การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศโดยชีววิธี

Biological control of tomato bacterial wilt

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] บูรณี พั่ววงศ์แพทย์[1] สุรีย์พร บัวอาจ[1]
วิลาวัลย์ ใคร่ครวญ[2] ธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[3]
[1] = กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2] = ศูนย์วิจัยพืชสวนกาญจนบุรี
[3] = ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียมะเขือเทศในพื้นที่ปลูกภาคกลางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียง เหนือ แยกได้เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ 19 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบต่อเชื้อปฏิปักษ์ที่เก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่ามีเชื้อที่มีคุณสมบัติปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Rs ทดสอบแบบการเผชิญหน้า (direct bioassay) ด้วยวิธี disc diffusion และ double layer culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท แสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ดี(inhibited zone) มีขนาด 4.25-10.75 มิลลิเมตร จากการทดสอบเชื้อมีชีวิต และ 6.25-12.00 มิลลิเมตร จากการใช้อาหารกรองของเชื้อ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวจำนวน 5 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในโรงเรือนปลูกพืชทดลองในสภาพก่อนและหลังการเป็นโรค โดยก่อนปลูกแช่รากถึงโคนต้นของต้นกล้ามะเขือเทศด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อัตราความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นาน 2-3 นาที แล้วราดด้วยสารละลายเชื้อเดียวกันอัตราความเข้มข้น 10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกระถาง, 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ แต่ไม่สามารถควบคุมโรคได้ถ้าเชื้อเข้าทำลายพืชนั้นแล้ว พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของกรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนที่พืชจะเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ 41.1 ถึง 80.0 % การตรวจสอบปริมาณเชื้อ Rs ในดินบริเวณรากมะเขือเทศพบว่าทุกกรรมวิธีของเชื้อปฏิปักษ์มีประชากรเชื้อสาเหตุโรคลดลง ทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองโดยการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วย

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-06-03-03-52

สารละลายเชื้ออัตราเดียวกับที่ใช้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและราดด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกันปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลุม, 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีของการใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ 15.8 ถึง 44.9 % มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Abstracts

Collection *Ralstonia solanacearum* casual bacterial wilt disease from soil, and root (rhizoplanes) of tomato were conducted from Central, North and Northeast are by sampling the former material disease severity infection of tomato. Nineteen bacteria were isolated by general King-B medium and were been screening for growth inhibition property against *R. solanacearum* by direct bioassay was applied. Using disc diffusion method tested to search the antagonistic bacteria from the potential antagonistic bacteria culture suspension and its culture filtrate with double layer culture of *R. solanacearum* on PSA (Wakimoto's potato semi synthetic agar) 1.5 and 0.5% agar. The results showed that nine isolates antagonized on *R. solanacearum*, which inhibited with strongly clear zone 4.25-10.75 mm by its culture and 6.25-12.00 mm by culture filtrated. The five higher clear zones were tested for biocontrol microorganism agent for this disease on young tomato plant under green house condition. The results were found that five isolates could pre-diseased control the bacterial wilt disease of tomato in green house condition at range 41.1 - 80.0 % but could not control on post diseased condition. These 5 antagonists were effective in field condition and the striking outcomes were obtained at Tak horticulture research station in the northern of Thailand at which the fields had been heavily infected during 2003-2004. In this biological control, the potato was dressed with the suspension of the antagonists at the concentration of 10^9 cfu/ml before planting and drenched (10^6 cfu/ml) every 7 days for four times. The results showed that these antagonists controlled significantly the bacterial wilt disease control at 15.8 - 44.9 %,

บทนำ

มะเขือเทศ(tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* Mill. เป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากเพราะสามารถบริโภคได้ทั้งผลสด ใช้ปรุงอาหารและผลิตในรูปอุตสาหกรรม พื้นที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม 27,195 ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 28,209 ไร่ (พ.ศ..2540 / 2541)พันธุ์ที่ส่งเสริม มะเขือเทศอุตสาหกรรม พันธุ์เบต้า เดต้า TW 4 มะเขือเทศรับประทานสด พันธุ์สีดาทิพย์ ต้นทุนการผลิต/ไร่ 7,750 บาท/ไร่ (พ.ศ. 2542) มะเขือเทศสามารถขึ้นได้กับดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของดินในช่วง 6.0-6.8 และความชื้นของดินพอเหมาะ ต้องการ

แสงแดดเต็มที่ตลอดวัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ระหว่าง 21-24 องศาเซลเซียส ปัญหาสำคัญในการปลูกมะเขือเทศได้แก่ ปัญหาเรื่องแมลงและโรค โรคที่สำคัญทำความเสียหายให้แก่การปลูกมะเขือเทศมากที่สุดได้แก่โรคเหี่ยวแบคทีเรีย (bacterial wilt) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบระบาดในทุกแหล่งที่มีการปลูกมะเขือเทศ ซึ่งในพืช Solanaceae มะเขือเทศจะอ่อนแอต่อเชื้อนี้มากที่สุด เกิดและติดโรคได้ง่ายและดีที่สุด โรคระบาดได้เร็วและรุนแรง (วนิดา,2542) *R. solanacearum* เชื้อนี้เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอ โดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้ แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้ (soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ ในประเทศไทยโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มะเขือต่าง ๆ พริกต่าง ๆ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ (วงศ์, 2548) และจากการทดลองใช้วิธีผสมผสานวิธีการต่าง ๆ ร่วมกันในการควบคุมโรคพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์DOA-WB4 เพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด (วงศ์, 2549) และขยายผลการใช้เชื้อ DOA-WB4 ในแปลงเกษตรกร พบว่าได้ผลดี สามารถลดการเกิดโรคได้ 0-65 % (วงศ์, 2550) ถ้ามีการขยายผลการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศทำนองเดียวกับงานวิจัยมันฝรั่งเพื่อหาเชื้อที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศเช่นเดียวกันกับที่ใช้ได้ผลในมันฝรั่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกมะเขือเทศอย่างมาก

ปัจจุปันการควบคุมโรคเหี่ยวที่ได้ผลดีคือการป้องกันการเกิดโรคซึ่งเป็นยุทธศาสตร์การควบคุมโรคในเชิงรับ แต่การใช้เชื้อปฏิปักษ์ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่นอกจากคุณสมบัติการเป็นเชื้อปฏิปักษ์แล้วยังควรจะประกอบด้วยคุณสมบัติที่ได้เปรียบอื่น ๆ อีกเช่น มีความสามารถในการอยู่รอดในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรค มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้กว้างขวางกว่าเชื้อสาเหตุของโรค และมีอัตรากาเจริญเติบโตที่สูงกว่าเชื้อสาเหตุโรค ด้วยเหตุผลที่เชื้อปฏิปักษ์ DOA-WB4 เป็นเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเป็น flora micro organism สามารถพบได้ทุกแห่งทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นในอากาศ ในน้ำ ในดิน ซากพืชซากสัตว์ เชื้อนี้อยู่ในห่วงลูกโซ่อาหาร(food chain)ของระบบนิเวศทั่วไปในธรรมชาติ ซึ่งโดยธรรมชาติคุณสมบัติเหล่านี้ของเชื้อ *B. subtilis* จะได้เปรียบกว่าเชื้อ *R. solanacearum* จึงเป็นสิ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นยุทธศาสตร์เชิงรุกของการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในสภาพธรรมชาติ

โรคเหี่ยวเขียวที่พบในประเทศไทยเกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* 2 race คือ race 1 และ race 3 จากรายงานของ Martin C. 1985 พบว่า 90% ของเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในที่สูงเขตหนาว (cool-climate) เป็น race 3 biovar 2A ในพื้นที่ที่เป็นที่ราบ (Low land) เชื้อสาเหตุโรคที่พบในเขตนี้ส่วนมากจะเป็น race 1 biovar 1, 3, 4 และ 2T ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีพืชอาศัยค่อนข้างกว้าง โดยเฉพาะพืชในตระกูล Solanaceae วัชพืชหลายชนิดและพืชท้องถิ่น พบระบาดมากในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่นทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาและเขตเอเชีย ซึ่งได้มีการใช้กลยุทธ์ที่สามารถควบคุมโรคได้อย่างได้ผลมาแล้ว (Frenon 1994) ดังตัวอย่างโรคเหี่ยวเขียวที่ระบาดในมันฝรั่งในเขตหนาวทางเหนือของ Dorrigo รัฐ New South Wales ประเทศออสเตรเลียในระหว่างปี 1990-1 ได้วางกลยุทธ์โดยปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้หรือไถคืนปล่อยให้เป็นทุ่งหญ้านาน 2 ปีครึ่ง จากนั้นใช้หัวพันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรงมีคุณภาพดีและปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวจากการตรวจสอบด้วยมาตรการที่กวดขันเข้มงวดของฝ่ายกักกันพืช ทำให้สามารถปลูกมันฝรั่งในพื้นที่ดังกล่าวได้ผลดี (Lioyd 1976) ส่วนพันธุ์ที่ไม่ใช่พืชอาศัยได้แก่ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่างและถั่ว cowpea สามารถปลูกสลับกันประมาณ 8-10 เดือนจะลดการระบาดของโรคได้หรือการตรวจเชื้อจากชุดตรวจสอบชนิดสำเร็จ Rs (CIP Kit) ช่วยให้การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับหัวส่วนขยายพันธุ์ ดิน น้ำ ได้ถูกนำมาใช้ในหลาย ๆ ประเทศในทวีปอเมริกาใต้ เพื่อใช้คัดเลือกต้นพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Frenoh 1994, Mundundu Bouwe 1984 และ Reudu 1990) Nesmith and Jenkins (1985) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มักพบในดินที่มีอินทรีย์หมักตามธรรมชาติ (suppressive and conducive composed soil) Guo *et al.*, (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. J3, *Bacillus* spp. BB11 and FH 17 มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ Frey *et al.*, (1994) ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อโรคนี้ (Hrp$^-$ mutant of *R. solanacearum* by **ω**-Km interposon used genetically engineered) ช่วยลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ Aino *et al.,* (1998) รายงานว่า endophytic pseudomonads, FPT and FPH มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ Shiomi *et al.* (1999) พบว่าการใช้ suppressive soil จากเมือง Mutsumi ช่วยลดความรุนแรงของโรคดังกล่าวในมะเขือเทศ Ciampi *et al.,* (1999) ใช้สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท A47 และ *Pseudomonas fluorescens* BC8 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเหี่ยว สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพไร่ Sanaina *et al.*, (1998) ใช้เชื้อแบคทีเรียบริเวณรากควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ 24-83 % และใช้ควบคุมได้ดีกว่าเชื้อโรคนี้ที่กลายพันธุ์เป็นเชื้อที่ไม่เกิดโรครุนแรง (avirulent mutant of *R. solanacearum*) ซึ่งจำแนกเป็น *Bacillus subtilis, B. cereus* และ *Enterobacter cloacae* Karuna *et al.*, (1998) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมโรคนี้ได้ดีกว่า *Pseudomonas aeroginosa* Kelaniyangoda (1998) พบว่าการปรับปรุงดิน (soil amendment) ด้วยการผสม sun hemp seed (*Crotalaria*

juncea L.) 10 t/ha + Calcium Oxide 2 t/ha + Urea 200 kg N/ha สามารถควบคุมโรคนี้ทั้งในมะเขือเทศและมันฝรั่ง Suthaya (1984) รายงานว่า *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* ที่แยกเชื้อได้จากปุ๋ยหมักและปุ๋ยพืชสดสามารถยับยั้งการเจริญและการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ แต่ไม่สามารถควบคุมโรคในสภาพไร่ Urutchata (1991) พบว่า *P. fluorescens* NA1 และ *Serratia marcescens* NA25 สามารถควบคุมโรคดังกล่าวในมะเขือเทศได้โดยการแช่รากของกล้ามะเขือเทศก่อนปลูก จากรายงานในประเทศไทยพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง (วงศ์ , 2548) ได้มีการพัฒนางานวิจัยการตรวจหาเชื้อ *R.solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งด้วยชุดตรวจสำเร็จ ELISA KIT จากหัวพันธุ์มันฝรั่ง น้ำและดินที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ ทำให้สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ (วงศ์, 2543; 2548) สารสกัดจากพลูและเปล้าน้อยสามารถลดการระบาดของโรคดังกล่าวได้ (วงศ์, 2540) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่น ๆ ที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ เช่น การปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของดิน การไถตากดิน การปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้ ได้มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ (วงศ์, 2548) และจากการทดลองใช้วิธีผสมผสานวิธีการต่าง ๆ ร่วมกันในการควบคุมโรคพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์DOA-WB4 เพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด (วงศ์, 2549) และขยายผลการใช้เชื้อ DOA-WB4 ในแปลงเกษตรกร พบว่าได้ผลดี สามารถลดการเกิดโรคได้ 0-65 % (วงศ์, 2550) ถ้ามีการขยายผลการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกทำนองเดียวกับงานวิจัยมันฝรั่งโดยการแยกที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์จากต้นที่ไม่เป็นโรคในที่ที่มีการระบาดของโรค คัดเลือกและทดสอบตามขบวนการทางวิชาการเพื่อหาเชื้อที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในพริกเช่นเดียวกันกับที่ใช้ได้ผลในมันฝรั่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกพริกอย่างมาก

การทดลองจะเก็บตัวอย่างดินและรากพืชบริเวณ rhizoplane จากต้นปกติและต้นที่เป็นโรคในพื้นที่ที่เกิดโรคระบาด นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อในคลัง คัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว นำเชื้อไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนทดลอง คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคในเรือนทดลองมาทดสอบในสภาพแปลงทดลองและแปลงเกษตรที่มีการระบาดของโรคโดยธรรมชาติ ตามลำดับ

วิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างดินและรากจากต้นที่ไม่เป็นโรคในแปลงพริกที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวที่ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จากแหล่งปลูกพริกของประเทศไทย
2. แยกเชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาในคลังเชื้อห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
3. ทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่คุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว
4. นำเชื้อเชื้อที่คุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง
5. นำเชื้อที่คุณสมบัติสามารถควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนปลูกพืชทดลองไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลอง
6. นำเชื้อที่คุณสมบัติสามารถควบคุมโรคเหี่ยวในในแปลงทดลองไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในแปลเกษตรที่มีโรคดังกล่าวระบาด
7. เก็บ รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล การเกิดโรคและผลผลิต เขียนรายงาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียมะเขือเทศในพื้นที่ปลูกภาคกลาง ได้เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ 19 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบต่อเชื้อปฏิปักษ์ที่เก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่ามีเชื้อที่มีคุณสมบัติปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Rs โดยการทดสอบแบบการเผชิญหน้า (direct bioassay) ด้วยวิธี disc diffusion และ double layer culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท แสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ดี(inhibited zone) มีขนาด 4.25-10.75 มิลลิเมตร จากการทดสอบเชื้อมีชีวิต และ 6.25-12.00 มิลลิเมตร จากการใช้อาหารกรองของเชื้อ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวจำนวน 5 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในโรงเรือนปลูกพืชทดลองในสภาพก่อนและหลังการเป็นโรค โดยก่อนปลูกแช่รากถึงโคนต้นของต้นกล้ามะเขือเทศด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อัตราความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นาน 2-3 นาที แล้วราดด้วยสารละลายเชื้อเดียวกันอัตราความเข้มข้น 10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกระถาง, 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอ

โซเลท สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ แต่ไม่สามารถควบคุมโรคได้ถ้าเชื้อเข้าทำลายพืชนั้นแล้ว พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของกรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนที่พืชจะเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ 41.1 ถึง 80.0 % การตรวจสอบปริมาณเชื้อ Rs ในดินบริเวณรากมะเขือเทศพบว่าทุกกรรมวิธีของเชื้อปฏิปักษ์มีประชากรเชื้อสาเหตุโรคลดลง ทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองโดยการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกับที่ใช้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและราดด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกันปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลุม, 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีของการใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ 14.6 ถึง 54.3 % มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวแบคทีเรียในแปลงทดลอง 5 ไอดซเลท ที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ 14.6 ถึง 54.3 % มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตตรา เอี่ยมวิจิตร 2540. การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2540 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา 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* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, ปิยรัตน์ รรมกิจวัฒน์ รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวิวัฒน์ ภานุอำไพ

2549. การควบคุมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง

โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* Ehrenberg *วารสารวิชาการเกษตร* ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 หน้า 178-197.

วงศ์ บุญสืบสกุล 2550 การควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง น.ส.พ. กสิกร (ISSN 0125-3697) ปีที่ 80 ฉบับที่4 หน้า 68-92.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตรา ภาวิจิตร 2540. การผลิตแอนติเซรัมที่มี

ความจำเพาะต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 254 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ

Ralstonia solanacearum ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืช

และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 15 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.

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., 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 no. 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.

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.

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.

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.

Wong Boonsuesakul *et al.*2003. Using of biovar type system and host specific pathogenicity to grouping of The bacterial caused bacterial wilt disease of economic crops in Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*. 36 (2) : 173-184.

Wong Boonsuesakul *et al.*2005. Study on rapid and easy differentiation of *Bacillus* spp. With Thin-Layer

Chromatogram for amino-lipid. *Thai Phytopathology*. 19 (1-2) :1-12.

Wong Boonsuebsakul *et al.* 2006. Controlling of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, a causal agent of potato bacterial wilt by *Bacillus subtilis* Ehrenberg. Thai Agricultural Research Journal. 24 (2): 178-197

ภาคผนวก (Appendix)

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทดลอง

ภาคผนวก (Appendix)

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทดลอง