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

Pasteuria penetrans เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ และเป็น obligate parasite ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) *P. penetrans* มีศักยภาพในการนำไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม การเป็น obligate parasite ทำให้ *P. penetrans* ต้องเจริญเติบโตในไส้เดือนฝอยอาศัยเพื่อครบวงชีวิต ซึ่งเป็นอุปสรรคในการผลิตสปอร์ให้ได้จำนวนมาก ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ได้รับความสนใจมากนัก ต่อมามีรายงานการผลิต *Pasteuria* เชิงพาณิชย์โดยการเลี้ยงบนอาหารเทียมได้สำเร็จ ทำให้ *P. penetrans* ได้รับความสนใจอีกครั้ง *P. penetrans* มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม ดังนั้นการรวบรวมและคัดเลือก *P. penetrans* สายพันธุ์ที่เป็นของไทย เพื่อใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย อาจได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ ซึ่งควรทำก่อนที่จะมีการนำ *P. penetrans* สายพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามาใช้ เพราะจะทำให้การหาแบคทีเรียสายพันธุ์ไทยทำได้ยาก งานวิจัยนี้ได้รวบรวม *P. penetrans* โดยการบดตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) และมันขี้หนู (*Coleus parvifolius*) และแยกจากผงรากที่ได้จากการบดรากพริก (*Capsicum annuum*) ที่เป็นโรครากปม นำไปปั่นเหวี่ยงในน้ำกลั่นแล้วนำของเหลวส่วนบนมาตรวจหาสปอร์ของ *P. penetrans* โดยใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อ พบ *P. penetrans* ในตัวอย่างจากมันฝรั่ง มันขี้หนู และรากพริก เท่ากับ 33.3 83.8 และ 5.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

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 อย่างไรก็ตามมีรายงานการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการ (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

วิธีดำเนิน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม

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

2. การแยก *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่งและมันขี้หนู

เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่เป็นโรคหูดจากแปลงเกษตรกร และจุดรับซื้อหัวมันฝรั่งของบริษัทเอกชน เก็บตัวอย่างหัวมันขี้หนูที่เป็นโรคหูดจากแปลงเกษตรกร แยก *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่งและหัวมันขี้หนู โดยการแยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมออกจากหัวมันฝรั่งและมันขี้หนู โดยการฝานหัวที่เป็นโรค เป็นชิ้นบางๆ และปั่นในเครื่องปั่น แยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือน

ฝอย โดยการกรองผ่านตะแกรง และปั่นเหวี่ยงในสารละลายน้ำตาล (Centrifugal flotation) นำตัวเต็มวัยเพศเมียใส่ลงในหลอด microcentrifuge ตัวอย่างละประมาณ 100 ตัว/หลอด บดไส้เดือนฝอยในหลอด microcentrifuge ด้วย Plastic pestle แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำของเหลวส่วนบนไปตรวจหา *P. penetrans*

3. การแยก *P. penetrans* จากรากพริก

เก็บตัวอย่างรากพริกที่เป็นโรครากปมจากแปลงเกษตรกร ผึ่งรากให้แห้งในที่ร่ม บดรากพริกด้วยโกร่งบดตัวอย่างให้ละเอียด นำผงรากหนัก 0.01 กรัมใส่ในหลอด microcentrifuge เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำของเหลวส่วนบนไปตรวจหา *P. penetrans*

4. การตรวจหา *P. penetrans*

นำของเหลวส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปตรวจหา *P. penetrans* โดยใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อ โดยดูดตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 100 ตัว ที่อยู่ในน้ำ 50 ไมโครลิตรลงในหลอด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดตัวอย่างใส่ลงใน ELISA plate ขนาด 96 ช่อง และตรวจหาไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* ติดที่ผนังลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ

5. การเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *P. penetrans*

P. penetrans สามารถขยายพันธุ์ได้ในตัวของไส้เดือนฝอย การเพิ่มจำนวนของ *P. penetrans* ทำได้โดยการนำตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยที่มี สปอร์ของ *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัว ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ จากนั้นแยกตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 60 วัน คัดเลือกตัวเต็มวัยที่มีลักษณะสีขาวขุ่น ที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* อยู่ภายใน เก็บในหลอด microcentrifuge

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งและมันขี้หนูที่มีอาการหูด และรากพริกที่เป็นโรครากปมเพื่อตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* และตรวจตัวอย่างโดยการใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อให้สปอร์เกาะ แล้วตรวจหาตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์เกาะผนังลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการตรวจตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียที่แยกได้จากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรค

หูดจำนวน 632 ตัวอย่าง พบ *P. penetrans* 21 ตัวอย่าง การตรวจตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียที่แยกได้จากหัวมันขี้หนูที่เป็นโรคหูดจำนวน 105 ตัวอย่าง พบ *P. penetrans* 88 ตัวอย่าง และการตรวจตัวอย่างจากผงรากพริกจำนวน 95 ตัวอย่าง พบ *P. penetrans* 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) นำไส้เดือนฝอยที่มีสปอร์เกาะจากแต่ละตัวอย่าง ใส่ลงในต้นมะเขือเทศอายุ 1 เดือน เพื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยเป็นระยะเวลา 60 วัน ได้ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* อยู่ภายใน ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูก *P. penetrans* เข้าทำลาย จะไม่สร้างกลุ่มไข่ ตัวมีสีขาวขุ่นเมื่อส่องไฟจากด้านบน และมักมีขนาดใหญ่กว่าไส้เดือนฝอยที่ไม่ถูก *P. penetrans* เข้าทำลาย เมื่อบี้ตัวเต็มวัยเพศเมียบนสไลด์จนแตกออกจะพบสปอร์ของ *P. penetrans* จำนวนมากไหลออกมา ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมที่ใช้เป็นเหยื่อล่อ *P. penetrans* ในการทดลองนี้เป็นประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่ปนกัน ซึ่งได้มาจากพืชต่างๆ ที่เป็นโรครากปม การใช้ประชากรไส้เดือนฝอยจากแหล่งต่างๆ ปนกันเป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ *P. penetrans* เนื่องจากสปอร์ของ *P. penetrans* มักจะจำเพาะเจาะจงกับชนิดไส้เดือนฝอย การทดลองในระยะต่อไปจะเป็นการเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *P. penetrans* และทดสอบกับไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ ต่อไป การตรวจพบ *P. penetrans* ในทุกชนิดพืชที่ตรวจทำให้คาดได้ว่าจะสามารถได้ไอโซเลทของ *P. penetrans* จากพืชชนิดอื่นๆ อีก เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมมีพืชอาศัยกว้าง ซึ่งในอนาคตอาจได้ไอโซเลทของ *P. penetrans* จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่มีความหลากหลายมากขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถตรวจพบ *P. penetrans* จากตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมีย ที่แยกจากหัวมันฝรั่ง และมันขี้หนูที่เป็นโรคหูด รวมทั้งผงรากจากการบดรากปมของพริก ซึ่งงานขั้นต่อไปจะเป็นการเพิ่มปริมาณสปอร์ เพื่อใช้ในการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ *P. penetrans* ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมต่อไป

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 Natherlands.

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.

Table 1 Detection of *P. penetrans* in *Meloidogyne* spp. adult females from *S. tuberosum* cv. Atlantic *and C. parvifolius* and from root powder of *C. annuum*

Plant species	Sample type	No. of sample	No. of positive detection	%
S. tuberosum	Adult females	632	21	3.3
C. parvifolius	Adult females	105	88	83.8
C. annuum	Root powder	95	5	5.3