

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

วงศ์ บุญสืบสกุล¹ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล¹ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์¹
 บุรณี พัววงศ์แพทย์¹ สุรีย์พร บัวอาจ¹ วิวัฒน์ ภาณุอำไพ²

1/ กลุ่มงานבקเตริวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 2/ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า 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 พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่ 24-48 ชม.และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำตัวเอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้นาน 3 เดือน

คำนำ

Ralstonia solanacearum สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอโดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้ (soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี และที่สำคัญสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ ในประเทศไทยโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ

หลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง พริกต่าง ๆ มะเขือต่าง ๆ งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* WB4 (BsWB4) ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ และพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวเพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้ค้ำมุนที่สุด ซึ่งถ้ามีการศึกษาหาวิธีการผลิตเชื้อ BsWB4 ในปริมาณมากเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืชต่าง ๆ ที่ถูกเชื้อนี้เข้าทำลายโดยเฉพาะมันฝรั่ง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การทดสอบการอาหารเลี้ยงเชื้อหลาย ๆ ชนิด
2. การเชื้อในปริมาณมากด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมและค้ำมุนที่สุด
3. เก็บรักษาเชื้อในรูปคลั่งเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส
4. เปลี่ยนสภาพเซลล์ปกติเป็นเซลล์สปอร์
5. ผสมเชื้อเคลือบผิววัสดุแพร่กระจายเชื้อ (filler) อบแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส บรรจุภาชนะด้วยระบบ ไล่อากาศ (VIA pack)
6. ทดสอบการควบคุมโรคในแปลงเกษตรกรที่มีโรคง่าวระบาดอย่างน้อย 4 แห่ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Common micro flora) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในห่วงโซ่อาหาร (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 ปริมาณมากได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำตัวเอง

จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใน ห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่ 24-48 ชม. และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จ ใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิภักษนี้ และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้นาน 3 เดือน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

(อยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง)

เอกสารอ้างอิง

- วงศ์ บุญสืบสกุล, ญัญสิริมา โฆษิตเจริญกุล, วณิดา ลีตะฐานและสุนตตรา เขียมวิจิตร 2540. การศึกษารสสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2540 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 11 หน้า.
- วงศ์ บุญสืบสกุล, ญัญสิริมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณและวณิดา ลีตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.
- วงศ์ บุญสืบสกุล, ญัญสิริมา โฆษิตเจริญกุลและรุ่งนภา คงสุวรรณ 2546. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากน้ำและดินในเขตชลประทานพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2546 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.
- วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภาณุอำไพ, ญัญสิริมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณและปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 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., 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. 28-31 October 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 cold-temperature climate of Australia. In: Planning conference and workshop 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 Buletin 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.