

การควบคุมโรคไฟทอปธอราไบลท์ของพริกหวานโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

Control of Phytophthora Blight of Sweet Pepper by Antagonistic Bacteria

เกศริน สูญกาย^{1,2} และอังสนา อัครพิศาล¹

Kaesarin Soonkay^{1,2} and Angsana Akarapisan¹

¹สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

²ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนามันฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

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

²Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/ PERDO-CHE), Bangkok, Thailand 10400

E-mail: kaesarinn@hotmail.com

Abstract

Sweet pepper, *Capsicum annuum* L., has become an economic important greenhouse crop in Mae-rim district, Chiang Mai. Phytophthora blight of sweet pepper caused by the Oomycetes pathogen, *Phytophthora capsici* is one of the most important devastating diseases. Plants infected with *P. capsici* showed root rot, aerial blight of leaf and stem. Identification of the pathogen species was confirmed by molecular technique. The selection of antagonistic bacteria for disease control, one hundred and eighty-three bacterial isolates were obtained from aerial part and rhizosphere of sweet pepper. The isolates were purified and *in vitro* assay against *Phytophthora capsici* by dual culture technique. Among the 183 isolates tested, 2 antagonistic bacteria; SPSB 27 and SPRB 20, showed the highest percentages of growth inhibition of the pathogen, 66.67 and 61.33%, respectively. Two antagonistic bacteria selected from the screen test with highest growth inhibition of *P. capsici* were identified by using morphological and biochemical characteristics. The results revealed that the isolate SPSB 27 was *Pseudomonas* sp. while the isolate SPRB 20 was *Bacillus* sp. The identification of the isolates SPSB 27 and SPRB 20 using BiologTM Microlog System, Release 4.2 revealed that the isolate SPSB 27 was *Pseudomonas aeruginosa* and the isolate SPRB 20 was *Bacillus amyloliquefaciens*. Therefore, further study on evaluation of antagonistic bacteria ability in greenhouse experiment will be conducted.

Keywords: Phytophthora blight, sweet pepper, *Phytophthora capsici*, antagonistic bacteria

บทคัดย่อ

พริกหวานเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการเพาะปลูกในสภาพโรงเรือนในพื้นที่อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ปัญหาสำคัญที่พบ คือ โรคไฟทอปธอรา

ไบลท์ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* เป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่การผลิต โดยพริกหวานที่เกิดโรคจะมีหลายลักษณะอาการ เช่น รากเน่า ใบและลำต้นไหม้ ซึ่งเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้ทำการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็น *Phytophthora capsici* โดยใช้เทคนิค

ทางชีวโมเลกุลพร้อมทั้งหาวิธีควบคุมด้วยชีววิธี ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ ของพริกหวานได้จำนวน 183 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* ด้วยวิธี Dual culture technique พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ SPSB 27 และ SPRB 20 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุสูงสุดเป็น 66.67 และ 61.33% ตามลำดับ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท SPSB 27 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Pseudomonas* sp. ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. ซึ่งจากการจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลทโดยใช้เครื่อง BiologTM Microlog System, Release 4.2 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 คือ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 คือ เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ทั้งนี้จะได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมในสภาพโรงเรือนต่อไป

คำสำคัญ: โรคไฟทอปธอราไบลท์ พริกหวาน
Phytophthora capsici แบคทีเรียปฏิปักษ์

คำนำ

พริกหวาน (*Capsicum annuum*) เป็นพืชที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคในหลายประเทศ และมีแนวโน้มการส่งออกขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ข่าวประชาสัมพันธ์ กรมวิชาการเกษตร, 2550) ปัจจุบันพบปัญหาเรื่องโรคและแมลงในการผลิตพริกหวานเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะโรคไฟทอปธอราไบลท์ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* Leonian ซึ่งเชื้อที่สำคัญและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Hausbeck and Lamour, 2004) การป้องกันกำจัดโรคมียังมีหลายวิธีรวมถึงการใช้สารเคมี ซึ่ง

หากใช้ในปริมาณมากเกินไปเกิดความจำเป็นอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การเกษตรในปัจจุบันได้ให้ความสำคัญในเรื่องการเกษตรแบบยั่งยืนและการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี โดยการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคและเป็น plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) ที่มีอยู่ทั่วไปตามบริเวณผิวพืช ส่วนเหนือดิน บริเวณราก และดินรอบราก มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ ของพริกหวานที่มีแนวโน้มในการควบคุมโรค

การแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอราไบลท์ของพริกหวาน เก็บตัวอย่างพริกหวานที่แสดงอาการของโรคไฟทอปธอราไบลท์ จากโรงเรือนเพาะปลูกของเกษตรกรบ้านม่วงคำ ตำบลโป่งแยง อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อโดยวิธีการ moist chamber, hyphal tip culture และ bating technique โดยใช้แครอท ผลพริกหวาน และใบสับปะรดเป็นเหยื่อล่อ พร้อมทั้งทำการพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch's postulation และทำการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora capsici* โดยใช้เทคนิค PCR (Soonkay and Akarapisan, 2008)

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ จากต้นพริกหวาน ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวและการแยกเชื้อตามวิธีการของ Hu *et al.*, 2008 และ Shimizu *et al.*, 2000

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* ในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ ด้วยวิธี dual culture และคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Tronsmo, 1992)

2. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา ศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีบางประการเปรียบเทียบกับคู่มือ Bergey's Manual of Determination Bacteriology 9th ed. (Holt *et al.*, 1994) พร้อมทั้งจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยเครื่อง BiologTM Microlog System, Release 4.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอราใบลัทของพริกหวานจากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค (Figure 1) การพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch's postulation และการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora capsici* โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลท คือ *P. capsici* ทำให้เกิดโรคกับใบพริกหวานทั้งหมด (ร้อยละ 100) หลังการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc นาน 3 วัน (Figure 2-5) สำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ ของพริกหวาน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 183 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบจำนวน พบว่าส่วนใหญ่แยกได้จากใบทั้งหมด 87 ไอโซเลท ลำต้น 50

ไอโซเลท ราก 24 ไอโซเลท และวัสดุปลูก 22 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *P. capsici* ไอโซเลท SP01 ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 และ SPRB20 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุสูงสุดร้อยละ 66.67 และ 61.33 ตามลำดับ (Figure 6) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดด้วยเครื่อง BiologTM Microlog System, Release 4.2 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 คือ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสอดคล้องกับผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 คือ เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* (Figure 7) ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากบริเวณผิวรากพริกหวาน เช่นเดียวกับ Lee *et al.* (2007) รายงานว่า *B. amyloliquefaciens* strain LP03 ซึ่งแยกได้จากดินที่ปลูกพืช พบว่า มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ fengycin, iturin และ surfactin ใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินได้เป็นอย่างดี (Yu *et al.*, 2002)



Figure 1 Phytophthora stem rot and leaf blight of sweet pepper (circle)

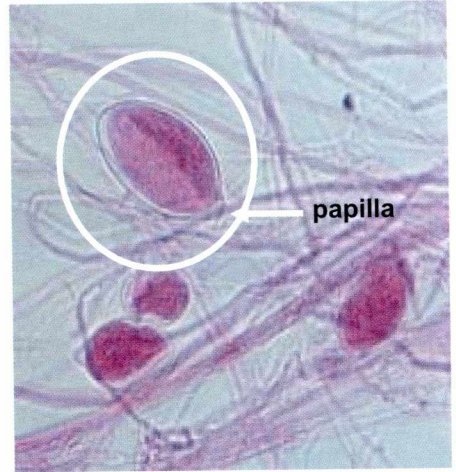


Figure 2 Lemon-shaped sporangia with papilla (arrow) of *P. capsici*



Figure 3 Artificial infected symptom caused by mycelial disc inoculation

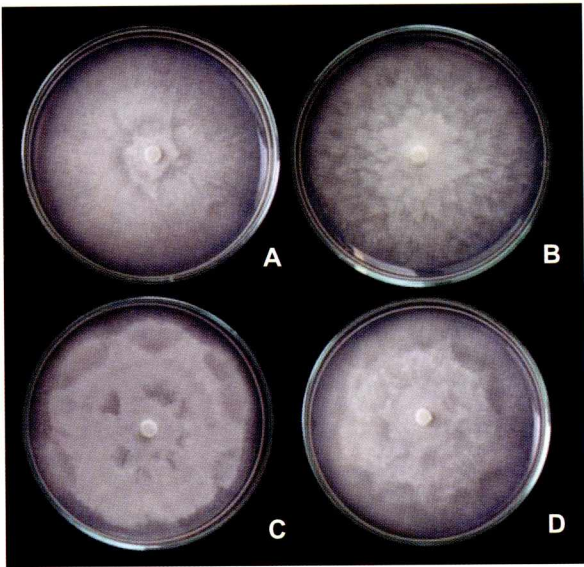


Figure 4 Colony types of *P. capsici* isolated from sweet pepper on PDA after 9 days incubation
(A) Isolate SP01 with slightly stellate pattern; (B) Isolate SP02 with rosette pattern;
(C) Isolate SP03 with slightly stellate pattern; (D) Isolate SP04 with slightly petallate pattern

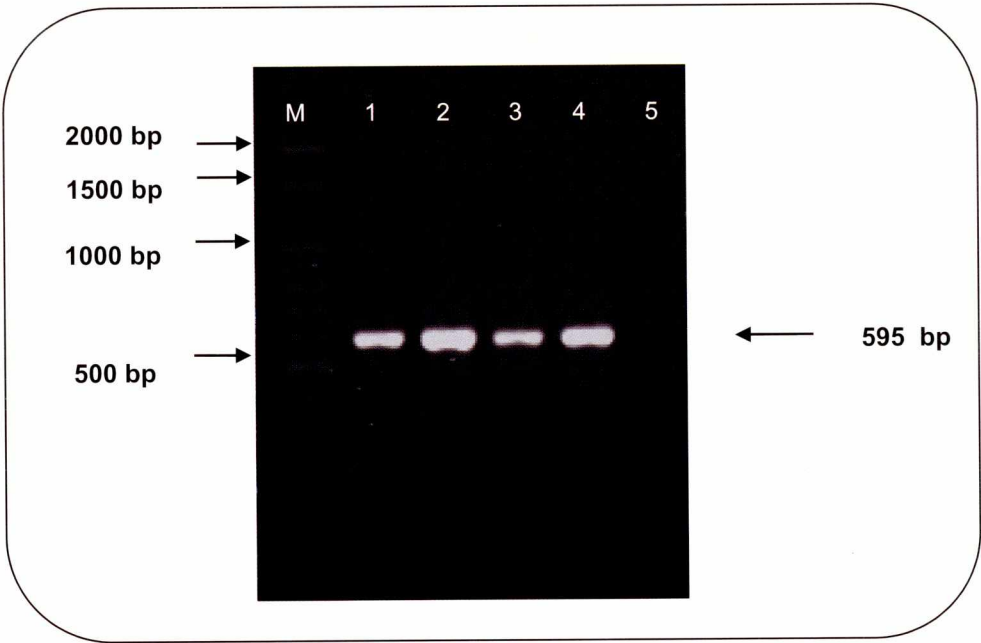


Figure 5 Amplification of *P. capsici* isolates using specific primers CAPFW/CAPRV2 after electrophoresis on 1% agarose gel
M: 100 bp marker; lane 1: isolate SP01; lane 2: isolate SP02; lane 3: isolate SP03;
lane 4: isolate SP04; lane 5: H₂O (negative control)



Figure 6 Dual culture test of antagonistic bacteria isolates SPSB 27 and SPRB 20 against *P. capsici* SP01 on PDA

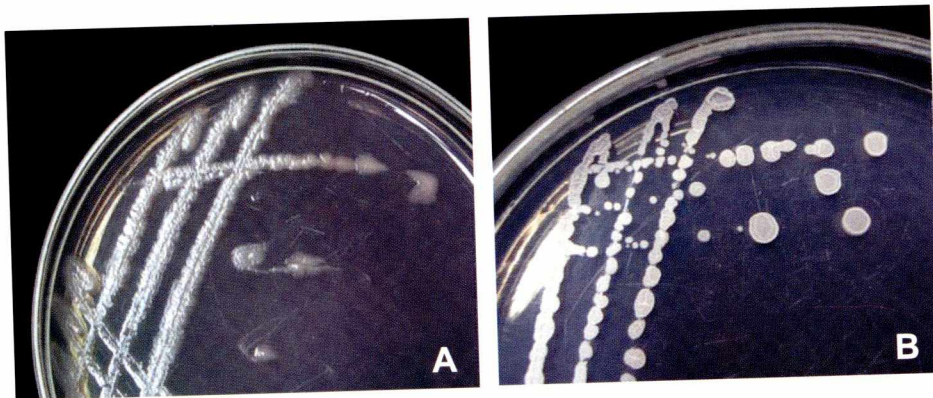


Figure 7 Colony of antagonistic bacteria SPSB 27 (A) and SPRB 20 (B) on NA

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกได้ทั้งหมด 183 ไอโซเลท จากส่วนต่างๆ ของพริกหวานเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *P. capsici* สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบไหม้ในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 2 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ จากการศึกษาในเบื้องต้นนี้ สามารถนำข้อมูลที่ได้นำไปใช้เป็นแนวทางพัฒนารูปแบบที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะเพื่อนำไปสู่การลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดในสภาพโรงเรือนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ใน “โครงการการพัฒนาระบบการปลูกพริกหวานในโรงเรือนเพื่อให้ได้ผลผลิตคุณภาพสูงและปลอดภัย” และศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ข่าวประชาสัมพันธ์ กรมวิชาการเกษตร. 2550. **พริกหวาน**.
จาก <http://www.moac.go.th/builder/moac/information/view-index> [10 กรกฎาคม 2551].
- Hausbeck, M.K. and K.H. Lamour. 2004.
Phytophthora capsici on vegetable crops:
research progress and management
challenges. **Plant Disease**. 88: 1292-1303.
- Holt, J.G., N.R. Kring, P.H.A. Sneath, J.T. Staley
and S.T. Williams. 1994. **Bergey's
Manual of Determination Bacteriology**.
9th ed. The Williams and Wilkins Co.,
Baltimore. 787 p.
- Hu, Q.P., J.G. Xu, P. Song, J.N. Song and W.L.
Chen. 2008. Isolation and identification of
a potential biocontrol agent *Bacillus
subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in
China. **World J. Microbiol Biotechnol**.
24: 2451-2458.
- Lee, S.C., S.H. Kim, I.H. Park, S.Y. Chung and
Y.L. Choi. 2007. Isolation and structural
analysis of bamylocin A, novel lipopeptide
from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03
having antagonistic and crude oil-
emulsifying activity. **Arch. Microbiol**.
188: 307-312.
- Shimizu, M., Y. Nakagawa, T. Furumai,
Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and
H. Kunoh. 2000. Studies on endophytic
actinomycetes (I) *Streptomyces* sp.
rhododendron and its antifungal activity.
Journal of Plant Pathology. 66: 360-369.
- Soonkay, K. and A. Akarapisan, 2008.
Phytophthora blight of sweet pepper in
Mae-rim district, Chiang Mai.
**Proceedings of The Third Annual
Meeting of Thai Mycological
Association (TMA) and Mycology
Conference in Thailand**. October 11,
2008, Khon Kaen. 96 p.