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

ในปี 2554 – 2555 ได้ตรวจพบแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมจากตัวอย่างหัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) มันขี้หนู (*Coleus parvifolius*) และรากพริก (*Capsicum annuum*) และสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์สำหรับใช้ในการทดลองได้บางไอโซเลต ในปี 2556 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากมันฝรั่งและพริกอย่างละ 1 ไอโซเลต ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในกระถางทดลองพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ โดยใช้แบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง โดยมีกรรมวิธีใช้สาร carbofuran 3G อัตรา 0.1 กรัมต่อกระถาง และกรรมวิธีไม่ใส่สารใดๆ เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยจำนวนปม และจำนวนกลุ่มไข่ ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ทั้ง 2 ไอโซเลตและกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร carbofuran 3G ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรียหรือสารเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* และสาร carbofuran

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-07-54

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot nematodes: *Meloidogyne* spp.) มีพืชอาศัยมากกว่า 2,000 ชนิด แพร่ระบาดและทำลายพืชปลูกหลายชนิดในประเทศไทย เช่น พริก, มะเขือเทศ มันฝรั่ง ปทุมมา และฝรั่ง เป็นต้น โดยไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ คือ *M. incognita* และ *M. javanica* แนวทางการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม นอกจากการเขตกรรม และการใช้สารเคมีแล้ว การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมแบบชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ เชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* เป็นหนึ่งในศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Gowen *et al*., 2008) *Pasteuria* spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อการครบวงชีวิต (obligate parasite) การจำแนกชนิดของ *Pasteuria* spp. ปัจจุบันยังไม่ชัดเจนแต่มีการแบ่งออกอย่างคร่าวๆ 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* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al*., 2008) Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอย โดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช และเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube แทงผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ในระยะยาวจะทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยในดินลดลง ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อถูกสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999) มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของ *P. penetrans* ในพืชหลายชนิด 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) สปอร์จำนวนน้อยของ *P. penetrans* ในดินสามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al*., 1996; Oostendrop *et al*., 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al*., 2005)

ในประเทศไทยยังไม่มีการรวบรวมแบคทีเรีย *P. penetrans* และยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียชนิดนี้ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของแบคทีเรียชนิดนี้ที่เป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการครบวงชีวิต ทำให้การผลิตแบคทีเรียชนิดนี้ในปริมาณมากทำได้ยากและมีต้นทุนสูงจึงไม่เป็นที่สนใจ อย่างไรก็ตามมี

รายงานการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการ (Hewlett *et al*., 2002) และมีการทดสอบ *P. penetrans* ที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในแปลงทดลอง (Hewlett *et al*., 2006) ปัจจุบันมีการผลิตสปอร์ของ *Pasteuria* เป็นการค้าโดยบริษัท Pasteuria Biosciences ซึ่งคาดว่าในอนาคตอาจมีการนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย จึงควรรวบรวม *Pasteuria* สายพันธุ์ในประเทศไทย ก่อนที่จะมีการนำเข้าสายพันธุ์จากต่างประเทศมาใช้ ซึ่งจะทำให้การค้นหา *Pasteuria* สายพันธุ์ไทยทำได้ยากขึ้น *Pasteuria* สายพันธุ์ไทยอาจมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยได้ดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ เนื่องจาก *P. penetrans* เป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยอาศัยสูง ดังนั้น *P. penetrans* สายพันธุ์ไทยอาจใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยของไทยได้ดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

จากการดำเนินงานในปี 2554-2555 สามารถตรวจพบ *P. penetrans* ได้จากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง 21 ตัวอย่าง จากหัวมันขี้หนูที่เป็นโรคหูด 88 ตัวอย่าง และจากรากพริก 5 ตัวอย่าง ในปี 2556 เลี้ยงเพิ่มปริมาณสปอร์ของ *P. penetrans* ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง (PP122) และรากพริก (PPR70) อย่างละ 1 ไอโซเลต ทำการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incog*nita ในกระถางทดลอง

- การเตรียมตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม

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

- การทดสอบประสิทธิภาพของ *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่สารเคมี และ *P. penetrans*

กรรมวิธีที่ 2 คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลตจากหัวมันฝรั่ง (PP122) อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลตจากรากพริก (PPR70) อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง

กรรมวิธีที่ 4 คลุกดินด้วยสาร carbofuran 3G อัตรา 0.1 กรัมต่อกระถาง

ย้ายมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 3-4 สัปดาห์ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อหนัก 200 กรัมที่คลุกด้วยผงสปอร์ของ *P. penetrans* จำนวน 10^6 สปอร์ต่อ

กระถางใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 400 ตัว ลงในกระถาง โดยเจาะดินรอบต้นมะเขือเทศจำนวน 4 ช่อง ใช้ไปเปตหยอดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำลงในช่องแล้วกลบดินปิด ปลูกมะเขือเทศเป็นเวลา 60 วัน ตรวจผลการทดลองโดยนับจำนวนปม จำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนรากมะเขือเทศ และชั่งน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศ วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2554–2555 ตรวจพบแบคทีเรีย *P. penetrans* ในตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จากหัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) มันขี้หนู (*Coleus parvifolius*) และรากพริก (*Capsicum annuum*) และสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์สำหรับใช้ในการทดลองได้บางไอโซเลต ในปี 2556 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง (PP122) และพริก (PPR70) อย่างละ 1 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran 3G พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยจำนวนปม และจำนวนกลุ่มไข่ ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ทั้ง 2 ไอโซเลตและกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร carbofuran 3G ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรียหรือสารเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* หรือสาร carbofuran 3G ในการทดลองนี้พบว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่สารเคมี หรือสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* มีจำนวนปมเฉลี่ย 49 ปม แต่มีจำนวนกลุ่มไข่เพียง 14 กลุ่มไข่ ซึ่งหากขยายระยะเวลาการตรวจผลการทดลองออกไป จะมีการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยมากขึ้น ซึ่งจะทำให้ผลการทดลองมีความแตกต่างมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่าอัตราสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อการเข้าทำลายรากของไส้เดือนฝอยด้วย เนื่องจากจำนวนปมบนรากมะเขือเทศในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. Penetrans* ไม่แตกต่างจากการใช้สาร carbofuran 3G

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่งและพริกอย่างละ 1 ไอโซเลต ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในกระถางทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว โดยการคลุกดินด้วยสปอร์อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมเช่นเดียวกับการใช้สาร carbofuran 3G อัตรา 0.1 กรัม/กระถาง โดยมีจำนวนปมและจำนวนกลุ่มไข่ต่อรากน้อยกว่าการไม่ใช้สารเคมีและแบคทีเรีย *P. penetrans*

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: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.

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 Netherlands.

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).

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.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม และจำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนรากมะเขือเทศ

กรรมวิธี	น้ำหนักแห้งต้น	จำนวนปม [1/]	จำนวนกลุ่มไข่ [1/]
ไม่ใส่สารเคมี และ *P. penetrans*	2.06	49b	14b
PP122 อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง	1.63	16a	3a
PPR70 อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง	1.79	16a	3a
Carbofuran 10G อัตรา 0.1 กรัม/กระถาง	1.53	12a	4a
F-Test	ns	*	*
CV (%)	29.64	79.49	48.91

[1/] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%