Agricultural Sci. J. 53 : 3 (Suppl.) : 32-35 (2022) ว. วิทย. กษ. 53 : 3 (พิเศษ) : 32-35 (2565)

การยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ
Inhibition of Storage Fungi on Peanut Seeds by Potential Antagonistic Bacteria

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต[1] ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน[1] และ กัณฑิมา ทองศรี[1]
Supalak Sattayasamitsathit[1], Papassorn Wattanakulpakin[1] and Kantima Thongsri[1]

Abstract

A total of 19 isolates were isolated from soil samples of Phitsanulok Seed Research and Development Center and all isolated were tested for inhibiting efficacy against storage fungi *Aspergillus flavus* and *A. niger* by dual culture bioassay. It was effective in inhibiting both types of storage fungi, namely, isolates PSL 3, PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 153, PSL 175, PSL 207 and PSL 423. All isolates were identified by morphological characteristics, biochemical tests and molecular showed that PSL 3 isolates were closely related to *Bacillus amyloliquefaciens*, PSL 49 isolates were closely related to *B. subtilis*, isolates. PSL 70 isolates are close to *B. amyloliquefaciens*, PSL 79 isolates are closely related to *B. velezensis*, PSL 153 isolates are closely related to *B. velezensis* PSL 175 isolates are closely related to *B. amyloliquefaciens*, PSL 207 isolates are closely related to *B. velezensis* and PSL 423 isolate is very close to *B. subtilis* and when the 8 isolates were tested for efficacy against *A. flavus* seed-borne to peanut seeds cultivar Kalasin 2, it was found that all 8 isolates of antagonistic bacteria were effectively inhibited between 35-63% of *A. flavus* on peanut seeds. PSL 3 was significantly inhibited ($P<0.05$). Moreover, there was no significant effect on seed germination in all seed treatments with antagonistic bacteria. Therefore 8 isolates are a high potential for further development as a bioproduct for pre-planting peanut seed coating to inhibit mold in storage.

Keywords: storage fungi, peanut, bacteria antagonist

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 19 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บ *Aspergillus flavus* และ *A. niger* ด้วยการทดสอบด้วยวิธี dual culture bioassay พบว่ามี 8 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต PSL 3, PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 153, PSL 175, PSL 207 และ PSL 423 และนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB และข้อมูลทางชีวโมเลกุลพบว่าไอโซเลต PSL 3 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* ไอโซเลต PSL 49 มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ไอโซเลต PSL 70 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลต PSL 79 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* ไอโซเลต PSL 153 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* ไอโซเลต PSL 175 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลต PSL 207 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* และ ไอโซเลต PSL 423 มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* และเมื่อนำเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลตไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงโดยการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* บนเมล็ดพันธุ์ได้ดี มีประสิทธิภาพการยับยั้งระหว่าง 35-63% โดยไอโซเลต PSL 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่ไม่ได้คลุกเชื้อ นอกจากนี้การคลุกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นชีวภัณฑ์สำหรับการคลุกเมล็ดถั่วลิสงก่อนปลูกเพื่อยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บ

คำสำคัญ: เชื้อราในโรงเก็บ ถั่วลิสง แบคทีเรียปฏิปักษ์

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อ. วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
[1] Phitsanulok Seed Research and Development Wanthong district, Phitsanulok 65130

คำนำ

คุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงเป็นสิ่งสำคัญในการเพาะปลูกถั่วลิสงของประเทศไทย ปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์คือเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. flavus* ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเข้าทำลายในช่วงที่เก็บรักษาในโรงเก็บและมีผลกระทบต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ในด้านความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญที่มีผลต่อเมล็ดถั่วลิสงระหว่างการเก็บรักษา (Amaike and Keller, 2011) หากเชื้อเข้าทำลายเมล็ดถั่วสามารถทำให้เมล็ดเน่าและลดความมีชีวิตและความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Kumar *et al*., 2008) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารพิษเมตาบอไลต์ทุทิตยภูมิที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งที่มีความสำคัญที่สุด (Krishnamurthy *et al*., 2008) เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญเติบโต ในเมล็ดถั่วลิสงเมื่อมีสภาพความชื้นที่มากกว่า 15% ในระหว่างการเก็บรักษา โดยเชื้อราใช้ประโยชน์จากธาตุคาร์บอนในรูปของน้ำตาล ไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนรวมไปถึงกรดไขมัน (ชัยณรงค์และคณะ, 2563) ปัจจุบันการควบคุมโรคส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีทางการเกษตรซึ่งเกษตรกรนิยมใช้กันอย่างมาก เนื่องจากให้ผลในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็วแต่การใช้สารเคมีมากเกินความจำเป็นนอกจากจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิตแล้วยังส่งผลต่อสุขภาพของผู้ใช้ และเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุโรคพืชเกิดการกลายพันธุ์อีกด้วย ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวคือ การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี นำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยจะมีบริเวณใสๆ (inhibition zone) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

2. การจำแนกเชื้อโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในเบื้องต้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB (bioMerieux, France) และเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3') ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S ribosomal DNA และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการศึกษาและเป็นฐานข้อมูลสาธารณะของ GenBank

3. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงด้วยวิธีการคลุกเมล็ด

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ 8 ไอโซเลต ในอาหารเหลว NB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสารละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ด้วยสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อถั่วลิสง 1 กิโลกรัม จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ไปผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ไปตรวจสอบการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar plate และตรวจสอบคุณภาพ ได้แก่ ความงอก และความแข็งแรง (ISTA, 2021)

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินจำนวน 19 ไอโซเลตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture พบว่ามี 8 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต PSL 3, PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 153, PSL 175, PSL 207 และ PSL 423 ซึ่งจะมีลักษณะที่เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทดสอบทั้ง 4 ด้าน (Figure 1) จึงทำการคัดเลือก

เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลตไปจำแนกชนิดและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงด้วยวิธีการคลุกเมล็ดต่อไป

2. การจำแนกเชื้อโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการนำเชื้อที่คัดเลือกได้ 8 ไอโซเลตไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB และข้อมูลทางชีวโมเลกุลพบว่าไอโซเลต PSL 3 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens*, ไอโซเลต PSL 49 มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis*, ไอโซเลต PSL 70 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens*, ไอโซเลต PSL 79 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis*, ไอโซเลต PSL 153 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis*, ไอโซเลต PSL 175 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens*, ไอโซเลต PSL 207 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* และ ไอโซเลต PSL 423 มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis*

3. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงด้วยวิธีการคลุกเมล็ด

จากการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ด้วยวิธีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อปฏิปักษ์จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PSL 3, PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 153, PSL 175, PSL 207 และ PSL 423 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการคลุกเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดพันธุ์ได้ดี มีประสิทธิภาพการยับยั้งระหว่าง 35-63% โดยไอโซเลต PSL 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่ไม่ได้คลุกเชื้อ นอกจากนี้การคลุกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่มีผลต่อความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ โดยเมล็ดพันธุ์มีความงอกระหว่าง 35-45 เปอร์เซ็นต์ และความแข็งแรงระหว่าง 21-29 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่นำมาทดลองเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุการเก็บรักษามากกว่า 1 ปี มีความงอกและความแข็งแรงต่ำแต่มีเชื้อราในโรงเก็บในปริมาณสูง จึงนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บในสภาพจริง

วิจารณ์ผล

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* พบว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *Bacillus* 3 ชนิดคือ B. subtilis *B. amyloliquefaciens* และ *B. velezensis* ซึ่งกลไกในของเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *A. niger* และ *A. flavus* นั้น คือการสร้างสารปฏิชีวนะที่เป็นกลุ่มสาร lipopeptides แต่อาจจะเป็นคนละชนิดกันจึงทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งมีความแตกต่างกัน มีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* จะเป็นชนิด iturins และ fengycins ขณะที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* จะผลิตสาร difficidin และ bacilysin ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้หลายชนิด (Wu et al., 2015) นอกจากนี้ *B. velezensis* มีรายงานผลิต cyclic lipopeptides หลายชนิด เช่น surfactin, bacillomycin-D, fengycin, และ bacillibactin รวมทั้งสารกลุ่ม polyketides เช่น macrolactin, bacillaene และ difficidin ซึ่งสารเมตาบอไลต์ทุทิตยภูมิที่ผลิตได้เหล่านี้สามารถกระตุ้นการต้านทานโรคในพืชได้ด้วย (trigger induced systemic)

สรุป

เชื้อที่แยกได้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในโรงเก็บทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต PSL 3, PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 153, PSL 175, PSL 207 และ PSL 423 และจากการจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB และข้อมูลทางชีวโมเลกุลสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิดคือ *B. subtilis* ได้แก่ ไอโซเลต PSL49 และ PSL423, *B. amyloliquefaciens* ได้แก่ ไอโซเลต PSL70 และ PSL175 และ *B. velezensis* ได้แก่ ไอโซเลต PSL3, PSL79, PSL153 และ PSL207 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดพันธุ์ได้ดี มีประสิทธิภาพการยับยั้งระหว่าง 35-63% โดยไอโซเลต PSL 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่ไม่ได้คลุกเชื้อ นอกจากนี้การคลุกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่มีผลต่อความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากลุ, สรรเสริญ รังสุวรรณ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และพิสุทธิ์ เขียวมณี. 2563. ความแตกต่างของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Aspergillus flavus* กลุ่มที่สร้างและไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน. แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 4: 693-702.

Amaike, S. and N.P. Keller. 2011. *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol. 49: 107-133.

Kumar, V., M.S. Basu and T.P. Rajendran. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Prot. 27: 891-905.

Krishnamurthy, Y. L., J. Shashikala and B.S. Naik. 2008. Antifungal potential of some natural products against *Aspergillus flavus* in soybean seeds during storage. J. Stored Prod. Res. 44: 305-309.

ISTA. 2021. International Rules for Seed Testing, Edition 2021. International Seed Testing Association, Bassersdorf

Wu, L., H.J. Wu, J. Qiao, X. Gao and R. Borriss. 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. Front. Microbiol. 6: 1-13.

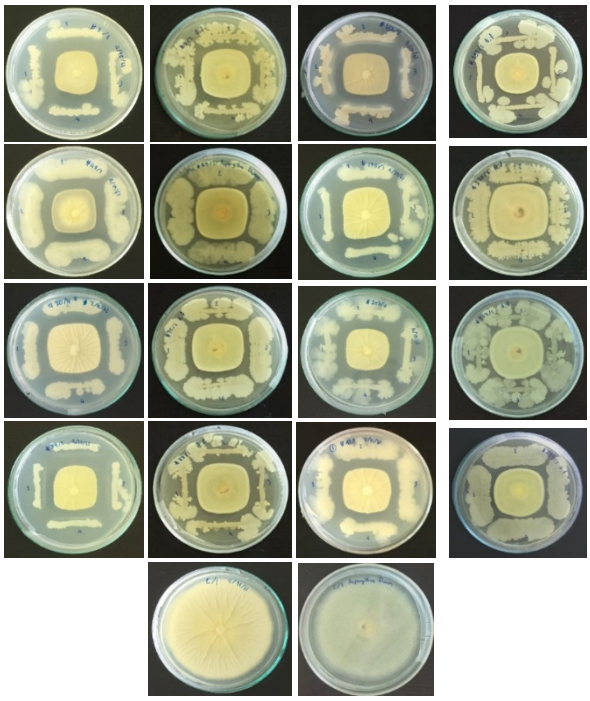

Figure 1 Inhibitory effects of antagonistic bacteria on the inhibition of fungal growth of *A. niger* and *A. flavus* in comparison with the non-treated control. Mycelial growth of fungal pathogens on potatoes dextrose agar plates was recorded 14 days after incubation at 25°C.