

การปรับปรุงวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาโดยใช้ชุดตรวจสอบ (GLIFT kit) โรคเหี่ยวของปทุมมาและการขยายผลการใช้ชุดตรวจสอบ
ในกระบวนการผลิตหัวพันธุ์

Improvement method for detection of *Ralstonia solanacearum* in Curcuma seed using Curcuma bacterial wilt GLIFT kit and expanding the use of GLIFT kit in Curcuma seed production

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} ดารุณี ปุญญพิทักษ์^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/}
รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} วิภาดา ทองทักษิณ^{2/} สุธามาศ ณ น่าน^{3/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน
^{3/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีประสิทธิภาพโดยการนำหัวพันธุ์ปทุมมา มาตัดชิ้นส่วน นำเอาเฉพาะส่วนท่อน้ำ ท่ออาหารมาตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ดีที่สุด ทดสอบบัฟเฟอร์ต่างๆในการทำ GLIFT kit ได้แก่ coating buffer phosphate buffer citrate buffer Tris buffer ได้สารละลายbuffer ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบ ทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ได้ความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ 1:500 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม พบว่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย RS ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1×10^3 cfu/ml ทดสอบ buffer ต่างๆกับกระดาศชนิดต่างๆในการทำชุด GLIFT kit พบว่า buffer สามารถใช้ได้ดีกับกระดาศไนโตรเซลลูโลส AE99 โดยมีความไวในการตรวจ 10×10^3 cfu/ml

รหัสโครงการ.. 01-32-54-01-01-01-02-54

คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับและไม้ตัดดอก มีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมามีโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรครุขที่มีควมสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิด โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่พืชเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียชนิดนี้ได้แก่ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา เป็นต้น *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียทางดินสามารถอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้อาจสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็วและทั่วประเทศเมื่อมีการขนย้ายส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไปปลูกในที่ต่าง ๆ ความรุนแรงของโรครุนแรงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลายสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบแบคทีเรียชนิดนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้

นอกจากนี้เนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรครุขเหี่ยว *R. solanacearum* สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ เมื่อในไปปลูกในฤดูต่อไปจะเกิดการระบาดของโรครุนแรง ฉะนั้นการใช้หัวพันธุ์ปทุมมาปลอดโรคเป็นวิธีการหนึ่งที่จะลดการระบาดของโรคหรือการเกิดโรครุขเหี่ยวในแปลงปลูก ซึ่งการคัดเลือกหาหัวพันธุ์ปลอดโรคต้องใช้เครื่องมือและวิธีการในการตรวจสอบที่รวดเร็ว ญญิตมา *et al.* (2543) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา ซึ่งชุดตรวจสอบสำเร็จรูปดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้แต่ยังมีความยุ่งยาก และต้องใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการตรวจ ทำให้เกษตรกรนำไปใช้ไม่สะดวก สุรภี *et al.* (2551) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit ตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ซึ่งสามารถตรวจเห็นผลภายใน 5 นาที แต่เมื่อในไปใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในหัวพันธุ์ทำปฏิกิริยากับกระดาษรองรับในชุดตรวจสอบทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงควรปรับปรุงวิธีการตรวจสอบลดจนสารละลายที่ใช้กับตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพ และง่ายต่อการใช้งาน เพื่อขยายการใช้งานชุดตรวจสอบในขบวนการผลิตหัวพันธุ์ปทุมมาของเกษตรกร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระจ่างต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ปทุมมา

วิธีการ

1. **ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา** ทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างจากหัวพันธุ์ปทุมมา จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ
2. **ทดสอบสารละลาย(buffer) ที่ใช้ในชุดตรวจสอบ** ทำการทดสอบชนิดสารละลายที่ใช้เป็นตัวละลายน้ำบัคตัวอย่างที่ใช้ประกอบในชุดตรวจสอบ จำนวน 4 ชนิด 4 ซ้ำ
3. **ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของชุดเตรียมสอบ** ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา ทดสอบกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในหัวปทุมมา
4. **ทดสอบความไวในการตรวจสอบ** ทำการทดสอบความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา
5. **ทดสอบการใช้ชุดตรวจสอบในแปลงปลูกปทุมมา** เป็นการนำชุดตรวจสอบไปใช้จริงในแปลงปลูกปทุมมา
6. **การขยายผลการใช้ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวปทุมมาในกระบวนการผลิตหัวพันธุ์ของเกษตรกร**

เกษตรกร

- 6.1 **สำรวจและเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่จะใช้เป็นพันธุ์จากเกษตรกร** ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการและชุดตรวจสอบ
- 6.2 **สาธิตวิธีการตรวจสอบให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกปทุมมา**
- 6.3 **อบรมวิธีการใช้ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวของปทุมมาให้แก่เกษตรกร**
- 6.4 **ผลิตชุดตรวจเพื่อให้เกษตรกรได้นำไปใช้ตรวจหัวพันธุ์ปทุมมาก่อนปลูก**
- 6.5 **เก็บข้อมูลการใช้งานและความพึงพอใจของเกษตรกร**

เวลาและสถานที่

ต.ค.54 - ก.ย.56 ที่กลุ่มงานבקเทรวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร และ แปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีประสิทธิภาพโดยการนำหัวพันธุ์ปทุมมา มาตัดชิ้นส่วน นำเอาเฉพาะส่วนท่อน้ำ ท่ออาหารมาตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ดีที่สุด ทดสอบบัฟเฟอร์ต่างๆในการทำ GLIFT kit ได้แก่ coating buffer phosphate buffer citrate buffer Tris buffer ได้สารละลายbuffer ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบ ทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ได้ความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ 1:500 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม พบว่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย RS ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1×10^3 cfu/ml ทดสอบ buffer ต่างๆกับกระดาศชนิดต่างๆในการทำชุด GLIFT kit พบว่า buffer สามารถใช้ได้ดีกับกระดาศไนโตรเซลลูโลส AE99 โดยมีความไวในการตรวจ 10×10^3 cfu/ml

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐธิดา ไชยิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2541. ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของปทุมมา. รายงานผลงานวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานבקัตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 24-35.
- ณัฐธิดา ไชยิตเจริญกุล วนิดา ฐิตะฐาน และอรทัย เอื้อตระกูล 2543. ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวของปทุมมา. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา ปีที่10 เล่มที่3 :57-61.
- วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร. 67(5):415-419.
- สุนตรา ภาวิจิตร , ณัฐธิดา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี. 2538. โรคเหี่ยวของกระเจียวและปทุมมา ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 5(4) : 92
- สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537 ปทุมมาและกระเจียว. น.58-72. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.159 น.
- สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.128 น.
- สุรภี กীরติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฐธิดา ไชยิตเจริญกุล และ เยวภา ต้นติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ “ กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.