การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของพริกโดยชีววิธี

Biological control of chili bacterial wilt

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1]
วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[3]

บทคัดย่อ

จากการนำแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา จำนวน 50 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี direct bioassay โดยทำ diffusion double layer technique พบแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกได้ 13 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินเลน , 11.SA, ดินชุมแพ, อ้อย 4, ดินคลองหลวง 9.2, ดินรากยาสูบ No.2, 4120, ปุ๋ยคอก, ดินรากกล้วย, ดินปุ๋ยคอก, ดินรากยาสูบ No. 4, อ้อย 6 และ 4415 จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 13 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 66.67 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2 และดินเลน สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นไม่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองได้ มีระดับการเป็นโรค 66.67 – 99.33 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบมีระดับการเป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 01-16-49-01-01-01-06-52

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[3/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่4

คำนำ

โรคเหี่ยว (Bacterial Wilt Disease) มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ชื่อเดิม *P*seudomonas *solanacearum* พบระบาดในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก ระบาดมากในเขตร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส และดินมีความชื้นสูง (ณัฏฐิมา, 2552) เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายพืชได้มากมายหลายชนิด ทั้งพืชเศรษฐกิจและวัชพืช เชื้ออาศัยอยู่ในดินและเศษซากพืชได้เป็นเวลานาน สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ และแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ เชื้อสาเหตุที่อยู่ในดินเข้าทำลายพืชบริเวณราก โดยเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติหรือบาดแผลที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ แมลง และไส้เดือนฝอย เป็นต้น (วนิดา, 2542)

ประเทศไทยพบโรคเหี่ยวระบาดและทำความเสียหายมากในพริกที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้เกิดปัญหาในการปลูกพริก เนื่องจากโรคเหี่ยวทำให้ต้นพริกเหี่ยวตาย เกษตรจึงเก็บผลผลิตไม่ได้เมื่อพริกเป็นโรคนี้ และในปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของพริกนั้นทำได้ค่อนข้างยาก ส่วนใหญ่จะเป็นการแนะนำให้หลีกเลี่ยงการปลูกพืชในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค หรือปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่เป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค แต่ในความเป็นจริงเกษตรกรไม่สามารถทำตามคำแนะนำได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านพื้นที่ปลูกซึ่งแต่ละครอบครัวมีพื้นที่ไม่มาก และการปลูกพืชอื่นในบางพื้นที่หาตลาดที่จะมารองรับผลผลิตได้ยาก นอกจากนี้ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคนี้ มีเพียงการแนะนำให้ใช้วิธีการเขตกรรมก่อนปลูกพริก ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อสาเหตุในดินโดยการอบดินด้วยยูเรีย อัตรา 80 กิโลกรัม ผสมกับ ปูนขาวอัตรา 800 กิโลกรัมต่อพื้นที่ 1 ไร่ โดยอบทิ้งไว้ 2-3 สัปดาห์ (ณัฏฐิมา, 2552) แต่วิธีการนี้เป็นการฆ่าเชื้อในดินก่อนปลูกเท่านั้น ไม่สามารถป้องกันกำจัดโรคในระหว่างที่พริกเจริญเติบโตได้ จึงได้หาวิธีการที่จะควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในระหว่างการปลูกพริกโดยจะนำมาใช้ร่วมกับการเขตกรรม วิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดคือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. J3, *Bacillus* spp. BB11 และ FH 17 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพริกได้ (Guo et al., 2002) Aino et al., (1998) พบว่า endophytic pseudomonas FPT และ FPH มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ Ciampi et al., (1998) รายงานว่าการใช้สารสกัดจาก *Bacillus subtilis* ไอโซเลท A47 และ *Pseudomonas fluorescens* BC8 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพไร่ได้ Sanaina et al. (1997) ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* บริเวณรากควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ 24-83 %

ในการทดลองนี้จึงได้นำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยาเก็บรวบรวมไว้ จำนวน 50 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวคือ *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายพริก โดยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป เพื่อให้ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกที่มีประสิทธิภาพ และสามารถแนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรคนี้ได้

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองนี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยการนำ *B. subtilis* ที่เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยาจำนวน 50 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum*

นำแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพริกที่เป็นโรคเหี่ยวในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 มาเลี้ยงบนอาหารเอียง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำสารละลายแบคทีเรียโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำ double layer ลงบนอาหาร PSA โดยนำหลอดอาหาร PSA ปริมาตร 7 มิลลิลิตร หลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมด้วยสารละลายแบคทีเรีย 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เอียงจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้อาหาร PSA ที่ผสมสารละลายแบคทีเรียกระจายคลุมทั่วผิวหน้าอาหาร PSA ชั้นล่างที่เทไว้แล้ว เมื่ออาหารแข็งตัว เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง

1.2 การเตรียมแบคทีเรีย *B. subtilis*

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยาจำนวน 50 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง (optical density) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี / มิลลิลิตร

1.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum*

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากพริกจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้ micropipette หยดสารละลายของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองแผ่นกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษวางบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

R. solanacearum โดยการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของแบคทีเรียถึงขอบบริเวณใส

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ในโรงเรือนทดลอง

การทดลองนี้เป็นการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลอง

2.1 การเตรียมดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum*

เตรียมสารละลายแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยนำแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.2133 มาเลี้ยงบนอาหาร PSA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงให้มีค่า 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายแบคทีเรียไปผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อดิน 8 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำดินที่บ่มเชื้อไว้มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัมต่อกระถาง จำนวน 210 กระถาง

2.2 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

เตรียมสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยนำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาเลี้ยงบนอาหาร PSA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง นำมาทำสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

2.3 การควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) มี 14 กรรมวิธี 15 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินเลน

กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์ 11 SA

กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินชุมแพ

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรียปฏิปักษ์อ้อย 4

กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2

กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรียปฏิปักษ์ 4120

กรรมวิธีที่ 7 แบคทีเรียปฏิปักษ์ปุ๋ยคอก

กรรมวิธีที่ 8 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากกล้วย

กรรมวิธีที่ 9 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินปุ๋ยคอก

กรรมวิธีที่ 10 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No. 4

กรรมวิธีที่ 11 แบคทีเรียปฏิปักษ์อ้อย 6

กรรมวิธีที่ 12 แบคทีเรียปฏิปักษ์ 4415

กรรมวิธีที่ 13 แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.2

กรรมวิธีที่ 14 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

ในการทดลองนี้จะใช้ต้นกล้าพริกที่มีลักษณะแข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง มีอายุประมาณ 30-40 วัน สูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร มีใบจริงประมาณ 5 ใบ นำมาย้ายลงปลูกในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ กรรมวิธีละ 15 กระถางๆ ละ 1 ต้น รดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่กำหนดไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อต้น เริ่มรดครั้งแรกหลังย้ายพริกลงปลูกในกระถางและรดทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งพริกในกรรมวิธีเปรียบเทียบตายหมด

การบันทึกผล บันทึกต้นพริกที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 15, 30 และ 45 วัน และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทุก 15, 30 และ 45 วัน

ระยะเวลา

ดำเนินการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยาจำนวน 50 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี direct bioassay โดยทำ diffusion double layer technique พบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก 13 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินเลน, 11.SA, 4120, ดินชุมแพ, อ้อย 4, ดินคลองหลวง 9.2, ดินรากยาสูบ No.2, ปุ๋ยคอก, ดินรากกล้วย, ดินรากยาสูบ No. 4, อ้อย 6, 4415 และดินปุ๋ยคอก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 โดยมีระดับการยับยั้งที่แตกต่างกัน มีความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 2.95-7.75 มิลลิเมตร แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 ได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างของบริเวณใส 7.75 และ 7.55 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วน แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินเลน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 ได้ดีรองลงมา คือ มีความกว้างของบริเวณใส 6.95 และ 7.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4 และดินเลน มีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมากทำให้เกิดปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker and Cook (1974) ที่รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อความร้อน และสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลองพบว่าต้นพริกที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินรากยาสูบ No.4 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ดีที่สุด คือ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริก 66.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นพริกที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง 9.2 และ ดินเลน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกรองลงมา คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นพริกที่เป็นตัวเปรียบเทียบที่รดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรค 100 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูก 45 วัน (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ในกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินรากยาสูบ No.4 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกดีที่สุดมีปริมาณ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 8.9×10^4, 3.45×10^5 และ 9.5×10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2 และดินเลน ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริก 60 เปอร์เซ็นต์ ก็มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น โดยกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6.9×10^4, 8.15×10^4 และ 5.5×10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินเลน มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3.68×10^4, 2.25×10^5 และ 9.35×10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* คงที่และลดลง หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน (ตารางที่ 3) ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4, ดินคลองหลวง 9.2 และ ดินเลน ลดลง โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 5.3×10^5, 7.95×10^4 และ 7.4×10^3 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 3.48×10^5, 2.7×10^4 และ 2.5×10^4 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินเลน มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 7.3×10^5, 5.75×10^4 และ 8.9×10^3 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน เพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 4) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4, ดินคลองหลวง 9.2 และ ดินเลน สามารถอยู่ในดินปลูกพริกได้นานกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นๆ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น และจากผลการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4, ดินคลองหลวง 9.2 และ ดินเลน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 ได้ดี มีความกว้างของบริเวณใสมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นๆ แสดงว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมาก จึงทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4, ดินคลองหลวง 9.2 และ ดินเลน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกมากกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker and Cook (1974) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีความทนทาน และอยู่รอดสูงแม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ขาดแคลนอาหาร ความร้อนสูง แสงอุลตร้าไวโอเลต และสามารถงอกกลับเป็นเซลแบคทีเรียใหม่ได้โดยง่าย นอกจากนั้นยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้ทันทีที่ใส่ลงไปในดินเนื่องจากในดินมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยนำมาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี direct bioassay โดยทำ diffusion double layer technique สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีคุณสมบัติในยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกได้ 13 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินเลน, 11.SA, 4120,ดินชุมแพ, อ้อย 4, ดินคลองหลวง 9.2, ดินรากยาสูบ No.2, ปุ๋ยคอก, ดินรากกล้วย, ดินปุ๋ยคอก, ดินรากยาสูบ No. 4, 4415 และ อ้อย 6

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการ ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ 3 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ No.4 ควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 66.67 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ดินคลองหลวง 9.2 และดินเลน ควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 60 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. โรคเหี่ยวเขียว. *ใน* คู่มือโรคผัก. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 8.

วนิดา ฐิตะฐาน. 2542. โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S and Kato, H. 1998. The use of endophytic bacteria in biocontrol. *In* The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number 2.10.5s.

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Ciampi, L., Fuentes, R., Schobitz, R., Bernal, G. and Oyarzun, J. 1998. Biological control of *Ralstonia solanacearum* : Alginate beads as carriers for antagonistic cells. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B2.

Guo,J., H. Qi and S. Li . 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial wilt newsletter. 17 :3 .

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltomore.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

ตารางที่ 1 ขนาดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 บนอาหารWakimoto's semisynthetic potato medium (PSA)

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)**	
	R. solanacearum **No. 2109**	***R. solanacearum*** **No. 2133**
1. ดินเลน	**6.95**	**7.25**
2. 11.SA	4.2	4.15
3. ดินชุมแพ	3.15	2.95
4. อ้อย 4	5.9	5.75
5. ดินคลองหลวง 9.2	**6.1**	**5.9**
6. ดินรากยาสูบ No.2	4.15	3.9
7. 4120	3.9	3.95
8. ปุ๋ยคอก	3.8	3.5
9. ดินรากกล้วย	5.95	4.55
10. ดินปุ๋ยคอก	4.6	4.15
11. ดินรากยาสูบ No. 4	**7.75**	**7.55**
12. อ้อย 6	5.15	5.95
13. 4415	5.7	5.4

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

แบคทีเรียปฏิปักษ์	การเกิดโรค % 1/			การควบคุมโรค % 2/		
	15 วัน	30 วัน	45 วัน	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1. ดินเลน	**0.00**	**13.33**	**40.00**	**100**	**86.67**	**60.00**
2. 11.SA	26.67	53.33	80.00	73.33	46.67	20.00
3. ดินชุมแพ	40.00	73.33	93.33	60.00	26.67	6.67
4. อ้อย 4	20.00	60.00	86.67	80.00	40.00	13.33
5. ดินคลองหลวง 9.2	**6.67**	**20.00**	**40.00**	**93.33**	**80.00**	**60.00**
6. ดินรากยาสูบ No.2	13.33	46.67	73.33	86.67	53.33	26.67
7. 4120	46.67	86.67	93.33	53.33	13.33	6.67
8. ปุ๋ยคอก	20.00	33.33	66.67	80.00	66.67	33.33
9. ดินรากกล้วย	6.67	20.00	66.67	93.33	80.00	33.33
10. ดินปุ๋ยคอก	20.00	60.00	93.33	80.00	40.00	6.67
11.ดินรากยาสูบ No.4	**6.67**	**20.00**	**33.33**	**93.33**	**80.00**	**66.67**
12. อ้อย 6	33.33	40.00	73.33	66.67	60.00	26.67
13. 4415	20.00	46.67	80.00	80.00	53.33	20.00
14. control	53.33	100.00	100.00	46.67	0.00	0.00

1/ การเกิดโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

2/ การควบคุมโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

ตารางที่ 3 ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการทดลองการควบคุมโรคเหี่ยวของพริก
ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ระยะเวลา 15, 30 และ45 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ปริมาณประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	15 วัน	**30 วัน**	**45 วัน**
1. ดินเลน	**3.68×10^4**	**2.25×10^5**	**9.35×10^5**
2. 11.SA	1.84×10^5	4.40×10^4	7.75×10^3
3. ดินชุมแพ	9.41×10^3	8.44×10^3	6.50×10^3
4. อ้อย 4	7.23×10^4	4.45×10^4	8.70×10^3
5. ดินคลองหลวง 9.2	**6.90×10^4**	**$8.15x\ 10^4$**	**5.50×10^5**
6. ดินรากยาสูบ No.2	9.50×10^4	7.75×10^4	3.25×10^3
7. 4120	8.45×10^4	6.75×10^3	3.50×10^3
8. ปุ๋ยคอก	5.10×10^5	7.55×10^4	2.50×10^3
9. ดินรากกล้วย	6.70×10^4	9.50×10^4	3.50×10^4
10. ดินปุ๋ยคอก	4.15×10^4	5.25×10^3	1.35×10^3
11. ดินรากยาสูบ No. 4	**8.90×10^4**	**3.45×10^5**	**9.50×10^5**
12. อ้อย 6	2.25×10^5	2.75×10^4	4.25×10^3
13. 4415	6.80×10^5	7.15×10^4	8.25×10^3
14. control	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 4 ประชากรของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในการทดลองการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ระยะเวลา 15, 30 และ 45 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	15 วัน	**30 วัน**	**45 วัน**
1. ดินเลน	**7.30×10^5**	**5.75×10^4**	**8.90×10^3**
2. 11.SA	1.50×10^5	3.15×10^6	4.50×10^6
3. ดินชุมแพ	3.50×10^5	6.90×10^5	4.16×10^6
4. อ้อย 4	6.50×10^4	5.60×10^5	6.70×10^5
5. ดินคลองหลวง 9.2	**3.48×10^5**	**2.70×10^4**	**2.50×10^4**
6. ดินรากยาสูบ No.2	3.26×10^4	5.15×10^4	2.39×10^6
7. 4120	8.50×10^5	5.35×10^6	9.15×10^6
8. ปุ๋ยคอก	9.50×10^5	4.30×10^6	6.50×10^6
9. ดินรากกล้วย	6.40×10^4	1.15×10^5	5.30×10^5
10. ดินปุ๋ยคอก	4.15×10^4	8.75×10^4	3.75×10^5
11. ดินรากยาสูบ No. 4	**5.30×10^5**	**7.95×10^4**	**7.40×10^3**
12. อ้อย 6	7.25×10^4	5.60×10^5	6.30×10^6
13. 4415	3.40×10^5	2.93×10^6	5.60×10^6
14. control	2.70×10^5	6.50×10^6	8.80×10^6