การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมา โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

Control of Phatumma bacterial wilt disease by antagonist bacteria

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] วิภาดา ทองทักษิณ[2/] สุธามาศ ณ น่าน[3/]

1/ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2/ กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน

3/ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดิน ปุ๋ยคอก และรากพืช เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก 4 จังหวัดภาคเหนือ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 100 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Ralstonia solanacearum* ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Direct bioassay (Disc diffusion method) ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 8 ไอโซเลท นำเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา ได้โดยสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60% นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในแปลงทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4415 และรากอ้อย no.6 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลองได้ 43 และ 40 % ตามลำดับ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในสภาพแปลงเกษตรกรพบว่ากรรมวิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์4415 ร่วมกับ รากอ้อย no 6 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดโดยสามารถควบคุมโรคได้ 46.67 %ในขณะที่กรรมวิธี 4415 และ รากอ้อย no 6 สามารถควบคุมโรคได้ 39.17 % และ 34.17 % ตามลำดับ

รหัสโครงการ 0 1 1 5 4 9 0 3

คำนำ

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*, Gagnep) เป็นไม้พื้นบ้านของไทย อยู่ในกลุ่มพืชสกุลกระเจียวเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับขิง ข่า มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอีสานของประเทศไทย(วิภาดาและนิพัฒน์, 2537) ปัจจุบันนำมาใช้เป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และไม้ประดับแปลง(วิภาดาและนิพัฒน์, 2537) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ โดยเริ่มมีการส่งออกเหง้าหรือหัวพันธุ์ ปทุมมา ในปี พ.ศ. 2528 (สุรวิช, 2539) ตลาดการส่งออกปทุมมาที่สำคัญ คือ ญี่ปุ่น อเมริกา และเนเธอร์แลนด์ (สุรวิช, 2537) ปัจจุบันการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยว(bacterial wilt) หรือโรคหัวเน่า (brown rot) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (สุเนตราและคณะ, 2538; ณัฏฐิมาและคณะ,2541) เชื้อแบคทีเรียนี้เข้าทำลายพืชได้ทุกระยะพบมากในช่วงที่พืชกำลังออกดอก ทำให้ต้นพืชเกิดอาการใบม้วน และมีสีซีด เหมือนขาดน้ำต่อไปใบเริ่มเหลืองและหักพับ ลำต้นเน่าและลุกลามไปยังส่วนหัวจึงทำให้เกิดอาการหัวเน่าขึ้น เชื้อนี้สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ สามารถแอบแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ (Latent infection) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะแสดงอาการของโรคออกมาทำให้เกิดการระบาดของโรค

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถที่จะคงอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคนี้ วิธีการป้องกันกำจัดยังคงจำกัด วิธีควบคุมโรคเหี่ยวโดยชีววิธีเป็นที่ยอมรับเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันได้มีใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมศัตรูพืชด้านการเกษตร ทดแทนสารเคมีบางส่วน และเลือกใช้กับศัตรูพืชที่ไม่สามารถใช้สารเคมีป้องกันกำจัดได้ Celino และ Gotllieb(1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* B_3 A โดยการใส่ลงในดินที่มีเชื้อสาเหตุโรคสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้และลดการเกิดโรคจาก 70 เปอร์เซ็นต์ ลงเหลือเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ Sanaina และคณะ (1997) ได้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณ Rhizophere ของต้นมันฝรั่งและรากนำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พบเชื้อ *Baccillus cereus, B. subtrilis, Entero bacter cloaceae* และ avirulent mutant ของเชื้อ *R. solanacearum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83% Guoและคณะ (2002) ได้รายงานการทดลองควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี ด้วยใช้เชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* spp. (J3) และ เชื้อ *Bacillus* spp (BH11 และ FH17) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองโดยเชื้อปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 % และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100% เชื้อปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 % ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50% เมื่อ

นำเชื้อปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 % และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200%

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ปทุมมา

วิธีการ

แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากดิน ปุ๋ยคอกและรากพืชต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างของดินและปุ๋ยคอกในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เป็นต้น เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มจากแปลงปลูกพืชได้แก่ ปทุมมา ขิง และมะเขือเทศ โดยเก็บดินบริเวณรอบราก พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างปุ๋ยคอก นำมาผึ่งลมให้แห้งพอหมาด ๆ นำมาทำสารละลายดินหรือปุ๋ยคอกโดยใช้ดินหรือปุ๋ยคอก 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 250 มิลลิลิตร(มล.) เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี soil plate method โดยนำมาทำให้เจือจางโดยวิธี serials dilution ตั้งแต่ 10^{-1} -10^{-8} จากนั้นนำสารละลายดิน 0.1 มล. ของแต่ละความเข้มข้น มากระจายบนอาหาร King's medium B agar (KB) และ Nutrient glucose agar (NGA) โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 4 ซ้ำ ทำการบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อ

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและปุ๋ยคอก จำนวน 100 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum*

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าดูดซับคลื่นแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

2. เชื้อ *R. solanacearum* ที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ No.37, 36, 24 และ 19 โดยเตรียมเชื้อ *R. solanacearum* โดยเตรียมอาหาร Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) ในจานเลี้ยงเชื้อทำแบบ double layer ชั้นล่างใช้อาหาร PSA ในปริมาณ 15 มล.ต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนชั้นบนใช้เชื้อ *R. solanacearum* อายุ 48 ชั่วโมง ในปริมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี/มล. ผสมกับอาหาร PSA ซึ่งหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45° C เขย่าให้เข้ากันเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มล. ต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อแล้วเอียงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่างที่เทไว้แล้ว เมื่ออาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น 14° C นาน 1 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง

3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้วิธี disc diffusion method ในการทดสอบการยับยั้งในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ micropipetteหยดสารละลายของเชื้อที่จะทดสอบลงบนกระดาษแผ่นกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มล. โดยหยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร แล้วใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษวางบนผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ28° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพเรือนทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในยับการยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบความสามารถ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพเรือนทดลอง

1. **การเตรียมดินที่มีเชื้อ *R. solanacearum*** นำเชื้อ *R. solanacearum* No. 37 ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA อายุ 48 ชั่วโมงมาทำเป็นสารละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนี/มล. นำไปผสมกับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อเตรียมไว้แล้วโดยใช้ดิน 4 กิโลกรัม/กระถาง ใช้สารละลายของเชื้อ *R. solanacearum* 100 มล./กระถาง

2. **การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์** นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ดินชุมพร no.1, ปุ๋ยคอก no.1, ดินรากยาสูบ no.4, ดินเลน no.1, 3A, ดินคลองหลวง no.9, รากอ้อย no.6 และ 4415 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NGB ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าดูดซับคลื่นแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8-10^9 หน่วยโคโลนี/มล. เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย วางแผนการทดลองแบบ complete randomize design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 9 กรรมวิธีๆละ 10 หัว โดยมีเชื้อปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท เป็นแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อปฏิปักษ์ ดินชุมพร no.1
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อปฏิปักษ์ ปุ๋ยคอก no.1
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อปฏิปักษ์ ดินรากยาสูบ no.4
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อปฏิปักษ์ ดินเลน no.1
กรรมวิธีที่ 5 เชื้อปฏิปักษ์ 3A
กรรมวิธีที่ 6 เชื้อปฏิปักษ์ดินคลองหลวง no.9
กรรมวิธีที่ 7 เชื้อปฏิปักษ์รากอ้อย no.6
กรรมวิธีที่ 8 เชื้อปฏิปักษ์ 4415
กรรมวิธีที่ 9 กรรมวิธีควบคุม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3. **เตรียมหัวพันธุ์ปทุมมา** นำหัวพันธุ์ปทุมมา มาแช่ในเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ. 2 ก่อนปลูก ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปปลูกในดินที่มีเชื้อ *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 รดด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกๆ 7 วัน โดยมีตัวเปรียบเทียบที่ไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คลุกหัวพันธุ์พืชปทุมมาก่อนปลูกแต่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน ตรวจสอบการเกิดโรคของต้นพืชทุก 7 ,14 , 21 ,28 ,35 และ 42 วัน และตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และปริมาณเชื้อ*R. solanacearum* ทุก 7 วัน จนครบ 6 สัปดาห์หลังปลูก

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพแปลงทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งโรคเหี่ยวในเรือนปลูกพืชทดลอง มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในสภาพแปลงทดลองปทุมมา ในสถานีทดลองของกรมวิชาการเกษตร โดยใช้พื้นที่ในเขต จังหวัดเชียงราย โดยเลือกแปลงที่มีการระบาดของโรค

1. **ตรวจหาปริมาณของเชื้อ** *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลองโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุด นำมารวมกัน ชั่ง 10 กรัมผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มล.เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดยวิธี serials dilution ใช้ 100 ไมโครลิตร ของแต่ละ dilution เกลี่ยลงบนอาหารSM 1 ให้ทั่ว บ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ตรวจนับปริมาณบนอาหาร

2. **การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์** นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในยับการยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในเรือนปลูกพืชทดลอง จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ดินคลองหลวง no.9, ดินเลน no.1, รากอ้อย no.6 และ 4415 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NGB ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าดูดซับคลื่นแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8-10^9 หน่วยโคโลนี/มล.

3. **ปลูกปทุมมาทดสอบ** ทำการปลูกปทุมมาโดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธีละ 20 หัว ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อปฏิปักษ์ดินคลองหลวง no.9
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อปฏิปักษ์ ดินเลน no.1
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อปฏิปักษ์ อ้อย no 6
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อปฏิปักษ์ 4415
กรรมวิธีที่ 5 กรรมวิธีควบคุม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

โดยแช่หัวพันธุ์ปทุมมา ด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นเวลา 30

นาที ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง หลังปลูกปทุมมาราดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี/มล. ให้ทั่วทั้งแปลง ทำการราดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกๆ 30 วัน

ตรวจผลการทดลอง ตรวจนับปริมาณของเชื้อปฏิปักษ์ ตรวจนับปริมาณของเชื้อสาเหตุโรค และตรวจนับต้นที่แสดงอาการของโรค

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพแปลงเกษตรกร

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งโรคเหี่ยวในสภาพแปลงทดลอง มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในสภาพแปลงเกษตรกร ที่ จ.เชียงราย โดยเลือกแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียอย่างรุนแรง

1. **ตรวจหาปริมาณของเชื้อ** *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลองโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุด นำมารวมกัน ชั่ง 10 กรัมผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มล.เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดยวิธี serials dilution ใช้ 100 ไมโครลิตร ของแต่ละ dilution เกลี่ยลงบนอาหารSM 1 ให้ทั่ว บ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ตรวจนับปริมาณบนอาหาร 2. ตรวจเช็คการเกิดโรคเหี่ยวในแปลงปลูกทุกเดือน

2. **การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์** นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในยับการยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในเรือนปลูกพืชทดลอง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รากอ้อย no.6 และ 4415 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NGB ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าดูดซับคลื่นแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8-10^9 หน่วยโคโลนี/มล.

3. **ปลูกปทุมมาทดสอบ** ทำการปลูกปทุมมาโดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธีละ 20 หัว ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อปฏิปักษ์ รากอ้อย no 6

กรรมวิธีที่ 2 เชื้อปฏิปักษ์ 4415

กรรมวิธีที่ 3 เชื้อปฏิปักษ์ รากอ้อย no 6และ4415

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

โดยแช่หัวพันธุ์ปทุมมา ด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นเวลา 30 นาที ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง หลังปลูกปทุมมาราดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี/มล. ให้ทั่วทั้งแปลง ทำการราดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกๆ 30 วัน

ตรวจผลการทดลอง ตรวจนับปริมาณของเชื้อปฏิปักษ์ ตรวจนับปริมาณของเชื้อสาเหตุโรค และตรวจนับต้นที่แสดงอาการของโรค

เวลาและสถานที่

ต.ค.48 - ก.ย.53 ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากดินและรากพืชต่าง ๆ

ผลจากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน รากพืช และปุ๋ยคอก ได้เชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆจำนวน 100 ไอโซเลท โดยการแยกจากดินและรากพืช จำนวน 70 ไอโซเลท และ ปุ๋ยคอก จำนวน 30 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน glycerol 20% ที่ –20 $^{\circ}$ C เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ 8 ไอโซเลท ได้แก่ ดินชุมพร no.1, ปุ๋ยคอก no.1, ดินรากยาสูบ no.4, ดินเลน no.1, 3A, ดินคลองหลวง no.9, รากอ้อย no.6 และ 4415 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยสามารถวัดความกว้างของบริเวณใส ได้ตั้งแต่ 0.7-5.05 มิลลิเมตร (ตาราง 1) โดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินชุมพร no.1, ปุ๋ยคอก no.1, ดินรากยาสูบ no.4, ดินเลน no.1, 3A และ 4415 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียดินคลองหลวง no.9 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* 3 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย รากอ้อย no.6 ยับยั้งเฉพาะเชื้อ *R. solanacearum* 2 สายพันธุ์ จากผลการทดลองนี้ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพเรือนทดลอง

หลังจากแช่หัวพันธุ์กับสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และปลูกลงในดินที่มีเชื้อ *R. solanacearum* แล้ว 45 วันพบว่า กรรมวิธีที่คลุกหัวพันธุ์ด้วยสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง no.9 ดินเลน no.1 รากอ้อย no.6 และ 4415 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60% ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินชุมพร no.1ปุ๋ยคอก no 1 ดินรากยาสูบ no.4 ดินปุ๋ยคอก no.1 และ 3A สามารถควบคุมโรคได้ 40%(ตารางที่2)

จากผลการตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า ในพืชทดสอบปทุมมา ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง no.9 และ 4415 มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1.5×10^{5} และ 1.75×10^{5} CFU/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ และ เชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ ดินชุมพร no.1 รากอ้อย no.6 ดินเลนno.1 และ3A มีปริมาณคงที่ นอกนั้นมีปริมาณลดลง(ตารางที่ 3) ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ในกรรมวิธีที่ใช้ ดินคลองหลวง no.9 และ 4415 ลดลง โดยมีปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* 2.75×10^{3} และ 5.6×10^{3}CFU/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ นอกนั้นมีปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* เพิ่มมากขึ้นในวันที่ 45 (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง no.9 และ 4415 สามารถคงอยู่ในดินและเจริญเติบโตได้ดี และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ทำให้ปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ลดลง ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินชุมพร no.1 รากอ้อย no.6 ดินเลนno.1 และ3A คงอยู่ในดินได้ไม่นานเพราะมีการรดเชื้อปฏิปักษ์ทุก 7 วันปริมาณเชื้อยังคงเท่าเดิม ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ไม่ดีเท่ากับ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง no.9 และ 4415

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวในสภาพแปลงทดลองพบว่า กรรมวิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์4415 เกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด โดยพบเพียง 57% ส่วนกรรมวิธี รากอ้อย no 6 ดินคลองหลวง no.9 และ ดินเลน no.1 เกิดโรค 60 62 และ 69% ตามลำดับ(ตารางที่5) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมเกิดโรคเหี่ยว 78 % ความสามารถในการควบคุมโรคพบว่ากรรมวิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์4415 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดโดยสมารถควบคุมโรคได้ 43%ในขณะที่กรรมวิธี รากอ้อย no 6 ดินคลองหลวง no.9 และ ดินเลน no.1 สมารถควบคุมโรคได้ 40 % 38%และ 31 % ตามลำดับ (ตารางที่5)

จากผลการตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อ *R. solanacearum* ในแปลงทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทุกกรรมวิธีมีปริมาณคงที่ ประมาณ 10^{4} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ยกเว้นกรรมวิธี ดินเลน no.1 ที่มีปริมาณลดลงเหลือเพียง 6.6×10^{3} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 6) ปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ในทุกกรรมวิธีเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยในเดือนกันยายน ประมาณ 10^{5} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 4) ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ในกรรมวิธีควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ถึง 9.90×10^{7} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่อถูกนำไปใช้ในสภาพแปลงทดลองโดยมีการใส่เชื้อทุกๆ 30 วัน ปริมาณเชื้อคงที่ไม่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นเชื้อปฏิปักษ์อยู่ในดินได้ดี แต่ปริมาณที่ใส่เข้าไปลดลงจากปริมาณ 10^{9} หน่วนโคโลนี/มล. ให้ทั่วทั้งแปลง คงไม่เพียงพอเพราะปริมาณของเชื้อในดินมีเพียง 10^{4} หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ทำให้ประสิทธิภาพของการควบคุมโรคเหี่ยวยังไม่ดีพอ ควรต้องเพิ่มปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ลงไปในแปลงให้มากขึ้นให้ได้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีขึ้น

ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในสภาพแปลงเกษตรกร

ผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวในสภาพแปลงเกษตรกรพบว่า กรรมวิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์4415 ร่วมกับ รากอ้อย no 6 เกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด โดยพบเพียง 53.33% ส่วนกรรมวิธี 4415 และ รากอ้อย no 6 เกิดโรค 60.83 และ 65.83 % ตามลำดับ(ตารางที่ 6) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม

เกิดโรคเหี่ยว 75 % ความสามารถในการควบคุมโรคพบว่ากรรมวิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์4415 ร่วมกับรากอ้อย no 6 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดโดยสามารถควบคุมโรคได้ 46.67 %ในขณะที่กรรมวิธี 4415 และ รากอ้อย no 6 สามารถควบคุมโรคได้ 39.17 % และ 34.17 % ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4415ร่วมกับรากอ้อย no 6 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาได้ดีที่สุด โดยสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในในสภาพแปลงเกษตรกร ได้ 46.67 % จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สองชนิดที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาได้ทั้งในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง แปลงทดลองและ ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน 2541 ศึกษาเชื้อสาเหตุโรคเหียวของปทุมมา รายงานผลงานวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร. 67(5):415-419.

สุเนตรา ภาวิจิตร , ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ และนิยมรัฐ ไตรศรี . 2538. โรคหัวเน่าของกระเจียวและปทุมมา. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 5(4) : 92

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537 ปทุมมาและกระเจียว. น.58-72. ใน : ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.159 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด,กรุงเทพฯ.128 น.

Celino, M.S. and D. Gotllieb. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. 42:4(Abstract).

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

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) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PSA

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ความกว้างของบริเวณใส (มม.)			
	RS no.37	RS no.36	RS no.24	RS no.19
1. ดินชุมพร no 1	5.05	3.1	4.2	3.1
2. ปุ๋ยคอก no.1	5.2	4.65	2.3	2.75
3. รากอ้อย no.6	3.1	-	4.35	-
4. ดินรากยาสูบ no. 4	6.1	1.9	4.8	3.6
5. ดินคลองหลวง no.9	0.7	5.2	3.75	-
6. ดินเลน no.1	2.35	4.85	3.1	3.35
7. 4415	4.3	5.6	2.5	2.6
8. 3A	5.45	2.15	3.45	3.5

หมายเหตุ - = ไม่เกิด Clear zone

ตารางที่ 2 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค % -1/			การควบคุมโรค % -2/		
	15 วัน	30 วัน	45 วัน	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1. ดินคลองหลวง no. 9	0	20	40	100	80	60
2. ดินชุมพร no. 1	0	20	60	100	80	40
3. ดินเลน no.1	0	40	40	100	60	60
4. รากอ้อย no.6	0	20	40	100	80	60
5. ดินรากยาสูบ no. 4	0	40	60	100	60	40
6. ปุ๋ยคอก no. 1	0	20	60	100	80	40
7. 3A	0	40	60	100	60	40
8. 4415	0	20	40	100	80	60
9. control	0	50	80	100	50	20

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

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

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการทดลองควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมาในเรือนปลูกพืชทดลองเป็นเวลา 45 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (CFU* / ดิน 1 กรัม)		
เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1. ดินชุมพร no. 1	1.53×10^4	1.25×10^4	9.3×10^4
2. ปุ๋ยคอก no.1	6.84×10^5	7.4×10^4	2.7×10^3
3. รากอ้อย no.6	6.4×10^4	4.4×10^4	6.6×10^4
4. ดินรากยาสูบ no.4	7.2×10^4	7.45×10^4	6.75×10^3
5. ดินคลองหลวง no.9	9.9×10^4	2.1×10^5	1.5×10^5
6. ดินเลน no. 1	4.5×10^4	1.75×10^4	1.25×10^4
7. 4415	2.97×10^4	2.6×10^4	1.75×10^5
8. 3A	4.5×10^4	3.4×10^4	9.2×10^4

* CFU = หน่วยโคโลนี

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในการทดลองควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา ในเรือนทดลองเป็นเวลา 45 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณประชากรของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (CFU* / ดิน 1 กรัม)		
เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1. ดินชุมพร no. 1	1.26×10^5	6.75×10^4	9.9×10^6
2. ปุ๋ยคอก no.1	1.035×10^5	2.5×10^6	1.05×10^6
3. รากอ้อย no.6	1.35×10^4	9.0×10^4	1.16×10^5
4. ดินรากยาสูบ no.4	7.65×10^4	9.0×10^5	6.7×10^6
5. ดินคลองหลวง no.9	1.485×10^4	2.7×10^3	2.75×10^3
6. ดินเลน no. 1	1.53×10^5	1.935×10^4	9.6×10^5
7. 4415	1.225×10^4	1.485×10^4	5.6×10^3
8. 3A	2.79×10^5	2.835×10^5	7.8×10^6

* CFU = หน่วยโคโลนี

ตารางที่ 5 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา ในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	**การเกิดโรค %** -1/			**การควบคุมโรค %** -2/		
	ก.ค.	**ส.ค.**	**ก.ย.**	**ก.ค.**	**ส.ค.**	**ก.ย.**
1. เชื้อปฏิปักษ์ ดินคลองหลวง	10	24	62	90	76	38
2. เชื้อปฏิปักษ์ ดินเลน	6	23	69	94	77	31
3. เชื้อปฏิปักษ์ อ้อย 6	6	24	60	94	76	40
4. เชื้อปฏิปักษ์ 4415	9	19	57	91	81	43
5. control	21	44	78	79	56	22

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

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

ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา ในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**			**เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค**		
	55 วัน	**85 วัน**	**120 วัน**	**55 วัน**	**85 วัน**	**120 วัน**
1 4415	0.83	20.83	60.83	99.17	79.17	39.17
2 ดินอ้อย 6	4.17	38.33	65.83	95.83	61.67	34.17
3 4415+อ้อย 6	2.50	28.33	53.33	97.50	71.67	46.67
4 control	2.50	34.17	75.00	97.50	65.83	25.00