

การป้องกันกำจัดโรคกล้วยไม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า
โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี

Biological Control and Chemical control for Bacterial flower Blight
on Mokara orchids

ทัศนพร ทศกร ณีฐริมา โฆษิตเจริญกุล
พีระวรรณ พัฒนวิภาส อภิรัชต์ สมฤทธิ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคกล้วยไม้จากกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าพันธุ์ต่างๆ ในพื้นที่ปลูกจังหวัด นครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร ผลการศึกษาและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคกล้วยไม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าพันธุ์ เหลืองกิตติ, อ้อมใหญ่, คาลิปโซ่, เหลืองจิตติ, แดงกิตติ, แดงบุญหลง และ ส้มบางขุนเทียนเบื้องต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* sp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว และเมื่อทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้วสามารถทำให้เกิดอาการโรคเช่นเดียวกับในสภาพแปลง ดังนั้นในปี 2554 จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า สาร Gentamycin sulfate + oxytetracycline hydrochloride 8% WP สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งข้อมูลนี้อยู่ระหว่างการทดสอบซ้ำและจะนำไปขยายผลต่อในสภาพโรงเรือนในปี 2555

รหัสการทดลอง 01-29-54-05-01-02-02-54

คำนำ

เนื่องจากในระยะ 2 ปีที่ผ่านมา เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า แถบ อ.นครชัยศรี จ. นครปฐมประสบกับปัญหาดอกกล้วยไม้ที่มีลักษณะอาการเป็นจุดดำน้ำ เมื่อแผลขยายจะกลายเป็นแผลสีน้ำตาลดำ ทำให้ดอกกตมเน่า บางครั้งอาจลามไปที่บริเวณก้านช่อดอกทำให้ก้านช่อดอกเน่าเสียหาย ส่วนอาการที่พบในดอกที่บานแล้วคือ กลีบดอกจะเป็นจุดดำน้ำใสก่อน จากนั้นจะขยายลุกลามเป็นแผลสีน้ำตาล ทำให้กลีบดอกเน่าดำและไหม้อย่างรวดเร็ว จากการแยกเชื้อตามลักษณะอาการ พบว่า สามารถแยกได้เชื้อรา *Fusarium* spp. ซึ่งมีหลายไอโซเลท และหลายชนิด จากการดูลักษณะสัโคไลของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสร้าง conidia ซึ่งต้องมีการศึกษาจำแนกชนิดและทำการพิสูจน์โรคตามวิธี Koch's postulation เพื่อยืนยันผลต่อไป

ในการศึกษาการป้องกันกำจัดโรคนี้ให้มีประสิทธิภาพที่ดีได้นั้น ต้องทราบและมีข้อมูลทางด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่ระบาดของเชื้อ เพื่อจะได้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากโรคนี้นี้ยังไม่พบมีรายงานลักษณะอาการดังกล่าวและเชื้อสาเหตุโรคมามาก่อน จึงทำให้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรคที่เข้าทำลายส่วนดอกและก้านช่อดอกของกล้วยไม้ โดยเฉพาะในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า ซึ่งพบว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทำให้คุณภาพของดอกเสียหายอย่างมาก ไม่สามารถส่งขายได้ เกษตรกรต้องตัดดอกทิ้งอย่างเดียว แนวโน้มในการระบาดของโรคพบว่าการขยายพื้นที่ในการระบาดเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยที่ต้องดำเนินการศึกษาคือ วิธีการป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อให้ได้ชนิดและอัตราของสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคกล้วยไม้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพมาใช้ในการควบคุมโรคเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกร ประโยชน์จากการศึกษานี้คาดว่าจะได้วิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคในแปลงและลดการแพร่ระบาดของโรคไปยังแปลงบริเวณอื่นๆ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
2. กล้องจุลทรรศน์
3. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล้องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
5. กล้องถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคกลีบดอกไหม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคกลีบดอกไหม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าในพื้นที่ปลูกที่เป็นแหล่งปลูกสำคัญ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร เป็นต้น ควรเก็บตัวอย่างโรคในระยะต่างๆ โดยห่อตัวอย่างด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์และใส่ในถุงพลาสติก บรรจุลงในกล่องเก็บความเย็นเพื่อนำกลับไปศึกษาแยกเชื้อสาเหตุและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการ บันทึกข้อมูลตามลักษณะอาการของโรคและถ่ายภาพส่วนที่เป็นโรค ประเมินเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (disease incidence)

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคกลีบดอกไหม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า

2.1 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโรค โดยทำการตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค (section) และทำสไลด์ เพื่อตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อสาเหตุที่สำคัญเพื่อใช้ในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้อง Compound microscope ถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรียให้สังเกตการณ์ไหลของ ooze จากบริเวณแผลที่ตัด

2.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue transplanting

แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคนางไหลที่พบ โดยตัดชิ้นตัวอย่างที่บริเวณส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร PDA และ NGA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้เพื่อศึกษาลักษณะรายละเอียดของเชื้อประกอบกับเอกสารอ้างอิงเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

2.3. ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อกับพืชโดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 ดอก เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ แยกเก็บเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA โดยวิธี poisoned food technique

3.1 การเตรียมสารป้องกันกำจัดโรคพืช

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ สารป้องกันกำจัดโรคพืช 4 ชนิด คือ

- Bacbicure 25% WP
- Uicide 80% WP
- Copper hydroxide 77% WP
- Gentamycin sulfate + oxytetracycline hydrochloride 8% WP
- Control น้ำเปล่าหนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียมสารป้องกันกำจัดโรคพืชแต่ละกรรมวิธี เพื่อใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 2,000 4,000 6,000 และ 10,000 ppm โดยเตรียมที่ความเข้มข้นระดับสูงสุดก่อน และให้มีความเข้มข้นสูงกว่าระดับที่ต้องการใช้ทดสอบ 10 เท่า

3.2 การเตรียมอาหารทดสอบ

นำอาหาร NGA ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 ม.ล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อนำออกจากหม้อนึ่งความดันแล้ว นำหลอดอาหารแช่ไว้ในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้อาหารแข็งตัว ใช้ปิเปตดูดสารละลายจาก stock สารเคมีในแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ใน ข้อ 3.1 ปริมาตร 1 ม.ล. ใส่ลงในหลอดอาหาร NGA เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง electric mixer แล้วจึงเทอาหารพิษลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำความเข้มข้นละ 9 ซ้ำ ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบกับที่ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืช ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ม.ล. ผสมกับอาหารแทน หลังจากเลี้ยงเชื้อแล้วเป็นเวลา 7 วัน พร้อมสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อสาเหตุ นำค่า clear zone ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

4. การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคกล้วยไม้สกลมอคคาร่าในสภาพโรงเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยกรรมวิธีคือ สารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ทดสอบได้จากข้อที่ 3 เตรียมพืชทดสอบที่มีดอกสม่ำเสมอและเริ่มแสดงอาการของโรคไว้ในโรงเรือน จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ ทั้งหมด 4 ซ้ำ จากนั้นจึงพ่นสารตามกรรมวิธีที่วางไว้ ประเมินความรุนแรงของโรคก่อนการพ่นสารทุกครั้ง โดยประเมินจากจำนวนดอกที่พบโรคจากจำนวนดอกทั้งหมด 10 ต้นต่อซ้ำ และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค บันทึกข้อมูลและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เวลาสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงเกษตรกรปลูกกล้วยไม้สกลมอคคาร่าที่สำคัญ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคกล้วยไม้สกลมอคคาร่า

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกลมอคคาร่า พันธุ์ เหลืองจิตติ, อ้อมใหญ่, คา ลิปโซ่, เหลืองจิตติ, แดงจิตติ, แดงบุญหลง และ ส้มบางขุนเทียน จากแปลงเกษตรกร จ.นครปฐม ราชบุรี และ สมุทรสาคร แยกหาเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ ได้เชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท และเชื้อรา 10 ไอโซเลท และนำเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ ไปปลูกเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธี Koch's postulation ในกล้วยไม้สกล มอคคาร่า 3 พันธุ์ ได้แก่ เหลืองจิตติ, แดงจิตติ, และ ส้มบางขุนเทียน ผลการทดลอง พบว่ากล้วยไม้ทุกพันธุ์ที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนั้น มีการแสดงลักษณะอาการของโรคกล้วยไม้สกลมอคคาร่าภายใน 7 วัน ส่วนดอกกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อราที่แยกได้มีแสดงอาการของโรคให้เห็น 2 ไอโซเลท จึงได้แยกเชื้อกลับอีกครั้งเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคกลีบดอกไหม้ในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า

จากการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการดังกล่าวโดยวิธี Tissue transplanting ซึ่งเมื่อศึกษาเส้นใยเชื้อราที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สามารถแยกได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยเชื้อราสีสีขาว พู ละเอียดในช่วง 3 วันแรก จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมส้ม และสีม่วงเมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้น เมื่อศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมีการสร้าง conidia ขาว ใส คล้ายพระจันทร์เสี้ยว และมีเส้นกั้นกลางระหว่างเซลล์ เมื่อเปรียบลักษณะเชื้อราดังกล่าวที่แยกได้กับเอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ILLUSTRATED GENERA of IMPERFECT FUNGI และหนังสือดรชนีโรคพืชในประเทศไทย ก็พบว่าเป็นเชื้อรา *Fusarium* spp. ซึ่งในต่างประเทศได้มีรายงานว่า เชื้อรา *Fusarium* spp. เป็นเชื้อราในดินที่สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Snyder and Hansen, 1940) มีรายงานว่า *F. subglutinans* และ *F. proliferatum* เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุด และใบไหม้ในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* (Broadhurst และ Hartill, 1996; Chang และคณะ, 1998; D'Agliano และ Carrai, 1994; Honda และคณะ., 1995; Ichikawa และ Aoki, 2000)

ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีลักษณะโคโลนีสีเหลืองเข้ม เป็นมันวาว ขอบเรียบ การเจริญเติบโตของเชื้อสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใน 12-24 ชม. และเมื่อนำไปศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุโดยการทดสอบทางชีวเคมี ผลการทดลองพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* sp. ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีรายงานโรคกลีบดอกไหม้ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาให้ละเอียดของเชื้อเพิ่มเติมอีกเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อไปในการป้องกันกำจัดโรค

3. การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA โดยวิธี poisoned food technique

ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในห้องปฏิบัติการ ได้แก่สาร Bacbicure 25% WP, Uvicide 80% WP, Copper hydroxide 77%WP และ Gentamycin sulfate + oxytetracycline hydrochloride 8%WP ที่ระดับความเข้มข้น 2000, 4000, 6000, 8000 และ 10,000 ppm. จากการวัดขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้นพบว่า สาร Gentamycin sulfate + oxytetracycline hydrochloride 8% WP สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีทุกระดับความเข้มข้น ส่วนสารอื่นสามารถวัดขนาด clear zone ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งในการทดลองนี้จะได้นำเชื้อทั้ง

3 ไอโซเลททดสอบใหม่อีกครั้ง เนื่องจากช่วงเดือนต.ค.ถึงธ.ค. 2554 ห้องปฏิบัติการโรคพืชประสบภัยน้ำท่วม

4. การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคกล้วยไม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าในสภาพโรงเรือนทดลอง

เนื่องจากโรงเรือนทดลองกล้วยไม้ประสบภัยน้ำท่วมทำให้ต้นกล้วยไม้ที่ปลูกและทำการทดลองไว้เสียหาย จึงต้องทำการทดลองใหม่ในปี 2555

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคกล้วยไม้ในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่านั้น พบว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคือ เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* sp. ซึ่งเมื่อทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้วสามารถทำให้เกิดอาการโรคเช่นเดียวกับในสภาพแปลง ส่วนเชื้อราสาเหตุโรคนั้นยังไม่ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากในการปลูกเชื้อสาเหตุนั้นยังไม่มีควมสม่ำเสมอของการเกิดโรค ซึ่งจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ดังนั้นในปี 2554 จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า สาร Gentamycin sulfate + oxytetracycline hydrochloride 8% WP สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งข้อมูลนี้อยู่ระหว่างการทดสอบซ้ำและจะนำไปขยายผลต่อในสภาพโรงเรือนในปี 2555

เอกสารอ้างอิง

- Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Broadhurst, P. G. and Hartill, W. F. T. 1996. Occurrence of *Fusarium subglutinans* on *Cymbidium* orchids in New Zealand. *Plant Dis.* 80:711(Abstr.).
- Chang, M., Hyun. I. H., Lee, Y. H. and Lee, D. H. 1998. Leaf spot of *Cymbidium hybrida* caused by *Fusarium proliferatum*. *Korean J. Plant Pathol.* 14:664-667.
- D'Agliano, G. and Carrai, C. 1994. Presenza di *Fusarium subglutinans* in coltivazioni industriali di *Cymbidium*. *Inf. Fitopatol.* 44:24-27.