การผลิตเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคเหี่ยวของมันฝรั่งปริมาณมากเพื่อเกษตรกร

Mess production of antagonistic bacterial against *Ralstonia solanacearum* causal agent of potato bacterial wilt

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1] สุรีย์พร บัวอาจ[1] วิวัฒน์ ภานุอำไพ[2]
[1/] กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่

บทคัดย่อ

เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Common micro flora) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในห่วงลูกโซ่อาหาร(food chain) สามารถย่อยสลายวัสดุธรรมชาติได้อย่างกว้างขวาง สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ที่ทนต่อความแปรปรวนของสภาพธรรมชาติได้ดีโดยเฉพาะสภาพที่แห้งแล้งขาดแคลนอาหาร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติระหว่าง *B. subtilis* กับเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวแล้ว เชื้อ *B. subtilis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติได้เหนือกว่าและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเจริญในอาหารนมได้เป็นอย่างดี จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใน ห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่ 24-48 ชม.และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้นาน 3 เดือน

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

คำนำ

Ralstonia solanacearum สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอโดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้ แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้(soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี และที่สำคัญสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ หลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง พริกต่าง ๆ มะเขือต่าง ๆ งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* WB4(BsWB4) ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ และพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวเพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด ซึ่งถ้ามีการศึกษาหาวิธีการผลิตเชื้อ BsWB4 ในปริมาณมากเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืชต่าง ๆ ที่ถูกเชื้อนี้เข้าทำลายโดยเฉพาะมันฝรั่ง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การทดสอบการอาหารเลี้ยงเชื้อหลาย ๆ ชนิด
2. การเชื้อในปริมาณมากด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมและคุ้มทุนที่สุด
3. เก็บรักษาเชื้อในรูปคลังเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส
4. เปลี่ยนสภาพเซลล์ปกติเป็นเซลล์สปอร์
5. ผสมเชื้อเคลือบผิววัสดุแพร่กระจายเชื้อ (filler) อบแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส บรรจุภาชนะด้วยระบบ ไล่อากาศ (VIA pack)
6. ทดสอบการควบคุมโรคในแปลงเกษตรกรที่มีโรคดังกล่าวระบาดอย่างน้อย 4 แห่ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

พบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ(Common micro flora) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในห่วงลูกโซ่อาหาร(food chain)สามารถย่อยสลายวัสดุธรรมชาติได้อย่างกว้างขวาง สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ที่ทนต่อความแปรปรวนของสภาพธรรมชาติได้ดีโดยเฉพาะสภาพที่แห้งแล้งขาดแคลนอาหาร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติระหว่าง *B. subtilis* กับเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวแล้ว เชื้อ *B. subtilis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติได้เหนือกว่าและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเจริญในอาหารนมได้เป็นอย่างดี จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพและได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมากได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เองจึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใน ห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่24-48 ชม.และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้นาน 3 เดือน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ DOA-WB4 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวเขียวของมันฝรั่งสามารถขยายเพิ่มปริมาณในนมผงได้ดีกว่าในนมกล่องรูปแบบต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหารนมผงที่ 24-48 ชม พบว่าเชื้อเจริญได้ดีมีประชาการเชื้อที่มีประสิทธิภาพและเพียงพอในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไดนาน 3 เดือน

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตตรา เอี่ยมวิจิตร 2540. การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2540กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 11 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุลและรุ่งนภา คงสุวรรณ์ 2546. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ*Ralstonia solanacearum* จากน้ำและดินในเขตชลประทานพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2546 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งรายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22

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.

Asplras, R.B. and A.R. de le Cruz. 1986. Potential biological control of bacterial with in tomato and potato with Bacillus polymyxa FUB and *Pseudomonas fluorescens*. In:Persley, G.J.(ed.). Bacterial wilt disease in Asia and the south Pacific. ACIAR Proceedings 13,Canberra, Australia. P. 69-92.

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.

Devaux, A., D. Michelante, and M. Bicamumpaka. 1987. Combination of rotation and resistance to control bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Rwanda. European Asepolation Potato Research X Triennial Conference Abstracts. P. 100-101.

French, E.R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of pottoes. In:Hayward, A.C. and G.L. Hartman (eds.) Bacterial wilt: The disease and its acusative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, U.K. 288 p.

French, E.R., L. Gutarra, and G. Vilchez. 1975. Field survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in Peru. European Association Potato Research VI Triennial Conference Paper, P. 96.

Frenc, E.R., P. Aley. E. Torres, and U. Nydegger. 1993. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil, In: Hartman, G.L. and A.C. Hayward (eds.) Bacterial wilt. Proceedings of an International conference held at Kaohsiung, Taiwan. 28-31October 1992. ACIAR Proceedlings No. 45. Canberra, Sustralia. P. 70-77.

French, E.R., Anguiz, R. and Aley, P. 1997. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. *In*. Bacterial wilt : Molecular and Ecology aspects. Prior, P., Allen, C. and Elphinestone, J. (eds.) INRA edn., Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 381 – 385.

Frey, P., Prior, P., Marie, C., Kotoujansky, A., Trigalet, D.D. and Trigalet, 1994. Hrp-(sup) mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol*. 60 (9) 3175-3181.

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

Karuna, K., Khan, A.N.A. and Ravikumar, M.R. 1998. Potential of biocontrol agents in the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B3.

Kelaniyangoda, D.B. 1998. Bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) management in potato and tomato using botanicals and chemicals. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number B13.

Lloyd, A.B. 1976. Bacterial wilt in a coid-temperature climate of Australia. In: Planning conference and wordshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh, NC. USA. P. 134-136.

Martin, C. and E.R. French 1985. Bacterial wilt of potato Technioal Information Builetin No. 13. CIP Lima Peru.

Mundundu, N. and N.W.B. Bouwe. 1984. Apercu Bur nos connals-sanoes actueles sur la bacteriose de la pomme de terre au Zaire et reduction du taux Infection par sesotion. In: La reacherche sur le fle'trissement bacterien ouse par *Pseudomonas solanacearum* on Afrique Centrale, PRAPAC-CIP, B.P. 73, Ruhengeri, Rwanda, P. 46-51.

Nesmith, W.C. and Jenkins, J.S.F. 1985. Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. Phytopathology 75 : 1182-1187.

Rueda, J.L. 1980. Seed potato improvement under bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) pressure: An Integrated approach. Ph.D. Thesis, University of Reading, U.K. 266 p.

Saneviratne, S.N. 1988. Soil survivel of *Pseudomonas solanacearum*. In: Bacterial disease of the potato. Report of the Planning onference on Bacterial Disease of the potato, Mrch, 15-20, 1987. Lima, Peru, CIP. Lima, Peru. P. 85-91.

Shekhawat, Q.S., S.K. Ohakrabarti, and A.V. Gadewar. 1992. Potato bacterial wilt In: India. Central Potato Research Institute-ICAR, Tech. Bull. 28. Shirrte, HP, India. 52 p.

Tans-Kersten, J., Huang, H. and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*. 183 (12) 3597-3605.

Vander Zaag, P. 1986. Potato production under *Pseudomonas solanacearum* conditions. Sources and management of planting materials. In: Persley, G.J. (ed.) Bacterial wilt disease in Asia and South Pacific. ACIAR Proceedings 13, Canberra, Australia. P. 84-88.