การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.

Screening of Potential *Pasteuria penetrans* Isolates for Controlling Root-knot Nematodes *Meloidogyne* spp.

ไตรเดช ข่ายทอง[1/] ธิติยา สารพัฒน์[1/]

มนตรี เอี่ยมวิมังสา[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่ง และมันขี้หนูที่มีอาการหูดที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมมาแยกตัวเต็มวัยเพศเมียเพื่อตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* จากการตรวจตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ที่แยกจากหัวมันฝรั่งจำนวน 300 ตัวอย่าง พบสปอร์ของ *P. penetrans* จำนวน 6 ตัวอย่าง นำไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์เกาะ ใส่ลงในต้นมะเขือเทศเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. สาเหตุโรครากปม ทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด และแพร่ระบาดอยู่ในหลายพื้นที่ในประเทศไทย โดยชนิดที่สำคัญคือ *M. incognita* และ *M. javanica* ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยรากปมระบาดในพื้นที่ปลูกพืชหลายชนิด เช่น พริก, มันฝรั่ง ปทุมมา และฝรั่ง เป็นต้น วิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือการใช้สารเคมี ซึ่งก็ยังไม่ได้ผลดีพอและมีราคาแพง สารเคมีหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพกำลังถูกห้ามใช้ เนื่องจากมีอันตรายต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อม ซึ่งสารเคมีเหล่านี้จะค่อยๆ ถูกดึงออกจากตลาด และอาจทำให้ขาดแคลนสารเคมีป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในอนาคต การใช้ศัตรูธรรมชาติในการควบคุมประชากรของไส้เดือนฝอยรากปมในดินแบบชีววิธี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการควบคุมไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ เชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* เป็นหนึ่งในศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Gowen *et al.*, 2008)

แบคทีเรียศัตรูธรรมชาติของไส้เดือนฝอยมีกลไกการทำลายไส้เดือนฝอยแตกต่างกันไป เช่น การเป็นปรสิต การสร้างสารพิษ สารปฏิชีวนะ หรือเอ็นไซม์ การแก่งแย่งธาตุอาหาร หรือโดยทางอ้อม

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-07-54

เช่น การชักนำให้พืชสร้างกลไกการป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย นอกจากยับยั้งการเข้าทำลายพืชของไส้เดือนฝอยแล้ว แบคทีเรียบางชนิด อาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Tian *et al*., 2007) *Pasturia* spp. เป็นแบคทีเรียที่เป็นปรสิตที่สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก และเป็นปรสิตชนิดที่ต้องการเหยื่อในการครบวงชีวิต (obligate parasite) ปัจจุบันมีการจัดจำแนก *Pasteuria* spp. ออกเป็น 6 สปีชีส์ คือ *P. ramosa* เป็นปรสิตของ water flea (*Daphnia magna*) *P. thornei* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus penetrans P. nishizawae* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Heterodera* และ *Globodera* spp. *P. usage* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Belonolaimus longicaudatus P. hartismeri* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. ardensis* สำหรับ *P. penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al*., 2008) ซึ่งไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ทำความเสียหายต่อผลผลิตของพืชกว่า 2000 ชนิด

Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอย โดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช และเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของแบคทีเรียจะสร้าง germ tube แทงผ่านผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย และพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium อยู่ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน ซึ่งสปอร์ของ *P. penetrans* ที่เจริญอยู่ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ สำหรับตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999)

Pasteuria spp. มีศักยภาพในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก ยาสูบ กระเจี๊ยบ องุ่น และข้าวสาลี เป็นต้น (Chen and Dickson, 1998) เอ็นโดสปอร์ของ *P. penetrans* สายพันธุ์ P20 จำนวน 10,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม สามารถควบคุมไส้เดือนฝอย *M. arenaria* race1 ในถั่วลิสงได้ (Chen *et al*., 1996) สปอร์ของ *P. penetrans* ที่มีจำนวนน้อย สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ (Chen *et al*., 1996; Oostendrop *et al*., 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al*., 2005)

ในประเทศไทยยังไม่มีการรวบรวมแบคทีเรียชนิดนี้ และยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียชนิดนี้ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของแบคทีเรียชนิด

นี้ ที่เป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยในการครบวงชีวิต ทำให้การผลิตแบคทีเรียชนิดนี้ในปริมาณมากทำได้ยากและมีต้นทุนสูง จึงไม่เป็นที่สนใจของนักวิจัย อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในห้องปฏิบัติการ ในต้นทุนที่สามารถแข่งขันกับสารเคมีได้ (Hewlet *et al.*, 2002) และได้มีการทดสอบ *P. penetrans* ที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในแปลงทดลองแล้ว (Hewlet *et al.*, 2006) ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ได้รับความสนใจอีกครั้ง ดังนั้นการเก็บรวบรวมและศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศไทยจึงมีความจำเป็น และอาจมีประโยชน์ในการใช้ควบคุมโรครากปมของพืชได้ ปัจจุบันในต่างประเทศมีการผลิตแบคทีเรียชนิดนี้ในเชิงการค้า และในอนาคตอาจมีการนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย จึงควรมีการรวบรวม *Pasteuria* ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย ก่อนที่จะมีการนำ *Pasteuria* จากต่างประเทศเข้ามาใช้ ซึ่งจะทำให้การค้นหาแบคทีเรียที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทยทำได้ยากขึ้น *Pasteuria* สายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย อาจมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและโดยธรรมชาติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทยอยู่แล้ว ซึ่ง *P. penetrans* เป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ host สูง ดังนั้น *P. penetrans* สายพันธุ์ไทยอาจใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยของไทยได้ดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินงานในปี 2554 เน้นการแยกเชื้อ *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรคหูดเป็นหลัก ซึ่งจากการศึกษาในเบื้องต้น พบว่าสามารถแยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมออกจากหัวมันฝรั่งได้ง่าย จากนั้นจึงแยกสปอร์ของ *P. penetrans* จากตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้ โดยในปี 2554 มีเป้าหมายในการแยก *P. penetrans* จากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม อย่างน้อย 500 ตัวอย่าง (1 ตัวอย่าง คือ ตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม 100 ตัว ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร)

<u>การแยก *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่ง</u>

การแยก *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่ง ทำโดยการแยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ออกจากหัวมันฝรั่ง โดยการฝานหัวมันฝรั่งที่เป็นโรค เป็นชิ้นบางๆ และปั่นในเครื่องปั่น แยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย โดยการกรองผ่านตะแกรง และปั่นเหวี่ยงในสารละลายน้ำตาล (Centrifugal flotation) นำตัวเต็มวัยเพศเมียใส่ลงในหลอด microcentrifuge ประมาณ 100 ตัว/หลอด บดไส้เดือนฝอยในหลอด microcentrifuge ด้วย Plastic pestle แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1500g นำ supernatant ไปตรวจหา *P. penetrans* โดยตรง หรือใช้ตัวอ่อนระยะที่สอง

ของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อ และตรวจหาไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* ติดที่ผนังลำตัว

ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม เตรียมได้จากการเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมในรากมะเขือเทศ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 60 วัน แยกไข่ไส้เดือนฝอยจากราก โดยการตัดรากปมเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเขย่าใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอร็อก 10%) เก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งฟักออกมาจากไข่และอยู่ในน้ำในจานเลี้ยงเชื้อไปใช้ ทุกๆ 24-48 ชั่วโมง

<u>การเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *P. penetrans*</u>

P. penetrans สามารถขยายพันธุ์ได้ในตัวของไส้เดือนฝอย การเพิ่มจำนวนของ *P. penetrans* ทำได้โดยการนำตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยที่มี สปอร์ของ *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัว ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ จากนั้นแยกตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 60 วัน คัดเลือกตัวเต็มวัยที่มีลักษณะสีขาวขุ่น ที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* อยู่ภายใน เก็บในหลอด microcentrifuge เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2554 ได้เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่ง และมันขี้หนูที่มีอาการหูดที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม มาแยกตัวเต็มวัยเพศเมียเพื่อตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* การตรวจหาสปอร์โดยตรงในตัวอย่างทำได้ยาก เนื่องจากสปอร์มีขนาดเล็ก และ supernatant ที่ได้จากการบดตัวเต็มวัยเพศเมียมีความขุ่น จึงต้องตรวจตัวอย่างโดยการใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม เป็นเหยื่อล่อให้สปอร์เกาะ จากนั้นจึงตรวจหาตัวอ่อนที่มีสปอร์เกาะ จากการตรวจตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ที่แยกจากหัวมันฝรั่งจำนวน 300 ตัวอย่าง พบสปอร์ของ *P. penetrans* จำนวน 6 ตัวอย่าง นำไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์เกาะ ใส่ลงในต้นมะเขือเทศอายุ 1 เดือน เพื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยเป็นระยะเวลา 60 วัน เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถตรวจพบ *P. penetrans* จากตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมีย ที่แยกจากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรคหูดได้ ซึ่งงานขั้นต่อไปจะเป็นการเพิ่มปริมาณสปอร์ เพื่อใช้ในการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ *P. penetrans* ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

เอกสารอ้างอิง

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of spores of *Pasteuria penetrans* on the motility of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5–6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The effect of different initial densities of nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans* population. Journal of Zhejiang University SCIENCE 6B(2):113-118.

Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.

Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology,Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.

El-Sherif, A.G.,A. R. Refaei, M.E. El-Nagar and H.M.M Salem. 2007. Integrated Management of *Meloidogyne incognita* Infecting Eggplant by Certain Organic Amendments, *Bacillus thuringiensis* and Oxamyl with Reference to NPK. Plant Pathology Journal 6:147-152.

Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential use of *Pasteuria* spp. in the management of plant parasitic nematodes. Pp. 205-219 *in* Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes.Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Natherlands.

Hewlett, T. E., J. F. Gerber, K. S. Smith, and J.H. White. 2002. *In Vitro* Culture of *Pasteuria penetrans*. Nematology 4:152-153.

Hewlett, T.E., S.T. Griswold, and K.S. Smith. 2006. Biological control of *Meloidogyne incognita* using in-vitro produced *Pasteuria penetrans* in a microplot study. Journal of Nematology 38:274 (Abstract).

Jonathan,E. I., K. R. Barker, F. F. Abdel-Alim, T. C. Vrain, and D. W. Dickson. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. Nematropica 30:231-240.

KHYAMI-HORANI, H.,and L. AL-BANNA. 2006. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* jordanica against *Meloidogyne javanica* infecting tomato.Phytopathologia Mediterranea 45:153–157.

Oostendrop, M., D.W. Dickson, and D.J. Mitchell. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 23:58-64.

Sano, Z. and J.T. Gaspard. 1995. Differences in mortality and reproduction of *Meloidogyne incognita* infected with varied amounts of *Pasteuria penetrans*. Japanese Journal of Nematology 25:129.

Tian B.Y., J. Yang and K.Q. Zhang. 2007. Bacterial used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiol Ecol 61:197-213.