การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*

Selection and Efficacy Test of High Potential Bacillus for controlling *Phytophthora parasitica*

บุษราคัม อุดมศักดิ์ สุรีย์พร บัวอาจ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ที่แยกได้จากดินปลูก วัสดุปลูก ปุ๋ยคอก และเศษซากพืชจำนวน 85 ไอโซเลท ในการควบคุมเชื้อรา *P. parasitica* โดยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการและในโรงเรือน ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า มี Bacillus 15 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* ได้ โดยพบว่า 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.355 1.205 1.100 1.080 0.870 0.460 ซ.ม. ตามลำดับ จากนั้นนำทั้ง 6 ไอโซเลท ไปการทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำบนต้นหน้าวัว ในโรงเรือน พบว่า ไอโซเลท 17G15 GM011 และ 22W11 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำได้สูงสุด โดยสามารถลดอาการแผลเน่าบนใบหน้าวัวได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-04-54

คำนำ

Phytophthora parasitica Dastur เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญ มีพืชอาศัยมากกว่า 200 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจได้ถึง 30 ชนิด เช่น โรคยอดเน่า (heart rot) รากเน่า (root rot) สับประรด โรครากเน่า (root rot) ใบไหม้ (leaf blight) ของส้มจุก ส้มจีน โรคใบร่วงยางพารา โรคโคนเน่ามะนาว โรคใบไหม้สะระแหน่ โรคเน่าดำกล้วยไม้ (พัฒนา และคณะ, 2537) และโรคเน่าดำ หรือใบแห้งของหน้าวัว การเข้าทำลายรวดเร็วและรุนแรง โดยลักษณะอาการที่พบเสมอ ได้แก่ อาการรากและโคนเน่า โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดนอกฤดูในดินและในเศษซากพืชในลักษณะสปอร์ผนังหนาเป็นจำนวนมาก อาจอยู่ในดินได้นาน 4-6 ปี (อมรรัตน์,2552) การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคนี้จึงมักจะได้ผลในระยะแรก เนื่องจากเชื้อสามารถปรับตัวและเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการศึกษาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราชนิดนี้จึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถมาควบคุมโรคนี้ได้อย่างยั่งยืนได้ในอนาคต ซึ่งในปัจจุบันก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีและสามารถพัฒนาเป็นการค้าได้หลายชนิด เช่น ในประเทศออสเตรเลียได้พัฒนาใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในทางการค้าสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium radiobecter* K84 ที่เป็นพวกซาโปรไฟท์ไปควบคุมโรคปุ่มปมของพืชที่เกิดจากเชื้อ *A. tumefaciens* แบคทีเรียแบคทีเรียกลุ่ม pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่ติดไปกับดิน ซึ่งเป็นเชื้อโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชอย่างมาก หรือแบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับ pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสงในพืชหลายชนิด ทั้งสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงทดลอง (นิพนธ์, 2538)

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชและสามารถพัฒนาจนได้เป็นสารชีวินทรีย์หลายชนิด ที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบได้กับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการผลิตผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 ใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา และแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Alternaria* spp. *Phytophthora palmivora* *F usarium* spp *Rhizoctonia* sp. *Cercospora* spp. *Acrocylindrium oryzae* *Erwinia* spp. *Pyricularia oryzae* *Colletotrichum* spp.*Ralstonia solanacearum และ Xanthomonas campestris* (www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/.../plant_00.html -) นอกจากนี้มีชีวินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเป็นการค้าแล้ว เช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ใช้ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวหรือโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด

หน้าวัว (Anthurium, *Anthurium andraeanum*) เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่กำลังเป็นที่นิยม มีบทบาทมากขึ้นในตลาดโลก เนื่องจากเป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานทนทาน ดอกมีสีสดสวยงามและออกดอกได้ทั้งปี วิธีการปลูกของเกษตรกร มี 3 วิธีด้วยกัน คือการปลูกลงแปลง กรปลูกในกระถางและการปลูกบนชั้น ซึ่งปัจจุบันการผลิตหน้าวัวตัดดอกส่วนใหญ่มักจะปลูกลงแปลง มากกว่าปลูกในกระถาง เนื่องจากจะได้จำนวนต้นต่อไร่มาก การลงทุนต่ำ การจัดการง่าย แต่การปลูกลงแปลงก็มีข้อเสียหลายประการเช่น การเตรียมแปลงปลูกต้องถูกต้อง มีการระบายน้ำที่ดี ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ การระบาดของโรคเป็นไปได้รวดเร็ว(http://www.jenny-flower.com/modules/articles/article.php?id=6)

ซึ่งโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคเน่าดำ หรือใบแห้ง (black rot, leaft blight) สาเหตุจากเชื้อรา *P. parasitica* โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และโรคใบไหม้ (bacterial leaf blight) เป็นต้น (ปิยรัตน์ และสุรภี,2548)

โรคเน่าดำหรือใบแห้ง (black rot หรือ leaft blight) หน้าวัว สาเหตุจากเชื้อรา *P. parasitica* เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งทางใบ และโคนต้น อาการเริ่มแรกที่ใบเกิดเป็นแผลฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลขยายเป็นวงกลม ถ้าสภาพชื้นสูง แผลจะลุกลามขยายใหญ่ ถ้าเชื้อเข้าทำลายที่โคนต้นและราก หน้าวัวจะแสดงอาการโคนต้นช้ำเป็นสีน้ำตาลรากเน่าดำ เมื่อดึงใบเบา ๆ ก้านใบจะหลุดออกจากต้นได้ง่าย (ปิยรัตน์ และสุรภี, 2548)

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่แยกได้จากดินปลูก ปุ๋ยคอกและวัสดุปลูกต่างๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัว เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ในอนาคต เพื่อเกษตรจะได้นำไปใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dectrose agar) , PSA (Potato sucrose agar)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 85 ไอโซเลท
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบและตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
4. ดินปลูก
5. กระถางปลูก
6. พันธุ์หน้าวัว

วิธีการ

1. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว ในห้องปฏิบัติการ</u>

นำแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่แยกได้และที่เก็บไว้ที่หน่วยรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ เช่น โรคเน่าดำในหน้าวัว โดยวิธี dual plate method โดยใช้เข็มเขี่ยแตะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ทดสอบและเชื้อราสาเหตุโรคพืช ขีดเป็นเส้นตรงขนานกัน บนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ยาวประมาณ 1 ซม. โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 ซม. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) โดยใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรีย*Bacillus* ที่ทดสอบ ตรวจผลโดยวัด inhibition zone เมื่อกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีเชื้อรา *P. parasitica* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2. <u>การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพเรือนทดลอง</u>

- โดยวิธี detached leaf บนต้นหน้าวัว

ปฏิบัติดังนี้

1. การเตรียมเชื้อรา

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหาร PDA ให้มีอายุ 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 ใช้ cock borrer ขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม เจาะเส้นใยเชื้อบนอาหารวุ้น เพื่อเตรียมไว้วางบนใบหน้าวัว

2. การเตรียมแบคทีเรีย Bacillus

2.1 เลี้ยงแบคทีเรีย bacillus 6 ไอโซเลท ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 บนอาหาร PSA ให้มีอายุ 48 ช.ม.

2.2 ทำเป็น cell suspension โดยใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ประมาณ 30 ซี.ซี ต่อจานอาหาร ขุดเอาส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบริเวณผิวหน้าอาหาร

2.3 คนให้เข้ากัน ปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ม.ล.

3. การทดสอบ

3.1 พ่น cell suspension ของ bacillus ทั้ง 6 ไอโซเลท ลงต้นของหน้าวัวให้ชุ่มทั้งใบและต้น ทิ้งไว้ 24 ช.ม.

3.2 นำชิ้นวุ้นเส้นใยที่เจาะเตรียมไว้ (ข้อ 1.2) วางบนใบหน้าวัว ที่ทำแผลไว้ โดยคว่ำส่วนของเส้นใยลง 4 ใบต่อต้น 30 ต้นต่อไอโซเลท (ภาพที่ 1)

3.3 มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี คือ C+ (วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. parasitica* บนใบหน้าวัวที่ไม่มีการพ่น Bacillus) และ C- (วางชิ้นอาหารวุ้น PSA บนใบหน้าวัวที่พ่นด้วย Bacillus)

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 แสดงการปลูกเชื้อบนใบหน้าวัวโดยวิธี detached leaf

(ก) การวางเชื้อ *Phytophthora parasitica*

(ข) ลักษณะอาการที่ปรากฏ หลังปลูกเชื้อ 3 วัน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว ของแบคทีเรีย Bacillus 85 ไอโซเลทบนอาหาร PDA พบว่า มี Bacillus 15 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 0.040 – 1.355 ซ.ม. โดยพบว่า 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.355 1.205 1.100 1.080 0.870 0.460 ซ.ม. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. <u>การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพเรือนทดลอง</u>

ผลการทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัว ในโรงเรือน ของ Bacillus 6 ไอโซเลท ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 พบว่า หลังการทดสอบ 3 5 และ 7 วัน มี Bacillus 3 ไอโซเลท ได้แก่ 17G15 GM011 และ 22W11 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำได้ดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (C+) โดยที่ 3 วันหลังการทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดอาการแผลเน่าบนใบหน้าวัวได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย Bacillus (C+) โดยมีพื้นที่แผลเท่ากับ 0.894 0.926 0.928 ตร.ซม.ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธี C+ มีพื้นที่แผลบนใบหน้าวัวเท่ากับ 1.045 ตร.ซม. (ตารางที่ 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus จำนวน 85 ไอโซเลท พบว่า มี 15 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำของหน้าวัว และ มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ 17G15 GM011 และ 22W11 ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของหน้าวัวในระดับโรงเรือน โดยสามารถลดอาการแผลเน่าบนใบหน้าวัวได้ประมาณ 15 % เมื่อเปรียบเทียบกับใบหน้าวัวที่ไม่มีการพ่นด้วย Bacillus เพื่อป้องกันการเกิดโรค

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และสุรภี กีรติยะอังกูร. 2548. หน้าวัว. หน้า 62 – 73. *ใน* เอกสารวิชาการโรคไม้ดอก สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คีประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, 285 หน้า

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. *ใน* เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช . 74 หน้า

สืบค้นจาก (www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/.../plant_00.html -) เมื่อวันที่ 25 สิงหาคม 2552

สืบค้นจาก (http://www.jenny-flower.com/modules/articles/article.php?id=6) เมื่อวันที่ 26 สิงหาคม 2552

ตารางที่ 1 แบคทีเรีย *Bacillus* sp. 16 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรคเน่าหน้าวัว ในห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone (เซนติเมตร)
GM011	1.355
17G5	1.205
20W14	1.100
19W13	1.080
22W11	0.870
17G15	0.460
22W10	0.425
20W33	0.260
22W12	0.175
7W14	0.130
22W8	0.115
16W3	0.090
KA28	0.065
2G7	0.060
22W43	0.040

ตารางที่ 2 พื้นที่แผลโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* บนหน้าวัว ที่ถูกยับยั้งโดย *Bacillus* sp. 6 ไอโซเลท ที่ 3 5 และ 7 วันหลังการทดสอบ

ไอโซเลท	พื้นที่แผล (ตารางเซนติเมตร)		
	3 DAI[1/]	5DAI[1/]	7DAI
C-	0.000	0.000	0.000
17G15	0.894	1.085	1.473
GM011	0.926	1.111	1.135
22W11	0.928	1.203	1.170
C+	1.045	1.205	1.560
17G5	1.135	1.376	2.081
19W13	1.199	1.412	1.605
20W14	1.387	1.674	1.940

[1/] DAI : Day after Inoculated