

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ

Efficiency of Antagonistic Microorganisms on Control of Bacterial Wilt of Tomato

เวียงคำ จันทวงศ์ อนันต์ หิรัญสาลี* วีระศักดิ์ ตักศิรรัตน์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล

Viangkham Chanthavong, Anan Hiransalee*, Weerasak Saksirirat, and Petcharat Thummabenjapone

Abstract

Antagonists, *Streptomyces*-15 and *Trichoderma harzianum* were selected from laboratory test on inhibition of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt of tomato. The two antagonists were then evaluated for control of the disease in greenhouse. In each potted soil planted to tomato were inoculated with *R. solanacearum* at concentration of 2×10^8 cfu/ml at 5 cc/pot and with or without 3,000 eggs of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) per pot. Treatments of antagonists, single or combined, composed of *Streptomyces*-15 cultured in peat moss and *T. harzianum* cultured in steamed sorghum grain substrate, each amended at the rate of 10 g/pot. The fungicide copper oxychloride was also used as a compared treatment. After 4 weeks, the results showed that *T. harzianum* gave better control of the disease than *Streptomyces* did. Combined treatment of the two antagonists produced greater disease control effect than single one. However, The presence of nematode reduced the efficiency of the antagonists. Copper oxychloride could not reduce wilting incidence of tomato. Treatments of the antagonists showed no effect on fresh shoot weight of tomato at 4 weeks.

Keywords: Antagonist, bacterial wilt of tomato, *Ralstonia solanacearum*, root-knot nematode, *Streptomyces*, *Trichoderma harzianum*

บทคัดย่อ

จากการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉา (bacterial wilt) ของมะเขือเทศในห้องปฏิบัติการ ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ 2 ชนิด คือ *Streptomyces*-15 และ *Trichoderma harzianum* เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวเฉากับมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

ในกระถางบรรจุดินฆ่าเชื้อที่ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในรูปเซลล์แขวนลอยหนาแน่น 2×10^8 cfu/ml ปริมาณ 5 มล./กระถาง ซึ่งใส่หรือไม่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* 3,000 ไข่/กระถาง โดยใส่เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-15 ที่เลี้ยงใน peat moss และเชื้อปฏิปักษ์ *T. harzianum* ที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างหนึ่ง ทั้งใส่เดียวและใส่ร่วมกัน ปริมาณเชื้อละ 10 มล./กระถาง เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี copper oxychloride เมื่อทดสอบครบ 4 สัปดาห์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. harzianum* ลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศได้ดีกว่า *Streptomyces*-15 การใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองร่วมกันมีแนวโน้มว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เพียงแบบเดียวๆ แต่เมื่อในดินนั้นมีไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมด้วยประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาจะลดลง สารเคมี copper oxychloride ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคนี้ได้ การใช้เชื้อปฏิปักษ์ไม่พบว่ามีผลต่อน้ำหนักต้นสดของมะเขือเทศในช่วงที่ทดสอบ

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โรคเหี่ยวเฉา ไส้เดือนฝอยรากปม *Ralstonia solanacearum* *Streptomyces* *Trichoderma harzianum*

บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจจากมีคุณค่าทางอาหารสูง ซึ่งประกอบด้วยวิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด ผลมะเขือเทศนอกจากใช้ประกอบเป็นอาหารในรูปผลสดแล้วยังสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปได้มากมาย ในการผลิตมะเขือเทศมักประสบปัญหาการเกิดโรครบาดมาก โดยเฉพาะโรคเหี่ยวเฉาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทำให้ความเสียหายให้กับพืชหลายร้อยชนิดตามแหล่งปลูกต่างๆ ทั่วโลก เชื้อสาเหตุอยู่ในดิน สามารถแพร่ระบาดโดยติดไปกับเครื่องมือการเกษตร ดินกล้าพืช ดิน และไหลไปกับน้ำ ในฤดูฝนที่มีฝนตกชุกจะมีการระบาดของโรครุนแรง (Hayward, 1991) เชื้อสาเหตุเข้าสู่พืชได้ทางราก เข้าสู่ระบบท่อน้ำ และเจริญเติบโตภายในลำต้นพืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหารทั้งที่ลำต้นและรากกลายเป็นสีน้ำตาล และเกิดการอุดตันระบบท่อน้ำของพืช จึงเป็นสาเหตุให้พืชแสดงอาการเหี่ยว (Saile et al., 1997) นอกจากนั้นในดินที่มีไส้เดือนฝอย โดยเฉพาะไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) รากพืชจะเกิดผลจาก

การดูดกินของไส้เดือนฝอย ทำให้เชื้อรา แบคทีเรีย สาเหตุโรคพืชเข้าไปในรากง่ายขึ้น และทำให้อาการของโรคพืชรุนแรงขึ้น (สืบทัด, 2525)

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมโรคที่ได้ผลดี ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารเคมี พันธุ์ต้านทาน และการเกษตรกรรมที่ง่ายต่อการปฏิบัติ จากการที่มีรายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Streptomyces* spp. มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดในสภาพห้องปฏิบัติการ เช่น *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม (Yaerum et al., 2006) เชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของพริกและมะเขือเทศ (เพชรรัตน์ และ อนันต์, 2547) และเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* (Shen et al., 2004) และไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ได้ (Sharon et al., 2001) จึงน่าจะนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้มาใช้ควบคุมหรือลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวเฉา

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1) ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ และ
- 2) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสภาพที่มีไส้เดือนฝอยอยู่ร่วม

วิธีการศึกษา

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ (ได้รับการอนุเคราะห์จาก อาจารย์ยอนันต์ วงเจริญ) เลี้ยงเชื้อโดยวิธี streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง สำหรับนำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย จากนั้นวัดค่า OD_{600 nm} และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2×10^8 cfu/ml เพื่อทำ spread plate ในจานเลี้ยงเชื้อของอาหารทดสอบ ในปริมาณ 1 มล./จานเลี้ยง สำหรับการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

1.1 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต (isolate) คือ *Streptomyces*-15 และ *Streptomyces* -87 ซึ่งมีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* (เพชรรัตน์ และอนันต์, 2547) (ได้รับการอนุเคราะห์มาจาก ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล) นำมาเลี้ยงบนอาหาร arginine-glycerol mineral salt agar (AGMA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Streptomyces* เจริญ แล้วนำไปวางบนอาหาร AGMA และอาหาร TZC ที่ทำ spread plate เชื้อ *R. solanacearum* ในปริมาณ 1 มล./จานเลี้ยงไว้แล้ว โดยวาง *Streptomyces* ทั้ง 2 ไอโซเลตไว้ห่างและตรงข้ามกัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน วัดขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อไอโซเลต

1.2 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เชื้อ *Bacillus* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Bacillus* -BFP029 ซึ่งมีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคทาง

ดินของพืชผัก (สุปรียา, 2546) (ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์) นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Bacillus* เจริญ แล้วนำไปวางบนอาหาร NA และอาหาร TZC ที่ทำ spread plate เชื้อ *R. solanacearum* ในปริมาณ 1 มล./จานเลี้ยงไว้แล้ว โดยวางไว้ตรงกลาง นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน วัดขนาดความกว้างวงใสที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

1.3 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

เชื้อ *Trichoderma* จำนวน 4 ไอโซเลต คือ *T. harzianum*, *T. asperellum*, *Trichoderma*-4, และ *Trichoderma*-17 ซึ่งมีศักยภาพดีในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์) นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Trichoderma* เจริญ แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA และ อาหาร TZC ที่ทำ spread plate เชื้อ *R. solanacearum* ในปริมาณ 1 มล./จานเลี้ยงไว้แล้ว โดยวางไว้ 4 ด้าน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน วัดขนาดความกว้างวงใสที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อไอโซเลต

1.4 การทดสอบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Streptomyces*-15 และ *Trichoderma harzianum*

เพื่อทดสอบว่าสามารถใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองร่วมกันได้หรือไม่ จึงได้ทดสอบโดยการจัดวางเชื้อในลักษณะที่ต่างกันบนอาหารชนิดต่างกัดังนี้

1.4.1 เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*-15 บนอาหาร AGMA โดย 2 แบบ ได้แก่ 1) เลี้ยงเชื้อไว้ 1/2 ของจานเลี้ยง และ 2) เลี้ยงเชื้อเต็มจานเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อ *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน โดยใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อ *T. harzianum* เจริญ ไปวางไว้ตรงข้ามกับ *Streptomyces* -15 ที่เลี้ยงไว้ 1/2 ของจานเลี้ยง และวาง 4 จุด ไว้บน

เชื้อ *Streptomyces*-15 ที่เลี้ยงไว้เต็มจานเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ 2 ชนิด

1.4.2 เลี้ยงเชื้อ *T. harzianum* โดยวิธีวางเชื้อไว้ตรงกลางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยง จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Streptomyces*-15 เจริญบนอาหาร AGMA 5 วัน นำไปวางไว้ 4 จุด รอบเชื้อ *T. harzianum* บนอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ 2 ชนิด

2. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาในสภาพเรือนทดลอง

2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพจากการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ได้ 2 เชื้อ คือ *Streptomyces*-15 กับ *Trichoderma harzianum*

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*-15 บนอาหาร AGMA นาน 5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อลงบนอาหาร AGMB 100 มล. ใน flask ขนาด 250 มล. เขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน กรองเก็บเส้นใยเชื้อ และนำไปปั่นด้วยเครื่อง hamogynizer ความเร็ว 1,600 rpm จากนั้น วัดค่า OD_{600nm} = 9 ปลุกเชื้อลงใน peat moss 1 ลิตรในถุงพลาสติก ในปริมาณ 50 มล./ถุง บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิ 32 °ซ. นาน 1 เดือน จึงนำไปใช้ทดสอบในเรือนทดลอง ในปริมาณ 10 กรัม/กระถาง สำหรับ 64 กระถาง

เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* บนอาหาร PDA ให้มีอายุ 2 วัน ย้ายเชื้อลงเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างนี้ บ่มเชื้อไว้ในตู้อุณหภูมิ 32 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปใช้ทดสอบในเรือนทดลอง ในปริมาณ 10 กรัม/กระถาง สำหรับ 64 กระถาง

2.2 การเตรียมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉา

เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

สำหรับนำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบบคัสตี้จากนั้นวัดค่า OD_{600 nm} ที่ $10^{-1} = 0.225$ OD และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2×10^8 cfu/ml เพื่อนำไปใช้ทดสอบในเรือนทดลอง ในปริมาณ 5 มล./ กระถาง สำหรับ 160 กระถาง

2.3 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita*

นำรากมะเขือเทศที่เกิดปมมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดรากเป็นชิ้นสั้นๆ ขนาด 2 ซม. แช่และกวนในสารละลาย NaOCl 1 % (V/V) นาน 4 นาที เพื่อละลายสารเหนียวที่ห่อหุ้มกลุ่มไข่ รินน้ำที่มีไข่ไส้เดือนฝอยผ่านตะแกรงร่อนหยาบขนาด 32 mesh โดยมีอ่างพลาสติกรองรับอยู่ด้านล่าง ใช้สายยางฉีดน้ำไล่ไข่ไส้เดือนฝอยที่ตกค้างบนตะแกรงลงในอ่างพลาสติก รีบเติมน้ำในอ่างพลาสติกเพื่อเจือจาง NaOCl จากนั้นรินน้ำในอ่างพลาสติกผ่านตะแกรงร่อนละเอียดขนาด 500 mesh ใช้สายยางฉีดไล่ไข่ซึ่งค้างบนตะแกรงละเอียดลงอ่างพลาสติก แล้วเติมน้ำในอ่างอีก ก่อนเทผ่านตะแกรงร่อนละเอียด ล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อล้าง NaOCl ออกจากนั้นทำเป็นไข่แขวนลอยในน้ำ (egg suspension) สุ่มตัวอย่างไปนับปริมาณไข่ในน้ำ 5 มล. เพื่อคำนวณความหนาแน่นของไข่ แล้วเจือจางให้ได้ความหนาแน่น 300ไข่/มล. เพื่อใช้ในปริมาณ 10 มล./กระถาง (ซึ่งเท่ากับปริมาณไข่ 3,000 ไข่/กระถาง) สำหรับ 80 กระถาง

2.4 การทดสอบกับพืช

ใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) 4 ซ้ำ โดยจัดหน่วยทดลองเป็น 11 treatment (T) ที่ไม่ใส่หรือไม่ใส่เชื้อ *R. solanacearum* (R), *Streptomyces* (S), *T. harzianum* (T), ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (N), และ สารเคมี copper fungicide (C) ตาม Table 1 แต่ละ treatment มี 4 กระถาง ซึ่งเป็นกระถางพลาสติกสีดำขนาด Ø 12 ซม. บรรจุดินฆ่าเชื้อปริมาณ 100 กรัม/กระถาง ทำหลุมปลูกแล้วใส่เชื้อหรือสารเคมีหรือน้ำตามที่กำหนด แล้วปลูกกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน ที่เพาะใน peat moss กระถางละ 1 ต้น

Treatment ที่มีเชื้อสาเหตุโรค *R. solanacearum* (R) (T1-T10) ใส่เซลล์แขวนลอยของเชื้อในปริมาตร 5 มล./กระถาง, treatment ที่มีเชื้อปฏิปักษ์แต่ละชนิด (S สำหรับ T1, T3, T6, T8 และ T สำหรับ T2, T3, T7, T8) ใส่เชื้อที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะ ในปริมาณ 10 กรัม/กระถาง, treatment ที่มีไส้เดือนฝอย (N) (T5 - T9) ใส่ไข่แขวนลอยในน้ำ ในปริมาตร 10 มล./กระถาง (3,000ไข่/กระถาง), treatment ที่ใส่สารเคมี (C) (T4, T9 ใส่สารเคมีที่เตรียมไว้แล้ว ในปริมาตร 50 มล./กระถาง, และ treatment ที่เป็น check (T11) ใส่ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มล./กระถาง

จัดวางกระถางไว้บนโต๊ะในเรือนทดลอง โดยที่ในแต่ละ treatment ของแต่ละซ้ำ วางทั้ง 4 กระถางไว้ชิดกัน รดน้ำทุกวัน

2.5 การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบอาการและบันทึกการเกิดโรค ทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ ให้คะแนนความรุนแรงการเกิดโรค (เหี่ยว 5 ก้านขึ้นไป) ของแต่ละ treatment (4 ต้น หรือ กระถาง) เป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้: เหี่ยว 1 ต้น = 25%; เหี่ยว 2 ต้น = 50 %; เหี่ยว 3 ต้น = 75 %; และ เหี่ยว 4 ต้น = 100%

Table 1 Treatment compositions with different test materials for studying efficiency of two antagonistic microorganisms on control of bacterial wilt of tomato in greenhouse condition.

Treatment	Pathogen	Amount/pot	Antagonist/ Chemical	Amount/pot
T1 = R+S	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>Streptomyces</i> - 15	10 g substrate
T2 = R+T	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>T. harzianum</i>	10 g substrate
T3 = R+S+T	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>Streptomyces</i> - 15 <i>T. harzianum</i>	10 g substrate 10 g substrate
T4 = R+C	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	copper fungicide	50 ml application dosage
T5 = R+N	<i>R. solanacearum</i> <i>M. incognita</i>	5 ml suspension 3,000 eggs	-	-
T6 = R+N+S	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>Streptomyces</i> - 15	10 g substrate
T7 = R+N+T	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>T. harzianum</i>	10 g substrate
T8 = R+N+S+T	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	<i>Streptomyces</i> - 15 <i>T. harzianum</i>	10 g substrate 10 g substrate
T9 = R+N+C	<i>R. solanacearum</i> <i>M. incognita</i>	5 ml suspension 3,000 eggs	copper fungicide	50 ml application dosage
T10 = R	<i>R. solanacearum</i>	5 ml suspension	-	-
T11 = check	-	5 ml distilled water	-	-

ซึ่งน้ำหนักสดของต้นที่ยังไม่ตาย (จาก 4 กระถาง ในแต่ละ treatment) เมื่อครบ 4 สัปดาห์ แล้ว หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนต้นที่ยังไม่ตาย

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance) และเมื่อตรวจความแตกต่างทางสถิติจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วย

ผลการศึกษา

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* ทั้ง 2 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (*R. solanacearum*) ได้ดีบนอาหาร AGMA โดยวงใสที่เกิดขึ้นจาก *Streptomyces*-15 มี

ขนาดใหญ่กว่าวงใสจาก *Streptomyces*-87 ขณะที่บนอาหาร TZC นั้น ทั้ง 2 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ได้น้อยกว่าบนอาหาร AGMA (วงใสที่ปรากฏบนอาหาร มีขนาดเล็ก) (Table 2)

เชื้อ *Bacillus* BFP02 บนอาหาร NA และ TZC ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้น้อย (วงใสที่ปรากฏบนอาหารมีขนาดเล็ก) (Table 2)

เชื้อ *T. harzianum*, และ *Trichoderma*-17 (T-17) บนอาหาร PDA และ TZC และ *T. asperillum* บนอาหาร TZC สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ใกล้เคียงกับ *Streptomyces* ทั้ง 2 ไอโซเลต บนอาหาร TZC ส่วน *Trichoderma*-4 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (ไม่ปรากฏมีวงใสเกิดขึ้น) บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (Table 2)

Table 2 Inhibition of *Ralstonia solanacearum* by antagonistic microorganisms *Streptomyces*, *Bacillus* and *Trichoderma* on some selective media.

Antagonists		Selective medium	Inhibition zone (Ø mm)
<i>Streptomyces</i>	<i>Strep</i> -15	AGMA	22.8
	<i>Strep</i> -87	"	17.2
	<i>Strep</i> -15	TZC	10.4
	<i>Strep</i> -87	"	10.2
<i>Bacillus</i>	BFP029	NA	6.2
		TZC	5.6
<i>Trichoderma</i>	<i>T.4</i>	PDA	0
	<i>T.17</i>	"	10
	<i>T. asperillum</i>	"	6
	<i>T. harzianum</i>	"	10
	<i>T.4</i>	TZC	0
	<i>T.17</i>	"	9.6
	<i>T. asperillum</i>	"	9.4
	<i>T. harzianum</i>	"	9.6

AGMA = arginine-glycerol mineral salt agar; TZC = tetrazolium chloride agar; NA = nutrient agar; PDA = potato dextrose agar.

เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* และ *Trichoderma* spp. เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA และ AGMA ไม่ปรากฏว่าเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (ไม่ปรากฏมีวงใสเกิดขึ้นบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 พบกัน)

2. ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวเฉาในสภาพเรือนทดลอง

2.1 พัฒนาการของโรค

ในสัปดาห์แรก treatment ที่เกิดโรคเหี่ยวเฉามาก (เกิน 50%) ได้แก่ treatment ที่มีเชื้อสาเหตุโรค (*R. solanacearum*) และในสภาพที่ไม่มีเชื้อปฏิปักษ์หรือสารเคมี (R หรือ T10 และ R+N หรือ T5) สำหรับ treatment ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคน้อยมาก และ treatment ที่มีการใช้สารเคมี (R+C

หรือ T4 และ R+N+C หรือ T9) เกิดโรคสูงกว่า การใช้เชื้อปฏิปักษ์ (Fig. 1A)

ในสัปดาห์ที่ 2 การเกิดโรคเหี่ยวเฉาเพิ่มขึ้น treatment ที่เกิดโรคมก (เกิน 60%) ได้แก่ treatment ที่ไม่มีเชื้อปฏิปักษ์ (T4, T5, T9, T10) และ มีเชื้อ *Streptomyces* แต่มีไส้เดือนฝอยอยู่ด้วย (R+N+S หรือ T6) ที่เกิดโรคมกที่สุดคือ treatment ที่มีเฉพาะเชื้อสาเหตุโรค (T10) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 93.75% เพิ่มจากสัปดาห์แรกที่เกิดโรค 68.75% (Fig. 1B)

ในสัปดาห์ที่ 3 ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นทุก treatment โดยเฉพาะใน treatment ที่ไม่มีเชื้อปฏิปักษ์ควบคุมเลย (T4, T5, T9, T10) นอกจากนั้นใน treatment ที่มีการใช้เชื้อ *Streptomyces* อย่างเดียว (T1,

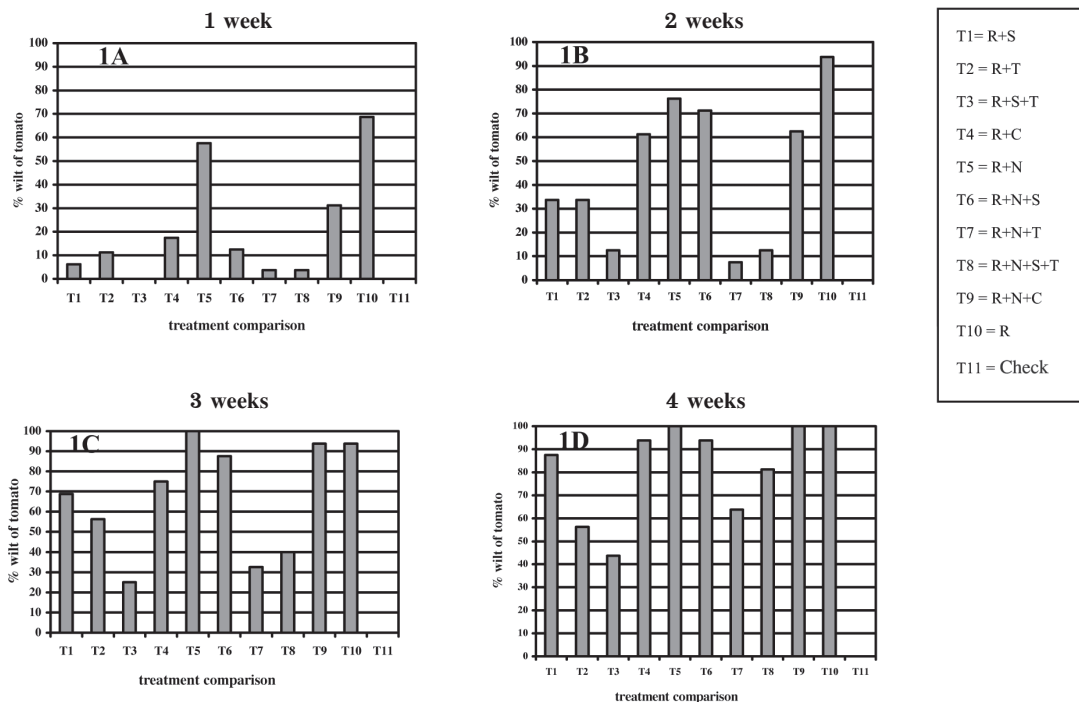


Fig.1 Wilt incidence of tomato after treated with the pathogen *Ralstonia solanacearum* and antagonistic microorganisms *Streptomyces*-15 and *Trichoderma harzianum* or copper fungicide in a greenhouse test.

T6) เกิดโรครุนแรงกว่าการใช้ *Trichoderma* อย่างเดียว (T2, T7) โดยเฉพาะเมื่อมีไส้เดือนฝอยอยู่ด้วย (R+N+S หรือ T6) เมื่อใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกัน (R+S+T หรือ T3, R+N+S+T หรือ T8) เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการใช้เชื้อ *Streptomyces* อย่างเดียว (Fig. 1C)

การพัฒนาการของโรคเหี่ยวเฉาเมื่อครบ 4 สัปดาห์ พบว่า treatment ที่ไม่มีเชื้อปฏิปักษ์เลยได้แก่ T4, T5, T9, และ T10 เกิดโรค 93.75 - 100% ส่วน treatment ที่มีการใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* อย่างเดียว และ treatment ที่มีไส้เดือนฝอยอยู่ด้วย ไม่ว่าจะเป็นเชื้อ *Streptomyces* อย่างเดียว หรือใช้ร่วม *Trichoderma* (R+N+S และ R+N+S+T) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครุนแรงขึ้น การใช้ *Trichoderma* ในสภาพที่มีไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมด้วย การเกิดโรคจะสูงกว่าเมื่อไม่มีไส้เดือนฝอยเพียงเล็กน้อย ส่วนการใช้สารเคมี copper fungicide (R+C, R+N+C) ไม่สามารถควบคุมโรคได้ (Fig. 1D) (Table 3)

Table 3 Effects of antagonists *Streptomyces* (S), *Trichoderma harzianum* (T) and root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) (N) on wilt incidence caused by *Ralstonia solanacearum* (R) and growth of tomato at 4 weeks in greenhouse.

Treatment	% Wilt	Fresh weight (g)
T1 = R+S	87.50 ab	6.49
T2 = R+T	56.25 bc	4.12
T3 = R+S+T	43.75 c	5.11
T4 = R+C	93.75 a	4.18
T5 = R+N	100.00 a	ND
T6 = R+N+S	93.75 a	4.55
T7 = R+N+T	63.75 abc	5.28
T8 = R+N+S+T	81.25 ab	4.44
T9 = R+N+C	100.00 a	ND
T10 = R	100.00 a	ND
T11 = W	0.00 d	6.51
C. V. (%)	22.44	-

Means within column followed by the same letter are not significantly different at $P > 0.01$ according to DMRT.
C = copper fungicide; W = distilled water; ND = No data due to early death of plants.

2.2 ผลของเชื้อปฏิปักษ์และไส้เดือนฝอยรากปมต่อความรุนแรงของโรคเหี่ยวเหี่ยวและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

ผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวเหี่ยวเมื่อครบ 4 สัปดาห์ พบว่า การใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* (R+S) ลดความรุนแรงของโรคได้เพียงเล็กน้อย ขณะที่เชื้อปฏิปักษ์ *Trichoderma* (R+T) ควบคุมโรคได้ดี ($P < 0.01$) การใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกันทั้ง 2 ชนิด (R+S+T) สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อมีไส้เดือนฝอยอยู่ร่วม (R+N+S, R+N+T, R+N+S+T) ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโดยเชื้อปฏิปักษ์จะลดลง โดยเฉพาะการใช้เชื้อ *Streptomyces* อย่างเดียว (R+N+S) ไม่สามารถควบคุมโรคได้ (Table 3)

สารเคมี copper oxychloride แม้ไม่มีไส้เดือนฝอยร่วม (R+N+C, R+C) ก็ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคนี้ได้

การใช้เชื้อปฏิปักษ์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ ในช่วง 4 สัปดาห์ที่ทดสอบ เมื่อดูจากน้ำหนักสดของต้น (Table 3)

วิจารณ์

จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-15 และ *Streptomyces*-87 ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (*R. solanacearum*) ได้ดีบนอาหาร AGMA โดยที่ *Streptomyces*-15 ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้มากที่สุด ขณะที่บนอาหาร TZC นั้น *Streptomyces* ทั้ง 2 ไอโซเลต ยับยั้งได้น้อยกว่า ซึ่งใกล้เคียงกับประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Trichoderma*-17 (T-17) บนอาหาร PDA และอาหาร TZC และของเชื้อ *T. asperellum* บนอาหาร TZC เชื้อ *Bacillus* BFP02 บนอาหาร NA และ TZC ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้น้อย และเชื้อ *Trichoderma*-4 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ และเมื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-15 และ *Trichoderma harzianum* นำมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA และ AGMA ก็ไม่ปรากฏว่าเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน

จึงได้คัดเลือกเชื้อ *Streptomyces*-15 และ *T. harzianum* ไปใช้ในการทดสอบร่วมกันในสภาพเรือนทดลอง

ผลการทดสอบในเรือนทดลองจะเห็นว่าเชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้ซึ่งใส่ครั้งเดียวพร้อมเชื้อสาเหตุโรคตอนปลูกพืช สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ในช่วง 2 สัปดาห์แรก (กรณีที่ไม่มีไส้เดือนฝอยร่วม) หลังจากนั้นประสิทธิภาพได้ลดลง (พืชเป็นโรคมากขึ้น) อาจเป็นไปได้ที่เชื้อสาเหตุโรคสามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วและมากกว่าเชื้อปฏิปักษ์ เนื่องจากมีตัวอย่างการทดลองที่พบว่าการใส่เชื้อปฏิปักษ์ โดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces* มากกว่า 1 ครั้ง สามารถยืดช่วงเวลาการควบคุมโรคได้นานขึ้น (เพชรรัตน์ และอัสณี, 2548)

ผลการทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวเหี่ยวเมื่อครบ 4 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* (R+S) ลดความรุนแรงของโรคได้เพียงเล็กน้อย ขณะที่เชื้อปฏิปักษ์ *Trichoderma* (R+T) ควบคุมโรคได้ดี การใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกันทั้ง 2 ชนิด (R+S+T) สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อมีไส้เดือนฝอยอยู่ร่วม (R+N+S, R+N+T, R+N+S+T) ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโดยเชื้อปฏิปักษ์จะลดลง โดยเฉพาะการใช้เชื้อ *Streptomyces* อย่างเดียว (R+N+S) ไม่สามารถควบคุมโรคได้

ได้มีรายงานการศึกษาใช้เชื้อ *Streptomyces* และเชื้อ *Trichoderma* ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *R. solanacearum* หลายราย พบว่าบทบาทของเชื้อทั้งสองล้วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะ (เพชรรัตน์ และอนันต์, 2547 และ Shen et al., 2004, ตามลำดับ) แม้ว่าเชื้อ *Trichoderma* มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Inbar et al., 1994) แต่การทดสอบในครั้งนี้ปรากฏผลไม่เด่นชัดในด้านการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการที่เชื้อ *Trichoderma* สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าเชื้อ *Streptomyces* อาจเป็นผลมาจากการส่งเสริมความแข็งแรงของพืชหรือการกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานโรคด้วย (Yedida et al., 1999)

ไส้เดือนฝอยนอกจากแย่งสารอาหารจากรากพืชแล้วยังทำให้รากพืชเกิดบาดแผลที่เป็นช่องทางให้เชื้อโรค

ชนิดอื่นในดินเข้าทำลายรากได้ง่ายขึ้นด้วย โดยเฉพาะในกรณีของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* (Hayward, 1991) รวมทั้งพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมยังมีบทบาทเสริมกัน (synergistic effect) ให้โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวรุนแรงขึ้น โดยเพิ่มระดับความอ่อนแอ (susceptibility) ของพืชต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค นอกเหนือจากบทบาทในการทำให้เกิดแผลที่ราก (Deberdt et al., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าทั้งเชื้อ *Streptomyces* และ *Trichoderma* สามารถทำให้ตัวอ่อน (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวนหนึ่งหยุดการเคลื่อนไหว (immobilized) ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และลดการเป็นโรครากปมได้ใน การทดสอบในเรือนทดลอง (Chubachi et al., 1999 และ Sharon et al., 2001, ตามลำดับ) แต่ความรุนแรงของโรคเหี่ยวในแปลงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม ยังสูงกว่าแปลงที่ไม่มีไส้เดือนฝอย แสดงว่าปริมาณของไส้เดือนฝอยที่เหลือจากการที่อาจถูกเข้าทำลายโดยเชื้อปฏิปักษ์ทั้งสอง ก็ยังเพียงพอต่อการส่งเสริมให้เชื้อ *R. solanacearum* เข้าทำลายมะเขือเทศได้ง่าย ส่งผลให้เกิดโรครุนแรงมากขึ้นได้

สรุปผลการศึกษา

1. การทดสอบประสิทธิภาพภายในห้องปฏิบัติการ

1.1 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *antagonists* ทั้ง 2 ชนิดคือ *Streptomyces* spp. และ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้ง เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในสภาพห้องปฏิบัติการได้

1.2 เชื้อ *Streptomyces* ที่ทดสอบบนอาหาร AGMA ยับยั้ง *R. solanacearum* ได้ดีกว่าบนอาหาร TZC และบนอาหาร AGMA เชื้อ *Streptomyces*-15 มีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อ *Streptomyces*-87

1.3 เชื้อ *Trichoderma harzianum* (Th), *T. asperellum* (Ta), และ *Trichoderma* -17 (T-17) บนอาหาร TZC และ Th และ T-17 บนอาหาร PDA ยับยั้ง *R. solanacearum* ได้ใกล้เคียงกับ *Streptomyces* บนอาหาร TZC ส่วน Ta บนอาหาร PDA และ

Bacillus-BFP029 ยับยั้งได้น้อย และ *Trichoderma* T4 ไม่สามารถยับยั้งได้เลย

1.4 เชื้อ *Streptomyces*-15 และ *T. harzianum* ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน

2. การทดลองควบคุมโรคเหี่ยวเหี่ยวในสภาพเรือนทดลอง

2.1 เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-15 และ *T. harzianum* มีความสามารถควบคุมโรคได้ในระดับหนึ่ง และการใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกันทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามีไส้เดือนฝอยเข้าร่วมด้วย ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจะลดลง

2.2 ในกรณีที่มีไส้เดือนฝอยร่วมด้วย เชื้อปฏิปักษ์ *T. harzianum* สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-15

2.3 สารเคมี copper fungicide ที่ใช้ทดสอบ ไม่สามารถควบคุมโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Rockefeller Foundation ที่ได้สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อนันต์ วงเจริญ. 2547. คุณสมบัติของสาร Secondary metabolites จากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช. การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547. วันที่ 26-27 มกราคม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และอัครณี ปาจิณบรรพณ์. 2548. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรค

- เหี่ยวเหี่ยวมะเขือเทศ-พริก. หน้า 384-394 ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ณ จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 2-4 พฤศจิกายน 2548.
- สุปรียา หมั่นกุล, นิวัธ เสนาะเมือง, พิศาล ศิริธร และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2546. ประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. จากแหล่งต่างๆ ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิด. การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2546. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2525. ไล่เดือนฝอยรากปม-ปัญหาระดับโลก. วารสารโรคพืช 2: 23-26.
- Chubachi, K., M. Furukawa, S. Fukuda, S. Takahashi, S. Matsumura, H. Itagawa, T. Shimizu, and A. Nakagawa. 1999. Control of root-knot nematodes by *Streptomyces*: screening of root-knot nematode-controlling actinomycetes and evaluation of their usefulness in a pot test. Japanese Journal of Nematology 29(2): 42-45.
- Deberdt, P., P. Queneherve, A. Darrasse, and P. Prior. 1999. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathology 48:408-414.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- Inbar, J., M. Abramsky, D. Cohen, and I. Chet. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. European Journal of Plant Pathology 100:337-346.
- Saile, E., J.A. McGarvey, M.A. Schell, and T.P. Denny. 1997. Role of extra cellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonisation of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 87: 1264-1271.
- Sharon, E., M. Bar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Kleifeld, and Y. Spiegel. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91: 687-693.
- Shen, Q., X. Chen, C. Sun, and Y. Zhang. 2004. Isolation, purification and identification of three peptaibols from *Trichoderma koningii* with antibiotic activity against *Ralstonia solanacearum*. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.) 30(4):439.
- Yaerum, C., P. Thummabenjapone, and A. Pachinburavan. 2006. Suitable medium for increasing biomass of antagonistic *Streptomyces* spp. Against bacterial fruit blotch disease of watermelon. Khon Kaen Agriculture Journal, 34(1):12-19.
- Yedidia, I., N. Benhamou, and I. Chet. 1999. Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environmental Microbiology 65:1061-1070.