การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus amyloliquefaciens* เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*)

Development of Bio-product from *Bacillus amyloliquefaciens* for Controlling Bacterial Wilt of Curcuma (*Curcuma lismatifolia*)

พรนิภา ถาโน[1] และ อังสนา อัครพิศาล[1]*

Pornnipa Thano[1] and Angsana Akarapisan[1]*

[1]ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: angsana.a@cmu.ac.th

บทคัดย่อ

แยกแบคทีเรียได้จำนวน 173 ไอโซเลท นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท MH1 สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของปทุมมา พบ แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 3 ไอโซเลท (MTR13, MTR14 และ PS6) ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา คุณสมบัติชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* และยังได้คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ต่าง ๆ และระยะเวลาที่ใช้ในเลี้ยง พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท MTR13 และ PS6 สร้างเอนโดสปอร์สูงสุดในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) มีค่า pH ที่ 4 และ 6 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ส่วนไอโซเลท MTR14 สร้างเอนโดสปอร์สูงสุดในอาหาร PDB มีค่า pH เท่ากับ 5 ในวันที่ 5 จากนั้นพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบผง เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน พบว่า กรรมวิธีที่ คลุกหัวพันธุ์ด้วยชีวภัณฑ์ MTR13 และ PS6 ก่อนปลูกแล้ว ราดสารละลายของชีวภัณฑ์หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1 ชั่วโมง สามารถลดความรุนแรงของโรคได้100 และ 61.54% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมการเกิดโรค

คำสำคัญ: โรคเหี่ยวเขียว, ปทุมมา, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Ralstonia solanacearum*

ABSTRACT

The 173 bacterial isolates were screened against bacterial wilt of *Curcuma alismatifolia* caused by *Ralstonia solanacearum* strain MH1. On the basis of *in vitro* screening, three isolates (MTR13, MTR14 and PS6) showed the highest inhibitory effect. All of antagonistic bacteria were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* according to their morphological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing. Optimum sporulation condition of antagonists including media, times and pH were also determined. Culturing in PDB medium for 4 days at pH 4 and 6 were the most effective for sporulation of isolates MTR13 and PS6, respectively. While culturing in PDB medium for 5 days at pH 5 was the most effective for sporulation of isolate MTR14. The efficacy of bio-product was tested in greenhouse. The result showed that the disease incidence was reduced 100 and 61.54% when treated the rhizome with bio-products MTR13 and PS6, respectively before planting and application of their suspension was done one hour after the pathogen inoculation, when compared with the control.

Keywords: Bacterial wilt, *Curcuma alismatifolia*, *Bacillus amyloliquefaciens, Ralstonia solanacearum*

บทนำ

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) ปัจจุบันเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีการส่งออกเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้ Ruamrungsri (2015) ในการผลิตหัวปทุมมาเพื่อการส่งออกมีปัญหาสำคัญเรื่องโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถอาศัยอยู่ในดินได้นาน และมีพืชอาศัยกว้าง ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เพื่อลดปริมาณเชื้อสาเหตุ และลดการใช้สารเคมี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ มาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียในปทุมมา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยก และจำแนกเชื้อสาเหตุโรคของปทุมมา

เก็บตัวอย่างโรคจากแปลงในพื้นที่ อ. เมือง และ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ แล้วแยกเชื้อสาเหตุด้วยวิธี streak plate และจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา คุณสมบัติชีวเคมี และเทคนิค phylotype-specific multiplex PCR (Pmx-PCR)

2. การแยก และการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกแบคทีเรียด้วยวิธี serial dilution โดยใช้ตัวอย่าง 10 กรัม/น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยวิธี paper disc บันทึกผลการทดลองโดยวัดรัศมีความกว้างบริเวณที่เกิดวงใส

3. การจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา คุณสมบัติชีวเคมี และวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 5

4. การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ และผลิตชีวภัณฑ์

ทดสอบสูตรอาหาร 4 สูตร ได้แก่ NGB (Nutrient glucose broth), PDB (Potato dextrose broth), N3 และ TY (Tryptone yeast extract) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 4, 5 และ 6 วัน และค่า pH ของอาหารคือ pH ที่ 4, 5 และ 6 วัดปริมาณเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี drop plate และผลิตชีวภัณฑ์แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วประเมินการมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เป็นระยะเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution plate count บันทึกปริมาณเป็นหน่วย cfu/ml

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของชีวภัณฑ์ในสภาพโรงเรือน

คลุกหัวปทุมมาด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เมื่อปทุมมาอายุ 2 เดือน ปลูกเชื้อสาเหตุโรค บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน แล้วประเมินความรุนแรงของโรคคิดเป็นเปอร์เซนต์ ดังนี้ ความรุนแรงของโรค(%) = [∑(จำนวนต้นพืชที่เป็นโรคในแต่ละระดับ × ระดับการเกิดโรค) /(จำนวนต้นพืชทั้งหมดที่ทำการทดสอบ × ระดับการเกิดโรคสูงสุด)] × 100 และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคคิดเป็นเปอร์เซนต์ดังนี้ ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค(%) = [(ความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม – ความรุนแรงของโรคในแต่ละกรรมวิธี) / ความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม] × 100

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อสาเหตุโรคของปทุมมา

แยกแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ MH1, MH2 และ SS1 พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *R. solanacearum* และจัดอยู่ใน phylotype I ดังเช่นการศึกษาของ Kumar *et al*. (2014) ที่รายงานว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายขิงจัดอยู่ใน phylotype I ด้วยเทคนิค Pmx-PCR

2. การแยก และการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกแบคทีเรียได้ 173 ไอโซเลท พบ มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคได้สูงสุดจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MTR13, MTR14 และ PS6 มีรัศมีความกว้างของบริเวณใสเป็น 11.00, 10.33 และ 11.00 mm ตามลำดับ

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR13, MTR14 และ PS6 สามารถจำแนกได้เป็น *B. amyloliquefaciens* ซึ่งลำดับเบสมีความใกล้เคียงกับ *B. amyloquefaciens* รหัส KJ767326, DQ177319, KP059106 และ KX665550 (Figure 1)

4. การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างเอนโดสปอร์ และผลิตชีวภัณฑ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR13 และ PS6 สร้างเอนโดสปอร์สูงสุด ในอาหาร PDB ที่มีค่า pH 4 และ 6 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 วัน และแบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR14 สร้างเอนโดสปอร์สูงสุดในอาหาร PDB ที่ค่า pH 5 เป็นเวลา 5 วัน

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของชีวภัณฑ์ในสภาพโรงเรือน

พบว่า กรรมวิธีที่ราดสารละลายชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR13 และ PS6 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1 ชั่วโมง สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ดีที่สุดคือ 100 และ 61.54 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับการรายงานของ Yang *et al*. (2012) ที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1JN2 สายพันธุ์จากกลุ่มของ *B. subtilis* สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ 69.17 %

สรุป

แยกแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ MH1, MH2 และ SS1 จำแนกเป็นแบคทีเรีย *R. solanacearum* phylotype I และได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค จัดอยู่ในกลุ่ม *B. amyloliquefaciens* ทั้ง 3 ไอโซเลท สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR13 และ PS6 คือเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ค่า pH 4 และ 6 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 วัน และ ไอโซเลท MTR14 เลี้ยงในอาหาร PDB ที่ค่า pH 5 นาน 5 วัน เมื่ออยู่ในรูปของสารชีวภัณฑ์ แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีชีวิตรอดได้นานกว่า 6 เดือน เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน พบว่า กรรมวิธีที่คลุกหัวพันธุ์ด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ MTR13 และ PS6 ก่อนปลูก แล้วราดสารละลายของชีวภัณฑ์หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1 ชั่วโมง สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ดีที่สุด คือ 100 และ 61.54 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมการเกิดโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Kumar, A., T. P. Prameela, R. Suseelabhai, A. Siljo, M. Anandaraj and B. A. Vinatzer. 2014. Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathology 63:1138–1148.

Ruamrungsri, S. 2015. The physiology of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. as a basis for the improvement of ornamental production. Eur. J. Hortic. Sci. 80: 316–321.

Yang, W., Q. Xu, H. X. Liu, Y. P. Wang, Y. M. Wang, H. T. Yang, and J. H. Guo. 2012. Evaluation of biological control agents against Ralstonia wilt on ginger. Biol control. 62: 144–151.

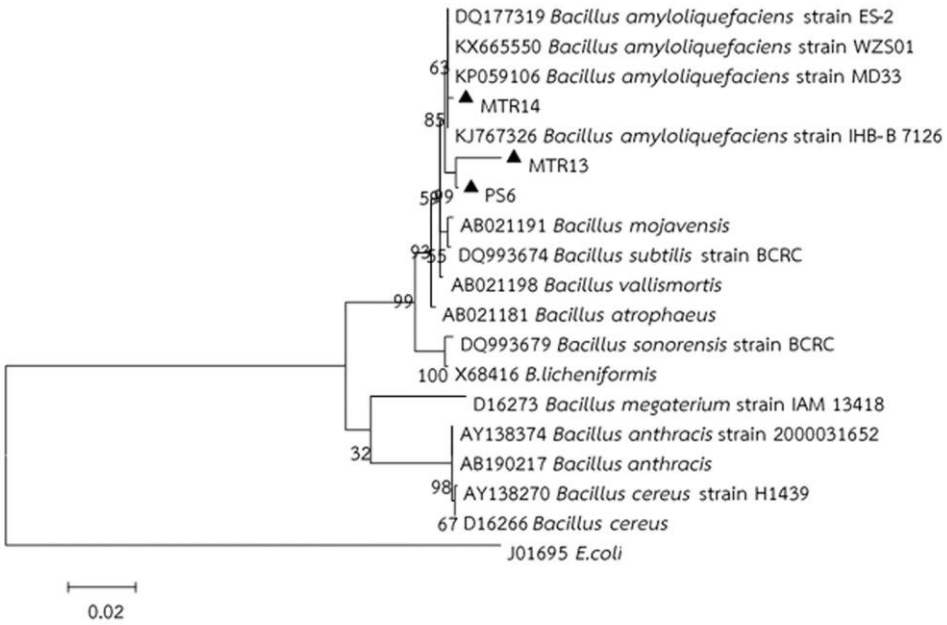

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of MTR13, MTR14 and PS6. Bootstrap values from 1000 replicates are included