

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

ทิพวรรณ กันหาญาติ ภัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเคิ่ง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2561 โดยฟื้นฟูและปลูกเชื้อแบคทีเรียบนกล้วยไม้ เพื่อแยกเชื้อจากพืชอาศัยและเศษซากพืชอาศัยทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกเดือนที่ตรวจ ใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 2 เดือน

คำหลัก : กล้วยไม้ โรคใบจุด ชีววิทยา

คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาราในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐมประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำรอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ใบร่วง กลีบดอกไหม้ ช่อดอกหักพับ และดอกร่วงไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้ จากการศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสารสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น Facultative anaerobe ลักษณะโคโลนีกลมสีเหลืองที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราหรือในกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์, 2552) ดังนั้น เพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคนี้อาจได้ผลและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยาอื่น ๆ มากขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคารา เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-03-60

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้วยไม้สกุลม็อคคารา
2. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
3. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
4. หม้อนึ่งความดันไอ
5. ตู้อบ
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
7. เครื่องชั่ง
8. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคารา

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช จำนวน 10 ไอโซเลท มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ความสามารถในการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัยและวัสดุปลูก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ใช้เข็มทำแผลบนพืชแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตรหรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ กลุ่มให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูก ทุก 1 เดือน โดยมีวิธีการดังนี้

การแยกเชื้อจากผิวพืชอาศัย แปะใบพืชอาศัยในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

การแยกเชื้อจากพืชอาศัยหรือเศษซากพืชอาศัย ตัดใบพืชอาศัยเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง บดใบพืชในน้ำกลั่น และเลี้ยงบนอาหาร PSA และอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

การแยกเชื้อจากวัสดุปลูกหรือดินปลูก แปะวัสดุปลูกหรือดินปลูกในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2560 – กันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มงานบักเตรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟั้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคารา

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟั้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟั้นฟูเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 10 ไอโซเลท

2. ความสามารถในการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัยและวัสดุปลูก

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคารา จำนวน 10 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อ โดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนกล้วยไม้สกุลม็อคคารา โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบ เพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วฟั้นเชื้อลงบนใบกล้วยไม้ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูกทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกเดือนที่ตรวจถึงแม้แผลบนใบจะแห้งแล้วก็ตาม โดยใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 2 เดือน สอดคล้องกับรายงานของ Sauer *et al.* (2015) ที่ทำการศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอดบนเศษซากพืชอาศัยของเชื้อ *Pantoea ananatis* สาเหตุโรคจุดสีขาวของข้าวโพด โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบนเศษซากของข้าวโพดหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว 60 วัน และยังคงตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้บนใบข้าวโพดที่ยังไม่แสดงอาการของโรคและบนพืช *Digitaria horizontalis* ซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ แสดงให้เห็นแหล่งที่เชื้อแบคทีเรียอาศัยและมีชีวิตรอดโดยอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte สำหรับการแยกเชื้อจากวัสดุปลูกหรือดินปลูกไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาราไม่ได้ใช้วัสดุปลูกและไม่มีพืชอาศัยอื่นที่ใช้วัสดุปลูกหรือดินในการเพาะปลูก

จากข้อมูลเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่อาศัยบนเศษซากพืชได้นาน 2 เดือน จึงสามารถเป็นแหล่งในการแพร่กระจายเชื้อไปยังแหล่งอื่นได้ ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปที่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

พื้ฟูและปลูกเชื้อแบคทีเรียบนกล้วยไม้ เพื่อแยกเชื้อจากพืชอาศัย และเศษซากพืชอาศัยทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกระยะที่ตรวจ ใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 2 เดือน ดังนั้นคำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาราจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปที่

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.
- Sauer, A.V., K.R. Rocha, R.M. Gonçalves, W.F Meirelles, J.E.F. Figueiredo, I.E. Marriel and L.D. Paccola-Meirelles. 2015. Survival of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease in crop debris. *Agronomy Science and Biotechnology*. 1: 21-24.