คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

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

บทคัดย่อ

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จาก culture collections และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และแบคทีเรียที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้ รวม 70 ไอโซเลต (culture collection 58 ไอโซเลต และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแปลงเกษตรกรอีก 12 ไอโซเลต) พบ 19 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่คัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มีระยะเวลาในการเกิดโรคเร็ว และมีความรุนแรงในการเกิดโรคสูง เป็นตัวแทนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธ์ที่มีศักยภาพ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธ์ คือ ไอโซเลต BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ซึ่งพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.15-1.0 มม.

คำนำ

กล้วยไม้ (orchid) จัดเป็นไม้ดอกที่มีสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะนอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกต่างประเทศเป็นจำนวนมาก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) 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)

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-03-54

ได้รายงานว่า โรคเน่าเละเป็นสาเหตุหลักที่สร้างความเสียหายให้กับการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายของฮาวาย การควบคุมโรคด้วยสารประกอบคอปเปอร์ มักพบปัญหาของการแพ้สารเคมี ส่วนการใช้สารปฏิชีวนะ ทำให้เชื้อสาเหตุเกิดการดื้อยาได้ง่าย ปัจจุบันทั้งต่างประเทศและในประเทศ ได้ศึกษาค้นคว้าหาชีวภัณฑ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีวิธี 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

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) และ Nutrient glucose agar (NGA)
2. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections
3. เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) สาเหตุโรคเน่าเละ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดัน ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้อบ (oven) และอุปกรณ์เครื่องแก้ว เป็นต้น
5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

1. **การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์**

1.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อต่อไป

1.2 แยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และแบคทีเรียที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้ โดยเลือกตัวอย่างต้นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตดี แข็งแรง และปลอดโรค การแยกเชื้อ ตัดชิ้นส่วนของบริเวณที่จะแยกเชื้อ (ราก หรือใบ) แช่ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืช วางบนอาหารสังเคราะห์ PSA สำหรับการแยกเชื้อที่เจริญในลำต้นและใบ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้ง นำมาสับหรือบดในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อแช่ทิ้งไว้ เป็นเวลา 3-5 นาที ใช้ลูปที่ลนไฟฆ่าเชื้อ จุ่มในน้ำบดตัวอย่างมาลาก (streak) บนอาหาร

สังเคราะห์ PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ และเป็นแกรมบวก นำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PSA ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีลักษณะโคโลนีเหมือนกัน เลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหารจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ให้รหัส และเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อต่อไป

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

1.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อต่อไป

1.2 แยกเก็บเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จากสวนของเกษตรกรเพาะปลูกกล้วยไม้สกุลหวายที่จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม โดยเลือกใบและลำต้นต้นที่เป็นโรคซึ่งมีแผลเชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่เป็นโรค ตัดชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร จุ่มแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1-2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชวางบนหยดน้ำ 50 ไมโครลิตร ตัดหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อจุ่มในหยดน้ำบด streak บนอาหารสังเคราะห์ PSA หรืออาจใช้ลูปแตะตรงบริเวณแผลที่แสดงอาการเน่าเละมา streak บนอาหารสังเคราะห์ PSA ก็ได้ หลังจากนั้นบ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหาร PSA ให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NGA slant เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อการศึกษาต่อไป

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ (Ecc และ Ech) ที่รวบรวมได้ บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ (cell suspension) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นประมาณ 0.2 O.D. ที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 2 x 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย ทำแผลด้วยปลายเข็มเขี่ย หยด cell suspension ของเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร 4 ซ้ำ ต่อใบ และใช้น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม เก็บต้นกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อ ในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาการเกิดโรค การพัฒนาอาการ จากนั้นนำตัวอย่างที่แสดงอาการโรค นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธี Koch's postulation

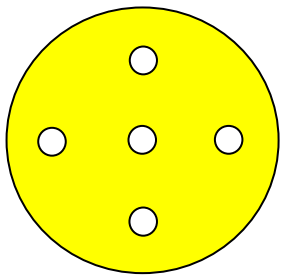
4. การคัดเลือกสายพันธ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวม และที่แยกได้ จำนวน 70 ไอโซเลต เลี้ยงบนอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดซับคลื่นแสง (absorbance) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางเชื้อให้มีค่า O.D เท่ากับ 0.2 โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ เตรียมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่รวบรวมและที่แยกได้ ด้วยวิธี double layer culture โดยชั้นล่างเทอาหาร PSA รองพื้นไว้บางๆ ในปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) เททับชั้นบนด้วยเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech อายุ 48 ชั่วโมง ในปริมาตร 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) ผสมในอาหาร PSA ซึ่งหลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มล. ต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ ให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่างที่เทไว้แล้วข้างต้น

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้ micropipette หยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ดังกล่าว ลงบนกระดาษกรองที่เจาะเป็นวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร แล้วใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษวางบนผิวหน้าอาหาร นำไปวางบนผิวอาหารที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค 4 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ (ภาพที่ 1) จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

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



ภาพที่ 1 แสดงการวางกระดาษกรอง โดยวางกระดาษกรองที่หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7 ไมโครลิตร 4 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ

เวลาสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 58 ไอโซเลต จาก culture collections โดยคัดเลือกไอโซเลตเชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้ และไอโซเลตมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ส่วนที่มีการแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และแบคทีเรียที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้ จำนวน 12 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี รวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลต

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

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc จำนวน 5 ไอโซเลต และ Ech จำนวน 5 ไอโซเลต จาก culture collections ซึ่งส่วนใหญ่แยกเชื้อได้จากกล้วยไม้มีหลายสกุล เช่น แวนดา หวาย และช้าง เป็นต้น อีกจำนวน 7 ไอโซเลต แยกเก็บเชื้อแบคทีเรีย Ecc 6 ไอโซเลต และ Ech 10 ได้จากสวนของเกษตรกรที่ปลูกกล้วยไม้สกุลหวาย จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เป็น Ech รวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ จำนวน 26 ไอโซเลต

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย กรณีเชื้อแบคทีเรีย Ecc โคโลนีกลมเล็ก สีขาวขุ่น ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech โคโลนีรี สีเขียวขี้ม้า ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) พบว่า เป็นลักษณะของเชื้อ แบคทีเรีย Ecc และ Ech

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

จากการพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีของ Koch's postulation พบว่า. แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ทั้ง 26 ไอโซเลต มี Ecc จำนวน 11 ไอโซเลต และ Ech จำนวน 15 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตสามารถก่อให้พืชเป็นโรคเน่าเละ หลังจากการปลูกเชื้อ เมื่อพืชแสดงอาการโรค ได้นำตัวอย่างอาการเน่าเละที่ปลูกเชื้อ มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตาม Koch's postulation ซึ่งพบลักษณะโคโลนีของเชื้อเป็นแบบเดียวกับที่นำไปปลูกเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นเป็นสาเหตุโรคจริง

ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงคัดเลือกไอโซเลตที่มีระยะเวลาในการเกิดโรคเร็ว และมีความรุนแรงในการเกิดโรคสูง เช่น เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลต KEC1, KEC2, KEC3, EKC4, EKC5 และ KEC6 หลังการปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย 24 ชั่วโมง ใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการแผลช้ำ ต่อมาใบเริ่มเน่าเละ ลักษณะใบเน่าเป็นเหลืองออกน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นรุนแรง (ภาพที่ 1)ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลต PA334, PA392 และ KE2 หลังการปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย 24 ชั่วโมง ใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละ และแยกจากผิวใบ ทำให้ผิวใบพอง บวมน้ำและเริ่มเน่า ลักษณะใบเน่าเป็นสีเขียวและกลิ่นไม่เหม็นมาก (ภาพที่ 2)

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

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี disc diffusion method โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลต KEC3 และ Ech ไอโซเลต PA334 ซึ่งเป็นตัวแทนในการทดสอบการเกิดโรค และใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกมาจำนวน 70 ไอโซเลต พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 19 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ทั้งใน Ecc และ Ech โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.2-1.0 มิลลิเมตร (มม.)

จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทั้ง 19 ไอโซเลต ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ ทั้ง Ecc และ Ech เชื้อละ 6 ไอโซเลต ที่ได้รวบรวมและที่แยกเก็บจากแปลงของเกษตรกร เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง ผลการทดสอบพบ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.15-1.0 มม. (ตารางที่ 1และภาพที่ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากรวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และแบคทีเรียที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้ รวม 70 ไอโซเลต (culture collection 58 ไอโซเลต และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแปลงเกษตรกรอีก 12 ไอโซเลต) พบ 19 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละ (culture collection 10 ไอโซเลต ส่วนแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลต) เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่คัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มีระยะเวลาในการเกิดโรคเร็ว และมีความรุนแรงในการเกิดโรคสูง เป็นตัวแทนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธ์ที่มีศักยภาพ ซึ่งพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธ์ คือ ไอโซเลต BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ซึ่งพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.15-1.0 มม.

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ, กรมส่งเสริมการเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

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

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

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

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

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

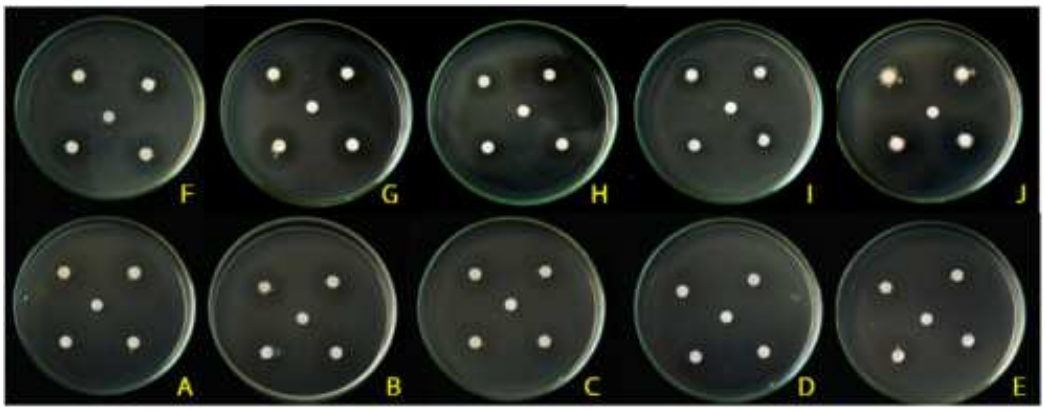
ภาคผนวก

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* ในกล้วยไม้

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora chrysanthemi* ของกล้วยไม้

ตารางที่ 1 ขนาดความกว้างของบริเวณวงใส (clear zone) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้บนอาหาร PSA

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ความกว้างของบริเวณวงใส (มม.)					
	Ecc			Ech		
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
KB2	0.50	0.60	0.60	0.43	0.94	1.00
KB5	050	0.53	0.80	0.36	0.90	0.82
KB9	0.30	0.42	0.60	0.26	0.72	1.00
KB12	0.25	0.50	0.50	0.15	0.74	1.00
17G18	0.20	0.40	0.54	0.39	0.44	0.45



ภาพที่ 2 บริเวณวงใส (clear zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

(A) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc

(B) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc

(C) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc

(D) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc

(E) *Bacillus* sp. ไอโซเลต 17G18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc

(F) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ech

(G) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ech

(H) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ech

(I) *Bacillus* sp. ไอโซเลต KB12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ech

(J) *Bacillus* sp. ไอโซเลต 17G18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ech