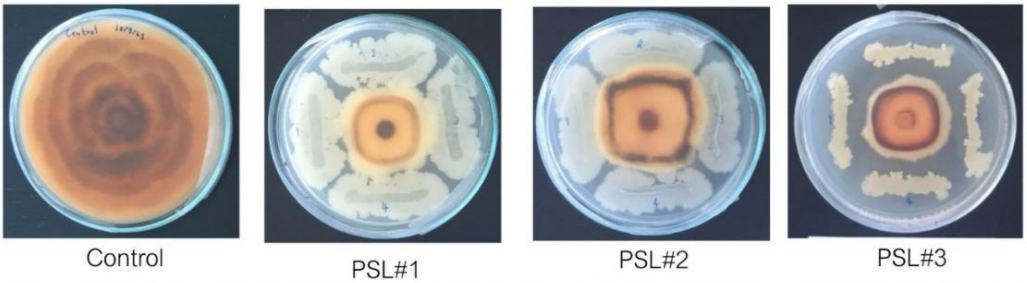
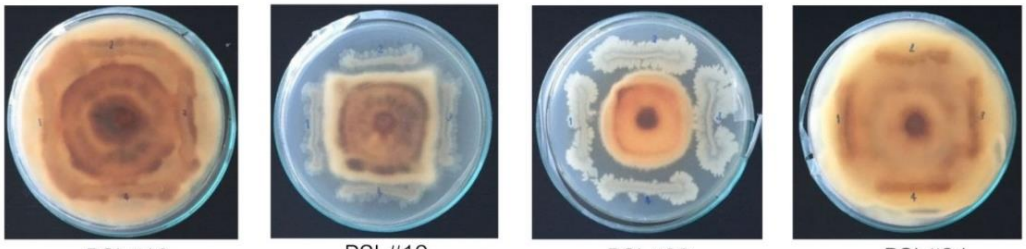
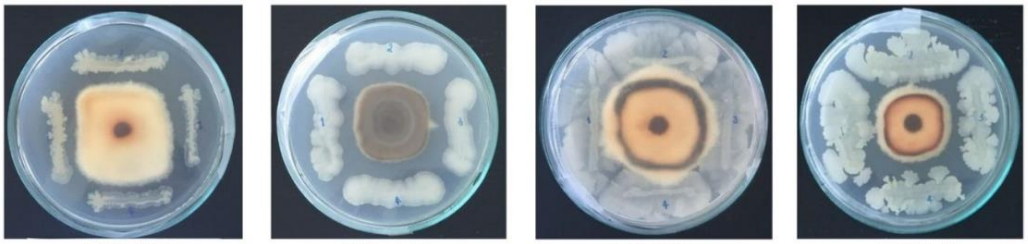
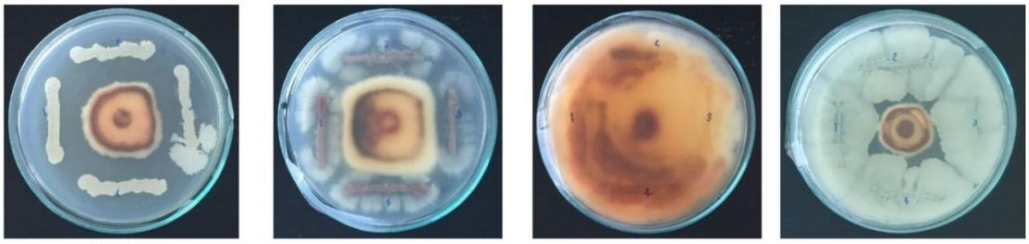


Figure 1 Efficacy of microbial antagonist in Controlling *Cercospora kikuchii* caused purple seed stain in soybean


Control PSL#1 PSL#2 PSL#3


PSL#18 PSL#19 PSL#22 PSL#24


PSL#44 PSL#49 PSL#63 PSL#70


PSL#79 PSL#103 PSL#119 PSL#153

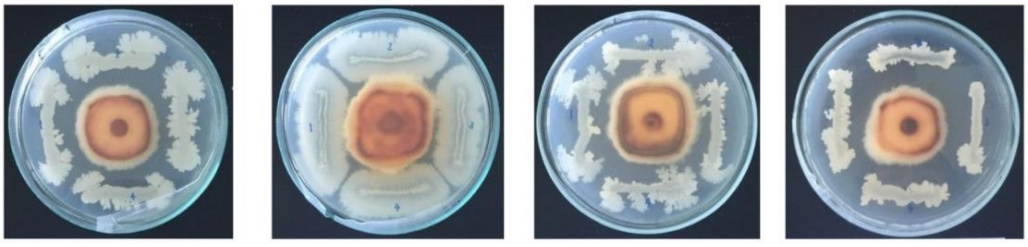

PSL#175 PSL#206 PSL#207 PSL#423

Figure 2 Efficacy of microbial antagonist in Controlling *Phomopsis sp.* caused Phomopsis seed decay in soybean

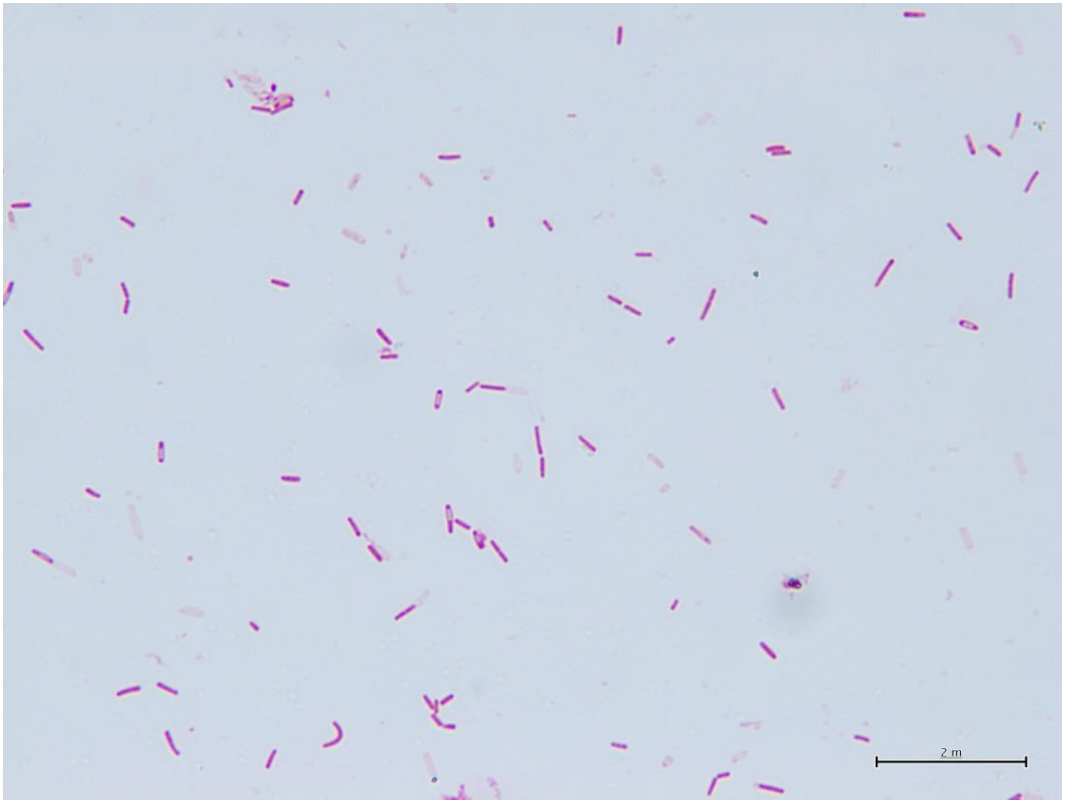
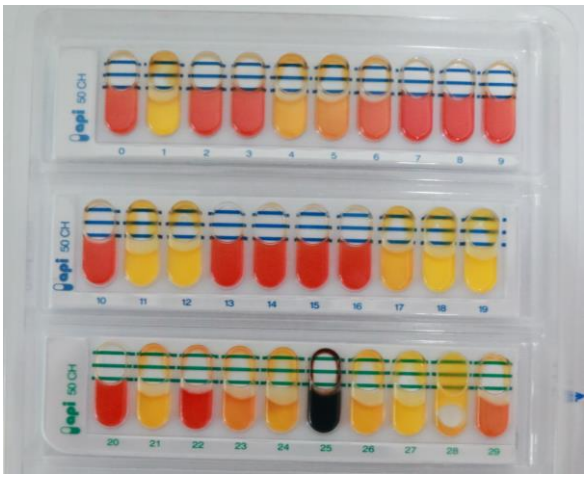
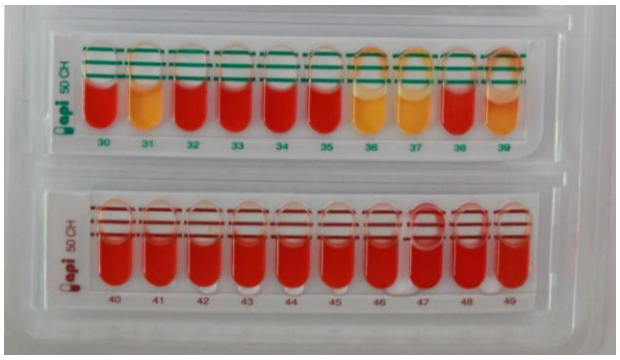


Figure 3 Morphology of isolated PSL 49





VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.1
Profile	-+--+++----++----+++-+--+++++-+----++----------
Note	

Significant taxa	**% ID**	**T**	**Tests against**			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	**99.9**	**0.71**	**MNE 87%**	**LAC 23%**	**TRE 88%**	

Next taxon	**% ID**	**T**	**Tests against**			
Bacillus licheniformis	**0.1**	**0.25**	**GAL 75%**	**MNE 99%**	**AMY 99%**	**TRE 99%**
			TUR 75%	**TAG 91%**		

Figure 4 API 50 CHE test for utilization of carbohydrates under fermentative conditions by isolated PSL 49

Note: Compounds: 0, control; 1, glycerol; 2, erythritol; 3, D-arabinose; 4, L-arabinose; 5, ribose; 6, D-xylose; 7, L-xylose; 8, adonitol; 9, β-methyl-D-xyloside; 10, galactose; 11, glucose; 12, fructose; 13, mannose; 14, sorbose; 15, rhamnose; 16, dulcitol; 17, inositol; 18, mannitol; 19, sorbitol; 20, α-methyl-D-mannoside; 21, α-methyl-D-glucoside; 22, N-acetyl-glucosamine; 23, amygdalin; 24, arbutin; 25, esculin; 26, salicin; 27, cellobiose; 28, maltose; 29, lactose; 30, melibiose; 31, sucrose; 32, trehalose; 33, inulin; 34, melezitose; 35, raffinose; 36, starch; 37, glycogen; 38, xylitol; 39, gentiobiose; 40, D-turanose; 41, D-lyxose; 42, D-tagatose; 43, D-fucose; 44, L-fucose; 45, D-arabitol; 46, L-arabitol; 47, gluconate; 48, 2-keto-gluconate; 49, 5-keto-gluconate

Table 1 Efficacy of microbial antagonist isolate PSL49 at difference application technique for soybean yield and controlling of *Cercospora kikuchii*

Treatment	**Height (cm.)**	**Pod/plant**	**Weight 100 seed (gram)**	**Good seed/plant**	**Bad seed/plant**	**Germination (%)**	***Cercospora kikuchii* Infection (%)**
soaking seed	77.13	65	18.01	94	20	95	59.75
put in soil before planting	75.18	56	18.04	92	20	93	42.00
sprinkle around seedling stage V1	74.74	68	17.84	104	24	94	46.50
spray seedling stage V1	78.94	64	18.92	95	38	91	41.00
spray water (control)	72.82	57	19.70	97	35	90	51.50
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	11.93	26.25	11.68	32.07	59.93	4.34	33.36