คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

Screening of Antagonistic Bacteria with Potential for Biological Control of Soft Rot Bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi* in Orchids

บุษราคัม อุดมศักดิ์[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[2/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/]
สุรีย์พร บัวอาจ[1/] รุ่งนภา คงสุวรรณ์[1/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) ที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรครวดเร็วที่สุด พบว่า เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3, EcK4, PA255, EcK1, EcK2, และ EcK5 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้แก่ ไอโซเลท PA334, PA392, PA283, EhK2, PA521, และ EhK1 ซึ่งมีความรุนแรงของโรค อยู่ในระดับ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ และ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3 และ Ech ไอโซเลท PA334 เป็นตัวแทนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จาก culture collections จำนวน 58 ไอโซเลท และที่แยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณผิวใบ จากสวนเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 12 ไอโซเลท โดยทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยวิธี Paper disc diffusion พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 19 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.22-1.45 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech มากกว่าหนึ่งไอโซเลท ที่มีระดับความรุนแรงรองลงมาในการก่อให้เกิดโรค ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK4, PA255, EcK1, EcK2, และ EcK5 และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA392, PA283, EhK2, PA521, และ EhK1 เพื่อให้เกิดความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธุ์ คือ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.2-1.0 มิลลิเมตร จากนั้นทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-03-54

เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผล พบว่า การปลูกเชื้อโดยการทำแผลเป็นวิธีปลูกเชื้อดีที่สุด และอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคเหมาะสมที่สุด คือที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 cfu/ml ซึ่งมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเร็วที่สุดภายในเวลา 12 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วนไอโซเลต 17W18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า cell suspension ความเข้มข้นที่ 10^8 คือ อัตราที่เหมาะสม โดยก่อนและหลังการปลูกเชื้อด้วย cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ จากผลการพ่นด้วย cell suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BK12 มีประสิทธิภาพดีที่สุด ในควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผลเพียง 2.85 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ecc เพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ย 3.14 เซนติเมตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK5 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผล 0.28 เซนติเมตร แตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ech เพียงอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 1.78 เซนติเมตร

คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด ซึ่งมีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ลักษณะทั่วไปมีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ลักษณะของดอกกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างจะมีขนาดยาวพอๆ กัน โดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรจะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544)

กล้วยไม้สกุลหวาย จัดเป็นไม้ดอกที่มีสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะนอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันการปลูกกล้วยไม้มักประสบปัญหาด้านโรคพืชและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิตของกล้วยไม้ลดลง และไม่ได้มาตรฐาน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จากการสำรวจโรคที่สำคัญของกล้วยไม้ พบว่าโรคเน่าเละจัดเป็นโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกร เนื่องจากหากเกิดปัญหาการระบาดแล้ว จะทำให้ต้นเน่าตายเสียหายในเวลาอันรวดเร็ว ก่อให้เกิดอาการใบเน่า ต้นเน่า ใบเน่าพอง จากการจำแนกเชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* โดยพบการระบาดทำความเสียหายในกล้วยไม้สกุลการค้าหลายสกุล ที่สำคัญได้แก่ หวาย แวนดา ช้าง และออนซิเดียม (ปิยรัตน์ และจงวัฒนา, 2551)

จากรายงานยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าเละได้ Uchida (2006) ได้รายงานว่า โรคเน่าเละเป็นสาเหตุหลักที่สร้างความเสียหายให้กับการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายของฮาวาย การควบคุมโรคด้วยสารประกอบคอปเปอร์ มักพบปัญหาของการแพ้สารเคมี ส่วนการใช้สารปฏิชีวนะ ทำให้เชื้อสาเหตุเกิดการดื้อยาได้ง่าย ปัจจุบันทั้งต่างประเทศและในประเทศ ได้

ศึกษาค้นคว้าหาชีวภัณฑ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีวิธี เช่น Aysan et al. (2003) ได้ศึกษาการควบคุมโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanehemi* ของมะเขือเทศ โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกจากบริเวณผิวรากของมะเขือเทศ ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้สูงถึง 74% นอกจากนั้นยังมีรายงานการควบคุมโรคเน่าเละโดยชีววิธีในไม้ดอกไม้ประดับและพืชอีกหลายชนิด เช่น ลิลลี่ และมันฝรั่ง โดยใช้แบคทีเรีย *Erwinia herbicola* Ech252 (Vanneste, 2009) ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี นับว่าเป็นแนวทางในการควบคุมโรคที่ปลูกภายในโรงเรือน ซึ่งเป็นการควบคุมโรคอย่างยั่งยืน และลดปัญหาการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) และ Nutrient glucose agar (NGA)
2. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections จำนวน 58 ไอโซเลท และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ จำนวน 12 ไอโซเลท
3. เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections อย่างละ 5 ไอโซเลท และที่แยกเชื้อแบคทีเรีย จากสวนกล้วยไม้สกุลหวาย Ecc จำนวน 6 ไอโซเลท และ Ech จำนวน 10 ไอโซเลท
4. ต้นกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) อายุ 10-12 เดือน
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ, ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง, หม้อนึ่งความดัน, ตู้ควบคุมอุณหภูมิ, ตู้อบ (oven) และอุปกรณ์เครื่องแก้ว เป็นต้น
6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. สารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)

วิธีการ

1. การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (ณัฏฐิมา และคณะ, 2551) นำมาแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดบนอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

1.2 แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเลือกตัวอย่างต้นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตดี แข็งแรง และปลอดโรค ด้วยวิธี tissue transplanting method โดยตัดส่วนของบริเวณที่จะแยกเชื้อ (ราก หรือใบ) ออกเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แช่ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืช วางบนอาหารสังเคราะห์ PSA สำหรับการแยกเชื้อที่เจริญในลำต้นและใบ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้งด้วยกระดาษ นำมาสับหรือบดในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-5 นาที ใช้ลูปที่ลนไฟฆ่าเชื้อ จุ่มในน้ำบดตัวอย่างมาลาก (streak) บนอาหารสังเคราะห์

PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ และเป็นแกรมบวก นำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PSA ให้รหัส และเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การรวมรวม และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

2.1 นำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่แยกและเก็บเชื้อได้ในกล้วยไม้ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 58 ไอโซเลท เก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดบนอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2 แยกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech บนกล้วยไม้สกุลหวาย จากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม โดยเลือกใบและลำต้นต้นที่เป็นโรค (รูปที่ 1และ 2) ตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณแผลเชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่เป็นโรค ขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1-2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชวางบนหยดน้ำ 50 ไมโครลิตร ตัดหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วใช้ลูปแตะตรงบริเวณแผลที่แสดงอาการเน่าเละนำมา streak บนอาหารสังเคราะห์ NGA หลังจากนั้นบ่มที่เชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหาร NGA ให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NGA slant เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อการศึกษาต่อไป

รูปที่ 1 ลักษณะอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย จากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการแผลช้ำ ต่อมาใบเริ่มเน่าเละ ลักษณะใบเน่าเป็นเหลืองออกน้ำตาล และกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง

รูปที่ 2 ลักษณะอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย จากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละ และแยกจากผิวใบ ทำให้ผิวใบพอง บวมน้ำและเริ่มเน่า ลักษณะใบเน่าเป็นสีเขียวและกลิ่นไม่เหม็นฉุน

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ Ecc และ Ech ที่รวบรวมได้ เลี้ยงบนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ (cell suspension) โดยให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร; cfu/ml) ที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร จากนั้นใช้หลอดฉีดยาแบบพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อดูด cell suspension ของเชื้อ Ecc และ Ech ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ ไล่ฟองอากาศออก แล้วฉีด cell suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เข้าสู่เนื้อใบด้านบนของกล้วยไม้สกุลหวาย อายุ 12 เดือน อย่างช้า ๆ เก็บต้นกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อ ในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น โดยระวังไม่ให้น้ำหรือถุงพลาสติกโดนแผลที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech (รูปที่ 3) บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาการเกิดโรค การพัฒนาอาการ และประเมินความรุนแรงของโรคที่ปรากฏหลังปลูกเชื้อเป็นระยะ 24 และ 48 ชั่วโมง ดัดแปลงตามวิธีของ ศศิธร (2547) โดยวัดระดับความรุนแรงของโรค 0 ถึง 4 โดยที่ 0 คือไม่ปรากฏอาการของโรค และระดับ 1 2 3 และ 4 หมายถึงแสดงอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้รุนแรง เท่ากับ 1-25, 26-50, 51-75 และ 76-100 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ใบทั้งหมดของกล้วยไม้ตามลำดับ เมื่อกล้วยไม้แสดงอาการเป็นโรค ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (reisolation) ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร NGA โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว และนำมาปลูกเชื้อลงบนกล้วยไม้ต้นใหม่ (reinoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา streak บนอาหาร NGA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 3 ลักษณะการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ

4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* 1 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ

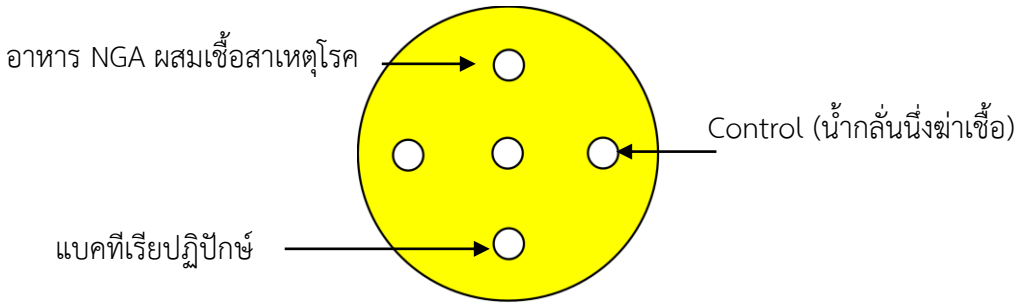
4.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections จำนวน 58 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณผิวใบ ในสวนของเกษตรกรที่จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 12 ไอโซเลท รวม 70 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 cfu/ml)

4.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็วและมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดลำดับที่ 1 อย่างละ 1 ไอโซเลท เป็นตัวแทนในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เพื่อเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูง เลี้ยงบนอาหารเหลว NGB เขย่า 150 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 จากนั้นใช้วิธี double layer culture โดยชั้นล่างเทอาหาร NGA รองพื้นไว้บางๆ ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ใช้ micropipette ดูด cell suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค Ecc และ Ech ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1มิลลิลิตร (มล.) ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มล. ผสมให้เข้ากันกัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มล. ต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ ให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่างที่เทไว้แล้วข้างต้น ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี disc diffusion method

โดยใช้ micropipette ดูด cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ (ข้อ 4.1) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มล. ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ข้างต้น 4 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 4)

การบันทึกผล ตรวจผลหลังการทดสอบ 24, 48, 72 โดยการวัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส



รูปที่ 4 แสดงการวางกระดาษกรอง โดยวางกระดาษกรองทหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7 ไมโครลิตร 4 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* 5 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ

5.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น เลี้ยงบนอาหารเหลว NGB บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2

5.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงและรวดเร็ว ลำดับที่ 2-6 ระดับ อย่างละ 5 ไอโซเลท มาใช้ในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เนื่องจากในสภาพสวนกล้วยไม้ของเกษตรกรล้วนมีเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละมากกว่าหนึ่งไอโซเลท ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้มากกว่าหนึ่งไอโซเลท โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech เลี้ยงบนอาหารเหลว NGB เขย่า 150 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เทคนิคการเตรียมด้วยวิธี double layer culture และทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech ด้วยวิธี disc diffusion method เช่นเดียวกับ (ข้อ 4.3)

การบันทึกผล ตรวจผลโดยวัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส หลังการทดสอบ 24, 48, 72 ชั่วโมง

6. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค และวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรง และรวดเร็วที่สุดอย่างละ 1 ไอโซเลท มาบนอาหาร NGB บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 cfu/ml นำไปทดสอบวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum (300-600 mesh) ลงไปในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial suspension) เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension

การทดสอบอัตราความเข้มข้น และวิธีการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 14 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 6 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 7 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 8 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 9 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 10 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 11 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray
กรรมวิธีที่ 12 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject
กรรมวิธีที่ 13 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)
กรรมวิธีที่ 14 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่มีอัตราความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 cfu/ml มาทดสอบหาอัตราความเข้มข้น และวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม ด้วยวิธีการพ่น (spray) และการฉีด (inject) โดยทดสอบบนใบของกล้วยไม้สกุลหวาย

การบันทึกข้อผล check การเกิดโรคทุกๆ 7 วัน โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

7. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งจำลองให้มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกร โดยทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ อย่างน้อย 5 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^9 cfu/ml โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ โดยนำแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 ตามผลที่ทดสอบได้

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์กับพืชทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท A
กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท B
กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท C
กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท D
กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท E
กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)
กรรมวิธีที่ 7 น้ำเปล่า (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

ก่อนและหลังนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ข้างต้น ฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณใบของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเครื่องพ่นมือ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยวิธีการปลูกเชื้อตามผลการทดสอบที่ได้ ทดสอบบนใบของกล้วยไม้สกุลหวาย

การบันทึกผล check การเกิดโรคทุกๆ 7 วัน โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

8. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากข้างต้นที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ทั้ง 2 ชนิด อย่างน้อย 3 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8, 10^{10} และ 10^{12} cfu/ml เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ นำเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* มาเลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีอัตราความเข้มข้น ตามผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคดังข้างต้น

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ โดยนำแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 ตามผลที่ทดสอบได้

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์กับพืชทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท A ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml
กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท A ที่อัตราความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท A ที่อัตราความเข้มข้น 10^{12} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท B ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml
กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท B ที่อัตราความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml

กรรมวิธีที่ 6 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท B ที่อัตราความเข้มข้น 10^{12} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 7 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท C ที่อัตราความเข้มข้น 10^{8} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 8 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท Cที่อัตราความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 9 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท C ที่อัตราความเข้มข้น 10^{12} cfu/ml
กรรมวิธีที่ 10 พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)
กรรมวิธีที่ 11 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)
กรรมวิธีที่ 12 น้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

ก่อนและหลังนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ข้างต้น ฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณใบของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเครื่องพ่นมือ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยวิธีการปลูกเชื้อตามผลการทดสอบที่ได้ ทดสอบบนใบของกล้วยไม้สกุลหวาย

เวลาและสถานที่

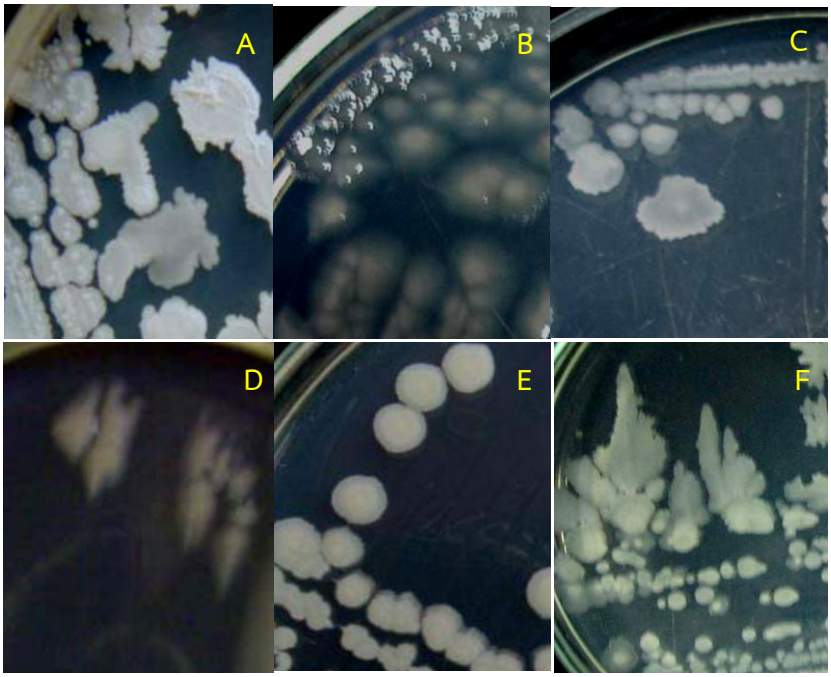
ระยะเวลา 4 ปี **เริ่ม** ตุลาคม 2553 **สิ้นสุด** กันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections ได้จำนวน 58 ไอโซเลท และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ได้อีก 12 ไอโซเลท รวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 70 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ได้มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ลักษณะทั่วไปของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A: สีขาว ด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก

B: สีขาว ด้าน ตรงกลางนูน ขอบหยัก

C: สีเหลืองอ่อน กลม ตรงกลางยุบ ขอบเรียบ

D: สีเหลืองน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน ผิวขรุขระเล็กน้อย ขอบหยัก

E: สีขาว ด้าน กลมแบน ขอบเรียบ

F: สีเหลืองคล้ายนมข้น มัน นูน ขอบเรียบ

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
1	ดินรากกล้วย
2	ดินคลองหลวง2
3	ดินชุมแพ
4	ดินเลน
5	อ้อย 4
6	อ้อย 6
7	ดินรากยาสูบ 4
8	ปุ๋ยคอก
9	ดินปุ๋ยคอก
10	ดินรากยาสูบ 2
11	SA
12	4120
13	4415
14	19W17
15	8W14
16	13W5
17	19W43
18	13W7
19	19W36
20	7W14
21	19W2
22	16W3
23	19W6
24	16W5
25	19W34

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
26	9W14
27	19W14
28	19W41
29	19W1
30	19W13c
31	19W4
32	19W42
33	19W16
34	19W38
35	20W11
36	8W14
37	3G23
38	17G17
39	22W8
40	17W18
41	20W32
42	3G12
43	19W16
44	20W1
45	2G19
46	20W22
47	3G14
48	3G11
49	20W4
50	20W33

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
51	17G4
52	20W23
53	20W28
54	20W17
55	2G4
56	16W2
57	20W43
58	20W33
59	BK1
60	BK2
61	BK3
62	BK4
63	BK5
64	BK6
65	BK7
66	BK8
67	BK9
68	BK10
69	BK11
70	BK12

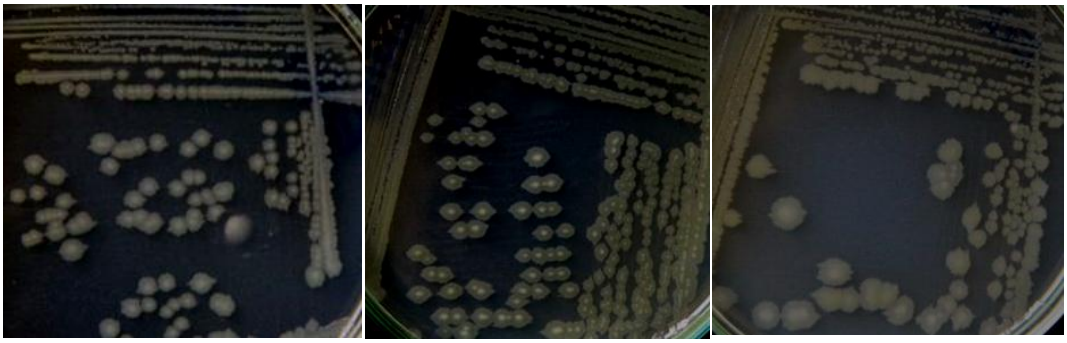
[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-58 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections
ลำดับที่ 59-70 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

2. การรวมรวม และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech อย่างละ 5 ไอโซเลท จาก culture collections โดยคัดเลือกได้จากกล้วยไม้สกุล แวนดา หวาย และช้าง และแยกได้จากสวนของเกษตรกรที่ปลูกกล้วยไม้สกุลหวาย จังหวัดกาญจนบุรี โดยแยกเชื้อแบคทีเรีย Ecc จำนวน 6 ไอโซเลท และ Ech จำนวน 10 ไอโซเลท รวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ จำนวน 26 ไอโซเลท

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จำแนกตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA คือกรณีเชื้อแบคทีเรีย Ecc โคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ เป็นมัน สีขาวขุ่น ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ สีเขียวขี้ม้า (รูปที่ 6 และ 7) เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) พบว่า สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi*

รูปที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia. carotovora* subsp. *carotovora* บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia. chrysanthemi* บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

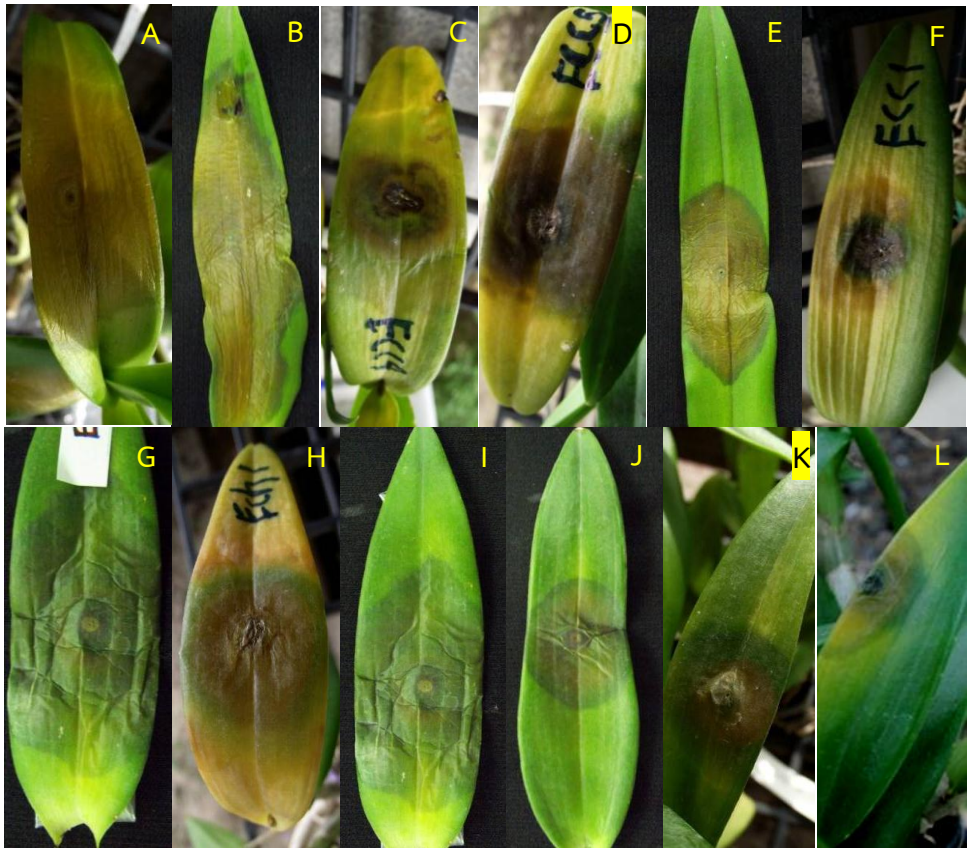
4. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้สกุลหวายที่แสดงอาการเน่าเละ ตามวิธีของ Koch's postulation โดยการฉีด cell suspension ของเชื้อแบคทีเรียบริเวณใบกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ทุกสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดอาการเน่าเละบนใบกล้วยไม้สกุลหวายได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย Ecc จะแสดงอาการแผลช้ำ ต่อมาใบเริ่มเน่าเละ ลักษณะใบเน่าเป็นสีเหลืองออกน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง (รูปที่ 8) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech จะแสดงอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละ และแยกจากผิวใบ ทำให้ผิวใบพอง บวมน้ำและเริ่มเน่า ลักษณะใบเน่าเป็นสีเขียว กลิ่นไม่เหม็นฉุน (รูปที่ 9) จากนั้นนำมาแยกเชื้อบนอาหาร NGA เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธี Koch's postulation พบลักษณะโคโลนีของเชื้อเป็นแบบเดียวกับที่นำไปปลูกเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 26 ไอโซเลทนั้น เป็นสาเหตุโรคจริง

เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวายหลังทำการปลูกเชื้อที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรีย Ecc และ Ech แต่ละไอโซเลทก่อให้เกิดอาการรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ดังนี้ เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3, EcK4, PA255, EcK1, EcK2 และ EcK5 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA334, PA392, PA283, EhK2, PA521 และ EhK1 มีความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ (รูปที่ 10 และตารางที่ 2) จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลท EcK3 และ PA334 ตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุด โดยมีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4 เป็นตัวแทนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จากที่ได้รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงนำไอโซเลท EcK4, PA255, EcK1, EcK2, EcK5 PA392, PA283, EhK2, PA521 และ EhK1 ซึ่งมีความรุนแรงรองลงมา ทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพสูงอีกครั้ง เพื่อยืนยันถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกว่าสามารถควบคุมเชื้อ Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มักพบในแปลงเกษตรกร

รูปที่ 8 โรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* บนกล้วยไม้สกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่าเป็นสีเหลืองออกน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 9 โรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* บนกล้วยไม้สกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละแยกจากผิวใบ พบอาการผิวใบพอง หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 10 ความรุนแรงอาการของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; A-F และ *E. chrysanthemi*; G-L ที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย หลังทำการปลูกเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

A: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK3 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4
B: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK4 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3
C: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท PA255 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3
D: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK1 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2
E: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK2 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2
F: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK5 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2
G: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA334 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4
H: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA392 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3
I: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA283 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3
J: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท EhK2 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2
K: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA521 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2
L: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท EhK1 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงอาการของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวายหลังทำการปลูกเชื้อที่ 24 ชั่วโมง

แหล่งที่มา[1/]	*E. carotovora* subsp. *carotovora*		*E. chrysanthemi*	
	ไอโซเลท	[2/]ระดับความรุนแรง	ไอโซเลท	[2/]ระดับความรุนแรง
culture collections	PA246	1	PA283	3
	PA249	1	**PA334**	**4**
	PA250	1	PA392	3
	PA251	1	PA521	2
	PA255	3	PA523	1
แยกเก็บบริเวณผิวใบ	EcK1	2	EhK1	2
	EcK2	2	EhK2	2
	EcK3	**4**	Ehk3	1
	EcK4	3	EhK4	1
	EcK5	2	EhK5	1
	Eck6	1	EhK6	1
			EhK7	1
			EhK8	1
			EhK9	1
			EhK10	1
รวม	Ecc 11 โซเลต		Ech 15 ไอโซเลท	

[1/] แหล่งที่มา: culture collections = ศูนย์เก็บเชื้อ culture collections, แยกเก็บบริเวณผิวใบ = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

[2/] ระดับความรุนแรงของโรค 0 ถึง 4 โดยที่ ระดับ 0 คือไม่ปรากฏอาการของโรค

ระดับ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึง แสดงอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้รุนแรง เท่ากับ 1-25, 26-50, 51-75 และ 76-100 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ใบทั้งหมดของกล้วยไม้ ตามลำดับ

4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3 และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA334 ที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุด เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เพื่อเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ด้วยวิธี disc diffusion method พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 19 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ ทั้งใน Ecc และ Ech โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.22-1.45 มิลลิเมตร (มม.) (ตารางที่ 3)

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

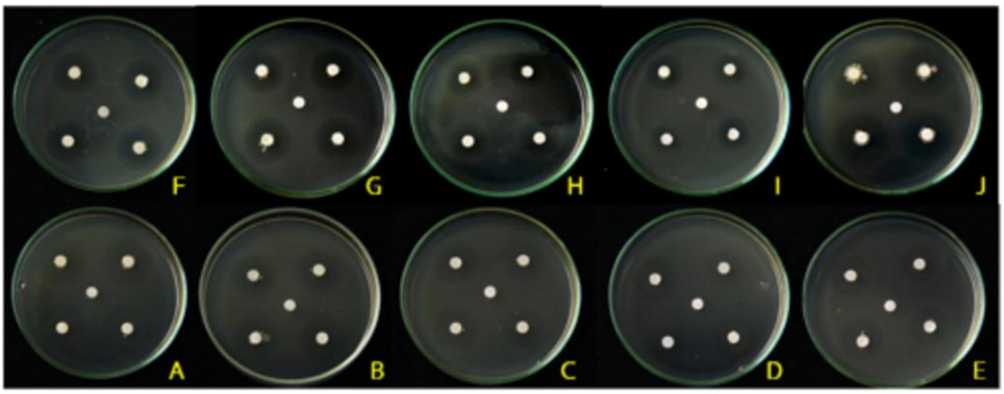
ผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech มากกว่าหนึ่งไอโซเลท โดยเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระดับที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูง และมีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็วรองลงมา อย่างละ 5 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK4, PA255, EcK1, EcK2, และ EcK5 และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA392, PA283, EhK2, PA521, และ EhK1 เพื่อทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.2-1.0 มม. (รูปที่ 11 และตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 3 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK3 และ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA334 โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 19 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับที่	ไอโซเลทแบคทีเรีย[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]	
		Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (EcK3)	*Erwinia chrysanthemi* (PA334)
1	**BK2**	**0.8**	**1.0**
2	BK3	0.4	0.7
3	**BK5**	**0.82**	**0.83**
4	BK6	0.5	0.54
5	BK7	0.31	0.65
6	BK8	0.45	1.08
7	**BK9**	**0.65**	**1.0**
8	BK10	0.36	0.5
9	**BK12**	**0.7**	**1.0**
10	20W28	0.34	0.45
11	**17W18**	**0.54**	**0.7**
12	8W14	0.45	0.25
13	2G4	0.42	1.45
14	19W13	0.4	0.46
15	3G14	0.36	0.28
16	20W22	0.45	0.32
17	20W1	0.47	0.56
18	20W17	0.46	0.22
19	20W23	0.5	0.44

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-9 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 10-19 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส



รูปที่ 11 บริเวณวงใส (clear zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

(A) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*
(B) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*
(C) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*
(D) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*
(E) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*
(F) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*
(G) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*
(H) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*
(I) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*
(J) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*

ตารางที่ 4 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับ	ไอโซเลท[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]					
		EcK3	EcK4	PA255	EcK1	EcK2	EcK5
1	BK2	0.8	0.3	0.35	0.4	0.39	0.3
2	BK5	0.82	0.41	0.42	0.52	0.48	0.41
3	BK9	0.65	0.32	0.35	0.34	0.53	0.24
4	BK12	0.7	0.35	0.3	0.24	0.39	0.5
5	17W18	0.54	0.21	0.34	0.2	0.32	0.2

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-4 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 5 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

ตารางที่ 5 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับ	ไอโซเลท[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]					
		PA334	PA392	EhK2	PA283	PA521	EhK1
1	BK2s	1.0	0.53	0.53	0.51	0.3	0.5
2	BK5s	0.83	0.48	0.3	0.3	0.4	0.4
3	BK9s	1.0	0.6	0.7	0.47	0.3	0.54
4	BK12s	1.0	0.3	0.32	0.2	0.31	1.0
5	17W18c	0.7	0.47	0.2	0.22	0.25	0.35

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-4 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 5 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

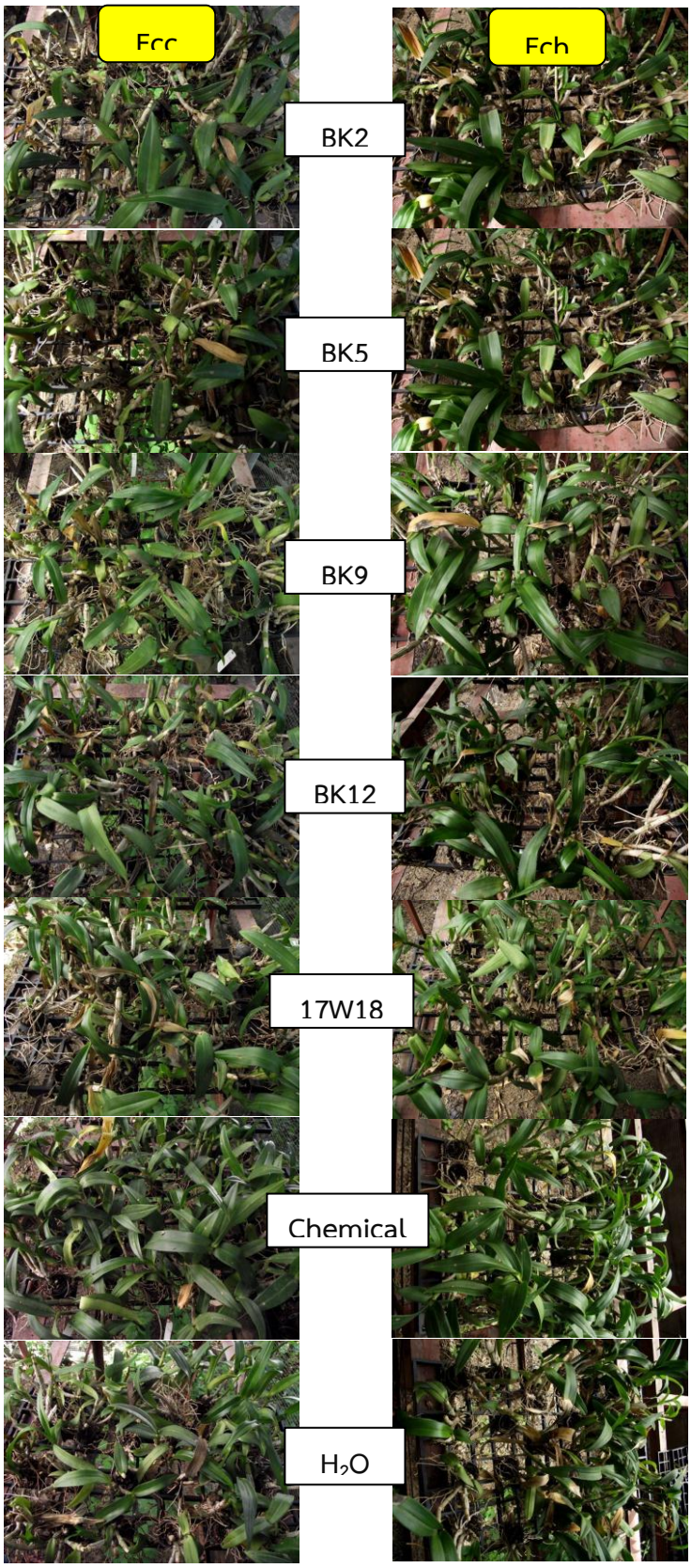
[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

6. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค และวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum (300-600 mesh) ลงไปในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial suspension) เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension พบว่า การปลูกเชื้อโดยการทำแผลเป็นวิธีปลูกเชื้อดีที่สุด เนื่องจากอัตราการเกิดโรคสม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากการปลูกเชื้อโดยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum เพราะอัตราการเกิดโรคไม่สม่ำเสมอ สำหรับผลการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค พบว่า ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 cfu/ml เชื้อแบคทีเรีย Ecc มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเร็วที่สุดภายในเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ Ech แสดงอาการเน่าเละภายในเวลา 24 ชั่วโมง ถือว่าความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml มีรุนแรงในการก่อโรคสูงเหมาะนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียโรคเน่าเละ

7. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วน ไอโซเลท 17W18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc (รูปที่ 12)

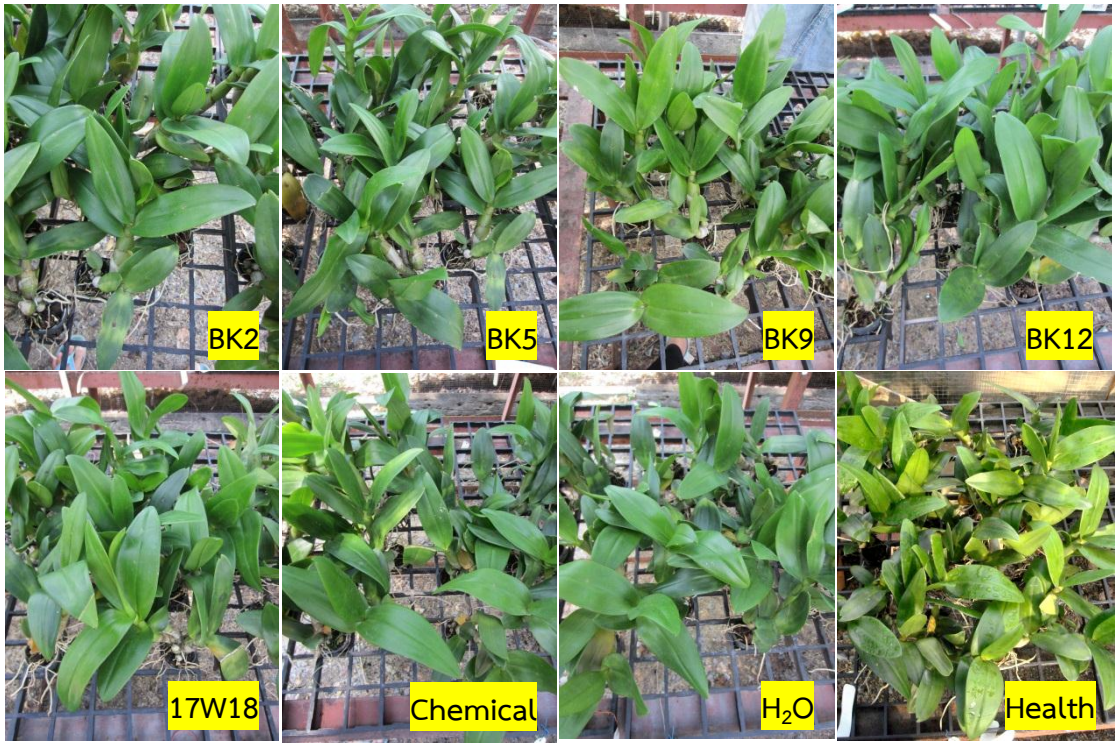


รูปที่ 12 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech)

8. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และระยะเวลาการพ่นบนกล้วยไม้สกุลหวาย

การทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลต พบว่า cell suspension ความเข้มข้นที่ 10^8 คือ อัตราที่เหมาะสม ส่วน cell suspension ที่ความเข้มข้น 10^{10} และ 10^{12} cfu/ml นั้น มีปริมาณเชื้อมากเกินไป ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยพ่นก่อนและหลังที่มีการปลูกเชื้อด้วย cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ บนต้นพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย และใช้สารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์) เป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ จากผลการพ่นด้วย cell suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 cfu/ml ด้วยวิธีทำแผลบนใบกล้วยไม้ จากนั้นบันทึกผลการทดสอบโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล และตรวจดูลักษณะอาการ systemic ของโรคบนต้นกล้วยไม้ หลังการปลูกเชื้อ พบว่า จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ BK2, BK5, BK9 BK12 และ 17W18 พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BK12 มีประสิทธิภาพในควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผลเพียง 2.85 cm ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ecc เพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ย 3.14 cm ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK5 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผล 0.28 cm แตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ech เพียงอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 1.78 cm (รูปที่ 13-14)

รูปที่ 13 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)



รูปที่ 14 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora chrysanthemi* (Ech)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 70 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้สกุลหวาย Ecc และ Ech ไอโซเลท EcK3 และ PA334 ตามลำดับ ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงสูงสุด พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 19 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทดังกล่าว และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech กับไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคเน่าเละรองลงมา พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 มีประสิทธิภาพสูงสุดและสามารถยับยั้งแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้ดีทุกไอโซเลท

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension พบว่า การปลูกเชื้อโดยการทำแผลเป็นวิธีปลูกเชื้อดีที่สุด และอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคเหมาะสมที่สุด คือที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 cfu/ml ซึ่งมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเร็วที่สุดภายในเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วน ไอโซเลท 17W18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ เมื่อ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า cell suspension ความเข้มข้นที่ 10^8 คือ อัตราที่เหมาะสม ก่อนและหลังที่มีการปลูกเชื้อด้วย cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ พบว่า จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ BK2, BK5, BK9 BK12 และ 17W18 พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BK12 มีประสิทธิภาพในควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผลเพียง 2.85 cm ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ecc เพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ย 3.14 cm ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK5 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการเกิดแผล 0.28 cm แตกต่างจากกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อด้วย Ech เพียงอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 1.78 cm แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมี จะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ก็เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในการทดสอบที่ไม่เอื้ออำนวย ทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ และอีกสาเหตุหนึ่ง เนื่องจากการทำแผลบนใบกล้วยไม้ ซึ่งเปิดทางให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้ง่าย ดังนั้น ประสิทธิภาพของเชื้อแบคที่เรียปฏิปักษ์จึงทำงานได้ไม่ดี ควรจัดการเกี่ยวกับสภาพโรงเรือนไม่ให้ร้อนจัดเกินไป

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการกล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วิภาดา ทองทักษิณ และสุธามาศ ณ น่าน. 2551. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. *ใน* รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 2049-2059.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. *ใน* รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1840-1856.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Erwinia carotovora* subap. *carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก. วิทยาสารกำแพงแสน 2: 72-81.

Aysan, Y., A. Karatas,. and O. Cinar. 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. Crop Protection V. 22 (6), 807-811.

Uchida Janice. 2006. Bacterial diseases of Dendrobium. Pest Management Guidelines. (online) Available.http://www.extent.hawaii.edu/kbase//reports/dendrobium_pest.htm (21 Aug 2010)

Vannests. J. 2009. Biological control of soft rot on calla lily and potatoes. HortNet. (online) Available.http://www.hortnet.co.nz.publications/science/jvann2.htm (21 Aug 2010)