การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. สาเหตุโรคยางไหล

Screening of Antagonistic Bacterias for Control Gummy Stem Blight caused by *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm.

ทัศนาพร ทัศคร ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

ธารทิพย ภาสบุตร พีระวรรณ พัฒนวิภาส

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคยางไหล ที่ จ.สุพรรณบุรี แพร่ สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างพืช พบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนของพืช จำนวน 10 ไอโซเลท และแยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ซึ่งในปี 2554 นี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 50 ไอโซเลท และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนของพืช จำนวน 10 ไอโซเลท ผลการทดลอง พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค 3 ไอโซเลท ได้อย่างน้อย 30 ไอโซเลท โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรา *Didymella bryoniae*

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-05-54

คำนำ

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาดและเข้าทำลายในพืชตระกูลแตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืชตระกูลแตง ในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ซึ่งด้วยลักษณะอาการของโรคเช่นนี้ จึงได้มีการตั้งชื่อโรคตามอาการโรคที่พบ คือ โรคยางไหล ถ้าโรคมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก ต้นจะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง บางครั้งเกษตรกรจึงรีบเก็บผลผลิตก่อน ทั้งที่แตงยังสุกไม่เต็มที่ทำให้ผลผลิตของแตงไม่ได้คุณภาพ (ทัศนาพรและพีระวรรณ, 2552)

ลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ วงจรการเกิดโรคของเชื้อรา *D. bryoniae* สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน perithecium เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง perithecium ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้างและปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ

วงจรการเกิดโรค เนื่องจากเชื้อรา *D. bryoniae* ที่สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) อยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน pycnidia เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง pycnidia ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้าง และปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ Sudisha และคณะ (2005) ได้ทดสอบผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *T. hazianum* และ*Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้และเพิ่มผลผลิตของแคนตาลูปด้วย Abd-El-Moity และคณะ (2009) ได้รายงานว่า การใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* , Bacillus subtilis ผสมร่วมกับเชื้อรา *T. hazianum* ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราในพืช

ตะกูลแตงได้ดีเช่นเดียวกัน เนื่องจากการศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อรา *D. bryoniae* โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค มีการศึกษาและนำมาใช้ได้น้อย ซึ่งจากรายงานพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ เชื้อ *Bacillus* sp. มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราในดินได้ดี และนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ แต่ในสภาพแปลงทดลองยังไม่เคยมีการศึกษา ดังนั้นเพื่อได้วิธีการควบคุมโรคยางไหลโดยชีววิธี จึงต้องมีการคัดเลือก ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลและการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จากแหล่งปลูกในแปลงเกษตรกร โดยเก็บตัวอย่างต้นพืชที่แสดงอาการเป็นโรค นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างต้นพืชที่เป็นโรค และต้นที่ปกติจากแหล่งปลูกของเกษตรกร เพื่อนำมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี leaf washing technique และเก็บตัวอย่างดินมาแยกหาเชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์โดยวิธี Soil dilution plate โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม เมื่อพบมีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้บันทึกลักษณะของเชื้อ และแยกเชื้อเก็บไว้ให้บริสุทธิ์

3. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ในข้อ 2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 5 วัน ใช้ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบททีเรียปฏิปักษ์ทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราสาเหตุโรค โดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความยาว 1 ซ.ม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซ.ม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดี มีระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เวลาสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553

สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกแตงของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคยางไหลในห้องปฏิบัติการ

ในปี 2554 ได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 50 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช จำนวน 10 ไอโซเลท รวม 60 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยวัดจากการสร้าง clear zone และเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรา *Didymella bryoniae*

สรุปผลการทดลอง

ในปี 2554 จากการเก็บตัวอย่างดินและพืช สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนของพืช จำนวน 10 ไอโซเลท และแยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ซึ่งในปี 2554 นี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 50 ไอโซเลท และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนของพืช จำนวน 10 ไอโซเลท ผลการทดลอง พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค 3 ไอโซเลท ได้อย่างน้อย 30 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท จะดำเนินการทดสอบในปี 2555

เอกสารอ้างอิง

ทัศนาพร ทัศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. จดหมายข่าวผลิใบ ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน เมษายน 2552. หน้า 2 - 3.

Abd-El-Moity, T.H, M.L Abed –El- Moneim, M.M.M. Tia, A.Z. Aly, M.R.A. Tohomy. 2009. Biological Control of some cucumber diseases under organic agriculture. เข้าถึงข้อมูลวันที่ 1 ก.ย. 2552 : http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=608_28

Sudisha, J., S. R. Niranjana, S. Umesha, H. S. Prakash and H. Shekar Shetty. 2005. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatment on disease incidence and fruit yield. Biological Control, Vol.37 Issue 2, May. P 196-205.