ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

Biology of the Bacteria Causal Agent of Leaf Spot Disease on Mokara Orchid

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครึ่ง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2560 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 5 ppm และมีความต้านทานต่อทองแดงความเข้มข้น 9,000 ppm การทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ พบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวายและแคทลียา การทดสอบในพืชต่างชนิดที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุ พบว่า หอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบแรนดัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อเชื้อสาเหตุ พบว่าข้าวโพดแสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาว (necrotic lesions)

คำหลัก : กล้วยไม้ โรคใบจุด ชีววิทยา

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-03-60

คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ใบร่วง กลีบดอกไหม้ ช่อดอกหักพับ และดอกร่วงไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้

จากการศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับการสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น Facultative anaerobic ลักษณะโคโลนีกลมสีเหลือง ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าหรือในกล้วยไม้อื่นๆ ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์, 2552) ดังนั้น เพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคนี้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยาอื่นๆ มากขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้วยไม้สกุลต่างๆ และพืชอาศัยที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุ
2. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
3. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
4. หม้อนึ่งความดันไอ
5. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
7. ตู้อบ
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato

semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ดังนี้

2.1 กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์ต่างๆ เช่น บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ

2.2 กล้วยไม้สกุลอื่น เช่น แวนด้า หวาย ช้าง แคทลียา

2.3 พืชต่างชนิดที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุ เช่น ข้าวโพด หอม

โดยใช้เข็มทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร หรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารทุกวันจนถึง 28 วัน

4. ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและทองแดง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร mannitol-glutamate (MG) ที่มี 0.025% yeast extract (MGY) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MGY ที่มี cupric sulfate (MGYCu) ความเข้มข้น 375, 500, 750, และ 1,000 µg/ml และอาหาร streptomycin (MGYSm) 50, 75, 100 และ 500 µg/ml เปรียบเทียบกับเลี้ยงบนอาหาร MGY บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร หากมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความต้านทาน

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 อง1494 ศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 10 ไอโซเลท

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

ทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวายและแคทลียา การทดสอบในพืชต่างชนิดที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุ พบว่าหอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอาการคล้ายคลึงกับรายงานของ Carr *et al.* (2013) การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบแรนดัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อสาเหตุ พบว่าข้าวโพดแสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับรายงานของ Krawczyk *et al.* (2010) ซึ่งรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาว (necrotic lesions)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4. ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและทองแดง

ทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและทองแดงของเชื้อสาเหตุ พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 5 ppm และมีความต้านทานต่อทองแดงความเข้มข้น 9,000 ppm

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและทองแดงของเชื้อสาเหตุ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 5 ppm และมีความต้านทานต่อทองแดงความเข้มข้น 9,000 ppm

การทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวายและแคทลียา การทดสอบในพืชต่างชนิดที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุ พบว่าหอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอาการคล้ายคลึงกับรายงาน

ของ Carr *et al.* (2013) การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบแรนดัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อสาเหตุ พบว่า ข้าวโพดแสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับรายงานของ Krawczyk *et al.* (2010) ซึ่งรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาว (necrotic lesions)

เอกสารอ้างอิง

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. *ใน*: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Carr, E.A., A.M. Zaid, J.M. Bonasera, J.W. Lorbeer, and S.V. Beer. 2013. Infection of onion leaves by *Pantoea ananatis* leads to bulb infection. *Plant Dis*. 97: 1524-1528.

Krawczyk , K., J. Kamasa, A. Zwolinska and H. Pospieszny. 2010. First report of *Pantoea anantis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J. Plant Pathol*. 92: 807-811.