การควบคุมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* Ehrenberg

Controlling of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, a Causal Agent of Potato Bacterial Wilt by *Bacillus subtilis* Ehrenberg

วงศ์ บุญสืบสกุล [1/]

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ [1/]

Wong Boonsuebsakul [1/]

Piyarat Thammakitchawat [1/]

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/]

รุ่งนภา คงสุวรรณ์ [1/]

Nuttima Kositcharoenkul [1/]

Rungnapha Khongsuwan [1/]

ABSTRACT

Collection of the potential antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* (Rs) casual bacterial wilt disease from soil, and root (rhizoplanes) were made from eighteen provinces. The samples of the former material were taken from non disease plant in disease severity infection of several crops area namely potato, tomato, pepper, eggplant and ginger. Three hundred nineteen bacterias were isolated by general King-B medium and had been screening for growth inhibition property against *R. solanacearum* by direct bioassay methed. 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 fifteen isolates antagonized on *R. solanacearum*, inhibited with strongly clear zone 4-20.75 mm by its culture and 6.25-25.00 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 23.4 – 80 % but could not control on post diseased condition. These 5 antagonists were

[1/] กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

[1/] Plant Pathology Research Group, Crop Protection Research and Development Office, Department of Agriculture Chatchak, Bangkok 10900

effective in field condition and the striking outcomes were obtained at Tak Horticulture Research Station in the northern of Thailand on 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 at 15.8 – 44.9 %. The same trials were also conducted at bigger areas (farm trial) in 2 locations at Chaing Mai and Kanchanaburi provinces during 2004-2005. The results showed that these antagonists are strikingly effective control at 66.6 – 85.6 % of this notorious wilt disease. Furthermore, the treatment with the antagonists promoted well the potato yields in non-disease condition trial higher than control treatment. A novel method which was invented for rapid identification of bacteria by using TLC with aminolipids was successfully applied for the identification of these antagonistic bacteria. The 5 antagonists were identified as *Bacillus subtilis* which the common spot at Rf. 0.36 existed on their TLC chromatogram. DOA.WB4 was shown higher performance of biocontrol agent for potato bacterial wilt than others.

Key words: antagonistic bacteria, *Bacillus* sp., bio-control agent, soil-borne disease

บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินและรากบริเวณ rhizoplane ของพืชที่ไม่แสดงอาการโรคสภาพสมบูรณ์แข็งแรง ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Rs) ของมันฝรั่ง พริก มะเขือเทศ มะเขือยาวและขิง 104 ตัวอย่างจาก 18 จังหวัด แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคดังกล่าว ด้วยอาหาร King's B เก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้จำนวน 319 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรีย ดังกล่าวทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Rs โดยการทดสอบแบบ direct bioassay ด้วยวิธี Disc Diffusion และ Double Layer Culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท โดยแสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ดี มีขนาด 4-20.75 มล. จากการทดสอบเชื้อมีชีวิต และ 6.25-25.00 มล. จากการใช้อาหารกรองของเชื้อ เลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 5 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในโรงเรือนปลูกพืชทดลองในสภาพก่อนและหลังการเป็นโรค โดยก่อนปลูก

แช่รากถึงโคนต้นของต้นกล้ามะเขือเทศด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อัตราความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนี/มล. นาน 2-3 นาที แล้วราดด้วยสารละลายเชื้อเดียวกันอัตราความเข้มข้น 10^6 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 10 มล./กระถาง 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ แต่ไม่สามารถควบคุมโรคได้ถ้าเชื้อเข้าทำลายพืชนั้นแล้ว พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของกรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนที่พืชจะเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีเปรียบเทียบ สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ 23.4 ถึง 80.0 % การตรวจสอบปริมาณเชื้อ Rs ในดินบริเวณรากมะเขือเทศพบว่าทุกกรรมวิธีของเชื้อปฏิปักษ์มีประชากรเชื้อสาเหตุโรคลดลง ทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองโดยการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูก ด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกับที่ใช้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และราดด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกันปริมาตร 10 มล./หลุม 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีของการใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ 15.8 ถึง 44.9 % และมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรค พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคดังกล่าวได้ 66.6 – 85.6 % ให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ การทดสอบในสภาพแปลงที่ไม่มีการระบาดของโรค พบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบเช่นกัน การจำแนกชนิด (species) โดยวิธี Thin-layer chromatography พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ คือ DOA.WB 4 (Department of Agriculture, Wong Boonsuebsakul)

คำหลัก: เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ตัวควบคุมชีวภาพ เชื้อแบซิลัส โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ดิน

คำนำ

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ที่ทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งเพราะพบเชื้อสาเหตุโรคระบาดไปทั่วโลก สามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจได้มากกว่า 200 ชนิด มากกว่า 40 ตระกูล เชื้อนี้มีชีวิตอยู่รอดในดินได้นาน อยู่ข้ามฤดูในวัชพืชหลายชนิด สามารถถ่ายทอดโรคทางส่วนขยายพันธุ์ เช่น หัวพันธุ์มันฝรั่ง ท่อนพันธุ์ขิง เป็นต้น ปนเปื้อนและติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตรได้ง่าย รวมถึงติดไปกับสัตว์แมลงและมนุษย์ สามารถแพร่ระบาดได้ดีกับระบบให้น้ำทางการเกษตร (Yabuuchi *et al.*, 1995) ที่สำคัญปัจจุบันยังไม่พบวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีควรแก่การแนะนำ โดยเฉพาะการใช้สารเคมีพบว่าไม่สามารถ

ควบคุมโรคนี้ได้และไม่แนะนำให้ใช้ (Hayward and Hartman, 1994) ขณะที่การใช้พันธุ์ต้านทานค่อนข้างทำได้จำกัดทั้งแบบ horizontal และ vertical เนื่องจากความผันแปรของอุณหภูมิและลักษณะดิน อีกทั้งเชื้อนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก มีการจัดแบ่งเชื้อนี้ เช่น ตามเรส (race) ไบโอวา (biovar) และลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และมีรายงานว่าเชื้อนี้มีระยะที่เรียกว่า VBNC stage (viable but not culture) ซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ แต่สามารถทำให้เกิดโรคได้ เมื่อเป็นเช่นนี้กลยุทธ์ในการควบคุมโรคจึงต้องใช้วิธีป้องกัน ด้วยการผสมผสาน (integrated control) วิธีการต่าง ๆ เข้าด้วยกัน โดยเน้นที่การป้องกัน ลดการแพร่ระบาดของเชื้อโรคโดยการทำลายอย่างสิ้นเชิง (eradication) และหลีกเลี่ยงการเกิดโรค (avoidance) (French *et al.*,1997) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานของเชื้อสาเหตุโรคนี้ให้มากที่สุด เพื่อใช้ประกอบการวางแผนการควบคุมโรคต่อไป Tans-Kersten และคณะ (2001) พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อนี้มีผลโดยตรงกับการเข้าทำลายและการเกิดระบาดของโรค Richardson และคณะ (1998) ประสบความสำเร็จจำแนกเชื้อในสกุล *Pseudomonas cepacia* ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อโรคนี้ โดยอาศัยการจัดกลุ่มตามคุณสมบัติของ fatty acid profiling, REP, PCR, BOX, PCR และ ERIC PCR Nesmith และ Jenkins (1985) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มักพบในดินที่มีอินทรีย์หมักตามธรรมชาติ (suppressive and conducive composed soil) Guo และคณะ, (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. J 3, *Bacillus* spp. BB 11 and FH 17 มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพริกได้ Frey และคณะ (1994) ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อโรคสามารถช่วยลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ Aino และคณะ (1998) รายงานว่า endophytic pseudomonads, FPT และ FPH มีประสิทธิภาพ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ Shiomi และคณะ (1999) พบว่าการใช้ suppressive soil จากเมือง Mutsumi ช่วยลดความรุนแรงของโรคดังกล่าวในมะเขือเทศ Ciampi และคณะ (1999) ใช้สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท A 47 และ *Pseudomonas fluorescens* BC 8 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเหี่ยว สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพไร่ Sanaina และคณะ, (1998) ใช้เชื้อแบคทีเรียบริเวณรากควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ 24-83% และใช้ควบคุมได้ดีกว่าเชื้อโรคนี้ที่กลายพันธุ์เป็นเชื้อที่ไม่เกิดโรครุนแรง (avirulent mutant of *R. solanacearum*) ซึ่งจำแนกเป็น *Bacillus subtilis, B. cereus* และ *Enterobacter cloacae* Karuna และคณะ (1998) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมโรคนี้ได้ดีกว่า *Pseudomonas aeroginosac* และ

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* NA 25 สามารถควบคุมโรคดังกล่าวในมะเขือเทศได้โดยการแช่รากของกล้ามะเขือเทศก่อนปลูก

ในการทดลองนี้การดำเนินงานมีหลายขั้นตอน คือ สำรวจ รวบรวม ทดลองทั้งห้องปฏิบัติการศูนย์สถานีทดลอง และในสภาพของเกษตรกร เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียดินที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยตั้งสมมุติฐานว่า ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวจากเชื้อ *R. solanacearum* มักพบว่ามีบางต้นไม่แสดงอาการโรคที่สังเกตได้ สภาพปกติสมบูรณ์แข็งแรง แน่นอนเหตุผลที่ทำให้ต้นปกติดังกล่าวหลีกเลี่ยงโรคได้อาจเกิดจากหลาย ๆ เหตุผล แต่ผู้วิจัยคิดว่า เหตุผลหนึ่งที่ทำให้พืชบางต้นไม่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย อาจมาจากจุลินทรีย์ที่ราก หรือดินบริเวณรากพืช (rhizoplanes) ป้องกันไม่ให้ต้นพืชถูกเชื้อโรคดังกล่าวเข้าทำลาย จึงสำรวจเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียจากรากและดินบริเวณรากพืช เฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคทั่วประเทศไทย แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวม ทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ นำเชื้อปฏิปักษ์ที่ได้ทดสอบหาความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวสภาพในเรือนปลูกพืชทดลอง ไร่ทดลองและไร่เกษตรกร พร้อมจำแนกชนิดเชื้อดังกล่าว เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อนี้ด้วยเทคนิคทีแอลซี (TCL, Thin layer chromatography)

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างดินและรากบริเวณ rhizoplane ของพืชที่ไม่แสดงอาการโรคเหี่ยวในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคบนอาหาร King's B เก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ 10-14°ซ นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวแต่ละไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบแบบเผชิญหน้า (direct bioassay) ด้วยวิธี Disk Diffusion และ Double Layer Culture คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคดังกล่าว มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็นการควบคุมโรคในสภาพก่อนเกิดโรค (pre diseased control) และหลังเกิดโรค (post diseased control) ทำการทดลองกับกล้ามะเขือเทศ โดยการแช่รากถึงโคน

ต้นของต้นกล้ามะเขือเทศก่อนปลูก ด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนี/มล. แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี suspension artificial inoculation คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคดังกล่าว ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ดำเนินการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองโดยการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูก ด้วยสารละลายเชื้ออัตราเดียวกับที่ใช้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและราดด้วยสารละลายเชื้อเดียวกันอัตราความเข้มข้น 10^6 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 10 มล./หลุม จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ตรวจนับจำนวนต้นที่เป็นโรคในแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคดังกล่าวในสภาพแปลงทดลอง ดำเนินการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร ที่มีการระบาดของโรคและไม่มีการระบาดของโรคจำนวน 2 แห่ง จากนั้นจำแนกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ผลดี ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีของ fatty acid compound ด้วย TLC (Thin layer chromatography) ซึ่งจะได้กล่าวโดยละเอียดในแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างดินและรากเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคเหี่ยว สำรวจแปลงเกษตรกรที่เพาะปลูก มันฝรั่ง พริก มะเขือ มะเขือยาวและขิง ที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ทั่วประเทศไทย เลือกเฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการโรค (สภาพทั่วไปปกติ สมบูรณ์ แข็งแรง) ในแปลงที่มีการระบาดของโรค ขุดหรือถอนต้นที่ไม่เป็นโรคนั้นเพื่อเก็บตัวอย่างรากและดินรอบ ๆ ราก ประมาณ 10 จุด/ตัวอย่าง ใส่ถุงพลาสติกใหม่รัดปากถุงให้แน่นและแช่ไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งให้ความเย็น บันทึกรายละเอียดของแต่ละตัวอย่าง คือ วันที่ สถานที่ พืชที่ปลูก และความรุนแรงของการเกิดโรคของพื้นที่นั้น ๆ {การเป็นโรคมากกว่า 70 % = ระดับการเป็นโรคสูง (high) การเป็นโรค 40-70 % = ระดับการเป็นโรคปานกลาง (moderate) และการเป็นโรคต่ำกว่า 30 % = การเป็นโรคต่ำ (low)} แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการที่ส่วนกลางของกลุ่มวิจัยโรคพืช

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคเหี่ยว บดรากพืชของแต่ละตัวอย่างผสมกับดินของตัวอย่างนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากันดีในแต่ละถุงแล้วแบ่ง 300 กรัมใส่ถุงใหม่ให้หมายเลขตัวอย่างกำกับแต่ละตัวอย่างเพื่อเก็บไว้เป็นสต๊อก ที่ 10 °ซ แบ่งตัวอย่างจากสต๊อก มา 10 กรัมใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มล. ในขวดขนาด 250 มล.ตั้งบนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบ/นาทีนาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็นสารละลายสต๊อก (10-1) ทำการเจือจาง (dilution serial) โดยแบ่งสารละลายเดิมที่เขย่าแล้ว 1 มล. ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มล. เป็นสารละลาย 10-2 ทำซ้ำเช่นนี้ต่อไปจะได้สารละลายที่ 10-3 10-4 10-5 และ 10-6 ตามลำดับ ดูดสารละลายที่ 10-2 10-4 10-6 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่บนอาหาร King-B แล้วเกลี่ยสารละลายเชื้อให้

ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้สภาพปลอดเชื้อ (aseptic technique) เก็บบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่ทำเสร็จแล้วที่ 30 °ซ. นาน 2-5 วัน สังเกตดูจะมีโคโลนีของเชื้อขึ้น ย้ายโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหารไปไว้ในหลอดอาหารเอียง PSA (Wakimoto's potato semi-synthetic agar) เก็บไว้ 2-3 วันในสภาพเดียวกับข้างต้นจนเชื้อขึ้นเต็มผิวหน้าอาหาร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของแต่ละเชื้อโดยแตะเชื้อลากบนจานอาหาร PSA อีกครั้ง ถ้าเชื้อที่ขึ้นมีความบริสุทธิ์แล้วโคโลนีจะขึ้นสม่ำเสมอดีไม่มีเชื้ออื่นๆ ขึ้นปนเปื้อน ให้ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเอียงเดิมใส่หลอดอาหารเอียงใหม่เก็บในตู้เพาะเหมือนเดิม พออายุ 2 วัน ถ่ายเชื้อ 2 ลูป ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มล. ในหลอดทดลองฝาเกลียวบันทึกรหัสเชื้อแล้วเก็บไว้ที่ 14 °ซ เป็นแหล่งเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ดำเนินการที่กลุ่มวิจัยโรคพืช

3. การคัดกรองเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทดสอบด้วยวิธี direct bioassy ระหว่างเชื้อเป้าหมายและเชื้อสาเหตุโรคโดย double layer และ disc diffusion ตามวิธีการของ Kelman (1954) มีเชื้อสาเหตุโรคเป็น *R. solanacearum* และเชื้อเป้าหมายเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินและรากตามที่ได้อธิบายข้างต้น ถ้าเชื้อเป้าหมายที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคจะปรากฏบริเวณยับยั้ง ระหว่างเขตการเจริญของเชื้อทั้งสอง วัดขนาดความกว้างของบริเวณใสทั้งสองข้างจากขอบของเชื้อสาเหตุ โรคถึงตำแหน่งที่วางเชื้อเป้าหมายผ่านแนวศูนย์กลางของเชื้อเป้าหมาย ในการทดลองนี้สิ่งที่เป็นเชื้อเป้าหมายจะใช้เชื้อที่มีชีวิตและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย แต่ละเชื้อเป้าหมายทำการทดลอง 4 จุด แต่ละจุดจะได้ค่าบริเวณใส 2 ค่า หาค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณใสจาก 8 ค่าดังกล่าว บันทึกเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้ง ส่วนเชื้อเป้าหมายที่ไม่เกิดบริเวณใสแสดงว่าไม่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคดำเนินการที่กลุ่มวิจัยโรคพืช

4. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ทำการทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในการควบคุมโรคดังกล่าวในเชิงป้องกันก่อนพืชเป็นโรค และเชิงรักษาหลังจากพืชเป็นโรคแล้วกับต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 10 วัน ดำเนินการที่ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตาก 1 อ.พบพระ จ.ตาก

4.1 การควบคุมโรคเชิงป้องกัน (pre diseased control) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี 10 กระถางต่อกรรมวิธีและปลูกมะเขือ 1 ต้นต่อหนึ่งกระถาง (เส้นผ่าศูนย์กลาง-สูง 10x12.5 ซม.) กรรมวิธี (Tables 5, 6) ปลูกในโรงเรือนกระจกปิดที่ควบคุมการให้แสง 12 ชม. และการให้น้ำ 2 ครั้ง/วัน ที่อุณหภูมิ กลางวัน 30 °ซ กลางคืน 25 °ซ ทุกระบบดำเนินการแบบอัตโนมัติ และเตรียมสารละลายเชื้อปฏิปักษ์แต่ละเชื้อในอาหารเหลว PS (PSA without agar) เขย่า 150 รอบ/นาที ที่ 30 °ซ นาน 48 ชม.

ปรับความเข้มข้นของเชื้อที่ 109 หน่วยโคโลนี/มล. แช่ต้นกล้ามะเขือเทศตั้งแต่รากถึงโคนต้น ในสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวนาน 2-3 นาที แล้วปลูกด้วยดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมเชื้อสาเหตุโรค *R. solanacearum* ซึ่งเตรียมในอาหารเหลววิธีการแบบเดียวกับการเลี้ยงเชื้อเป้าหมาย อัตราส่วนที่ใช้ผสมคำนวณให้ความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุ เมื่อผสมดินแล้วจะมีความเข้มข้นที่ 106 หน่วยโคโลนีต่อดิน 1 กรัม เช่น ตัวอย่างดิน 1 กก. จะต้องผสมด้วยสารละลายเชื้อ 10^7 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 100 มล. เป็นต้น ตามด้วยการราดด้วยสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ความเข้มข้น 10^6 หน่วยโคโลนี/มล. จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน โดยราดที่โคนต้นมะเขือเทศในกระถางด้วยปริมาตรของสารละลายเชื้อ 10 มล./กระถาง สุดท้ายบันทึกตรวจนับจำนวนต้นเป็นโรคซึ่งจะแสดงอาการเหลืองชืด ยอดและใบเหี่ยว เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 15 และ 30 วัน หลังปลูก คำนวณต้นเป็นโรคเป็นร้อยละของจำนวนต้นทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี

4.2 การควบคุมโรคเชิงรักษา (post diseased control) กรรมวิธีโดยทั่ว ๆ ไปดำเนินการเช่นเดียวกับการควบคุมโรคเชิงป้องกัน ต่างกันตรงที่ไม่มีการแช่รากต้นกล้ามะเขือเทศ ด้วยสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ก่อนปลูก

4.3 การตรวจนับประชากรเชื้อ ดำเนินการทั้งการทดลองเชิงป้องกันและเชิงรักษาโดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณราก (rhizophere) ทุก 7 วัน จากทุกกระถางในแต่ละกรรมวิธีกระถางละ 1 ช้อนกาแฟ ประมาณ 10 กรัม นำมารวมกันเป็น 1 กรรมวิธี โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการแยกเชื้อปฏิปักษ์ที่กล่าวแล้วข้างต้น แต่ใช้ปริมาณสารละลายเชื้อที่หยอดลงบนผิวอาหาร 100 ไมโครลิตร แทน 50 ไมโครลิตร และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hara and Ono's media (Hara and Ono, 1984) แทนอาหาร PSA ทำ 2 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี ตามด้วยหลังจากบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่ 28 °ซ นาน 3 วัน นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนผิวอาหารโดยเลือกความเข้มข้นที่มีเชื้อดังกล่าวขึ้นประมาณ 50 ถึง 200 โคโลนีต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาคำนวณกลับเทียบเป็นจำนวนโคโลนีต่อดินหนึ่งกรัม ดำเนินการที่ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิต ตาก 1 อ.พบพระ จ.ตาก

5. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพไร่

5.1 การควบคุมโรคในสภาพไร่ทดลอง ดำเนินการทดลอง 2 จังหวัด ได้แก่ อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่ และอ.พบพระ จ.ตาก ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2547 เลือกเฉพาะพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคค่อนข้างรุนแรง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD, 4 ซ้ำ (2 ซ้ำต่อหนึ่งจังหวัด) 6 กรรมวิธี (Table 7) 4 แถวต่อหนึ่งกรรมวิธี แถวยาว 4 ม. ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. ระยะระหว่างแถว 90 ซม. ระยะระหว่างกรรมวิธี 2 ม. ระยะระหว่างซ้ำ 4 ม. มีระบบการปฏิบัติงานในแปลง ได้แก่ ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกอร์ทุก 2-3 วัน ใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่ผ่านการตรวจว่าปลอดโรคโดยการสุ่มตรวจ 3% จากหัวพันธุ์ชุดเดียวกันและตรวจด้วยวิธี indirect ELISA เลือก

ใช้หัวพันธุ์เฉพาะที่ให้ผลเป็นลบเท่านั้น (ไม่มีเชื้อโรคเหี่ยวติดมากับหัวพันธุ์) นอกจากนั้นแช่หัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยสารละลายเชื้อปฏิปักษ์แต่ละเชื้อที่ความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนี/มล. นาน 2-3 นาที หลังจากปลูกแล้วราดด้วยสารละลายเชื้อปฏิปักษ์แต่ละเชื้อที่ความเข้มข้น10^6 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 10 มล./หลุม จำนวน 4 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 7-10 วัน โดยราดไปที่โคนต้น และตามด้วยปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวหลังจากปลูกมันฝรั่งแล้ว 3-5 วัน ด้วยสารละลายเชื้อเข้มข้น 106 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 10 มล./หลุม และตรวจนับจำนวนต้นที่เป็นโรคที่แสดงอาการเหี่ยวอย่างถาวรทุก 7 วัน จนกระทั่งมันฝรั่งอายุ 45 วัน บันทึกข้อมูลการเกิดโรค จำนวนต้นที่เป็นโรค ในแต่ละกรรมวิธีนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.2 การควบคุมโรคในสภาพไร่เกษตรกร โดยดำเนินการทดลองในพื้นที่ 2 จังหวัด ได้แก่ อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่ และอ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2548 เลือกเฉพาะพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคค่อนข้างรุนแรง 1 แปลงและที่ไม่เป็นโรค 1 แปลง กรรมวิธีในการทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองในสภาพไร่เกษตรกร เพียงแต่ขยายพื้นที่ในแต่ละกรรมวิธีมากขึ้น และไม่มีจำนวนซ้ำ สำหรับการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยการสุ่มเก็บจากพื้นที่ 4 ตร.ม. จำนวน 4 จุดในแต่ละกรรมวิธีหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณเป็นผลผลิต/ไร่

6. การจำแนกชนิดเชื้อปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค TLC ดำเนินการตามขั้นตอนของ Matsuyama (1995a,b และ 2003) และเริ่มต้นการทดลองเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน พ.ศ. 2548

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการเก็บตัวอย่างดินและรากบริเวณ rhizoplane ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้ในพืชต่าง ๆ ได้แก่ มันฝรั่ง พริก มะเขือเทศ มะเขือยาว และขิงได้จำนวน 104 ตัวอย่าง จาก 18 จังหวัดทั่วประเทศไทย นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคดังกล่าว ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 319 ไอโซเลท (Figures 1,2 and Table 1) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) 15 ไอโซเลท พบว่ามีขนาดของบริเวณใส (clear zone หรือ inhibition zone) 4-20.75 มล. จากการทดสอบเชื้อมีชีวิต (bacterial culture) และ 6.25-25.00 มล. จากการใช้อาหารกรองของเชื้อนั้น (culture filtrate) (Figure 3 and Table 2) จากการคัดเลือกเชื้อดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าจำนวน 5 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เหมาะสมไปใช้ควบคุมโรคดังกล่าวในมันฝรั่ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่สามารถรักษาโรคดังกล่าวถ้าพืชนั้นถูกเชื้อเข้าทำลายแล้ว แต่สามารถป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้ พบว่าประชากรของเชื้อสาเหตุ

โรคของการทดลองเชิงป้องกันลดลงมากกว่าการทดลองเชิงรักษา (Tables 3, 4) โดยการทดลองเชิงป้องกันมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของกรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธี แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีเปรียบเทียบ สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ 23.4 ถึง 80% เมื่อเปรียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Tables 5, 6) จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองที่สถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอร์ อ. พบพระ จ. ตาก พบว่าทุกกรรมวิธีของเชื้อปฏิปักษ์มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ 15.8 – 44.9% (Table 7) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวมาทดสอบในสภาพ

Table 1. Locations and sample number of rhizoplane which the antagonistic bacteria were isolated

Location (province)	No sample	No rhizoplane crop (severity and number crop)					No potential antagonistic bacteria
		Tomato	Pepper	Eggplant	Ginger	Potato	
.1. Sakon Nakhon (NE)	8	6 (M3,L3)	2 (M)	0	N	N	17
2. Pichit (N)	5	2 (M)	2 (M1,L1))	1 (L)	N	NC	16
3. Chiang Rai (N)	7	1 (H1)	1 (M)	2 (M1,L1)	1 (L)	2 (L)	16
4. Lampang (N)	7	3 (M1,L2)	2 (H1,L1)	2 (L)	N	N	15
5. Nong Khai (NE)	6	1(L)	1 (L)	2 (M1,L1)	1 (M)	1 (M)	16
6. Song Khla (S)	8	1 (L)	2 (M)	5 (M2,L3)	N	N	10
7. Pathum Thani (C)	5	3 (H1,L2)	0	2 (L)	N	N	22
8. Nakhon Phanom (NE)	3	0	2 (M)	1 (L)	0	0	19
9. Lamphun (N)	6	0	5 (M1,L4)	1 (L0	N	N	19
10. Phrachuap Kiri Khan (S)	6	1 (M)	5 (H2,M1,L2)	0	N	N	18
11. Nakhon Si Thammarat (S)	10	2 (l)	6 (M1,L5)	2 (M)	N	N	21
12. Kanchanaburi (W)	5	1 (L)	3 (L)	1 (L)	N	N	21
13. Nonthaburi (C)	6	2 (M1,L1)	2 (L)	2 (L)	N	N	20
14. Chiang Mai (N)	5	1 (M)	1 (M)	1 (L)	0	2 (M)	19
15. Chumphon (S)	6	1	2	3	N	N	20
16. Tak (N)	4	1	0	1	1	2 (H1,M1)	20
17. Petchabun (N)	4	0	2 (M)	2 (M)	0	N	20
18. Ratchaburi (W)	3	1 (L)	1(L)	1 (L)	N	N	10
	104						319

Location : C = Central area, N = Northern, E = Eastern, W = Western, NE = Northeastern,

Severity : H = high, M = moderate, L = low, N = not planted

Table 2. Inhibition zone of 15 antagonistic bacteria against Ralstonia solanacearum, were screened under laboratory condition.

Location (province)	Crop	Code no.	Inhibition zone (mm)		Recode*
			Bacterial culture	Culture filtrate	
Chiang Rai (N)	Eggplant	CR 16	18.25	22.50	WB 1
	Ginger	CR 9	9.00	11.25	
Pichit (N)	Tomato	PC 2	16.50	19.25	WB 2
	Tomato	PC 10	4.00	8.00	
	Pepper	PC 7	11.00	12.25	
	Pepper	PC 12	20.75	23.00	WB 3
Tak (N)	Potato	TK 15	4.00	6.25	
	Ginger	TK 13	5.00	7.00	
Nhong Khai (NE)	Tomato	NK 2	9.00	11.00	
	Pepper	NK 14	6.00	7.25	
	Potato	NK 3	21.00	25.00	WB 4
Sakon Nakhon (NE)	Tomato	SK 17	10.00	12.00	
	Pepper	SK 4	13.00	14.00	
	Pepper	SK 8	7.00	9.00	
Chiang Mai (N)	Potato	CM 2	20.00	21.00	WB 5

Inhibition zone (mm) = average from 8 values

Recode* = recoding the antagonistic name for other experiments

WB = Wong Boonsuebsakul

แปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรค (อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี) พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคดังกล่าวได้ 66.6 - 85.6 % และให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ(Figure 4 and Table 8) จากการทดสอบในสภาพแปลงที่ไม่มีการระบาดของโรค อ. ไชยปราการ จ. เชียงใหม่ พบว่ากรรมวิธีใช้เชื้อปฏิปักษ์สามารถให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (Table 9) แสดงว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้งห้าไอโซเลท ดังกล่าวมีคุณสมบัติส่งเสริมผลผลิตของมันฝรั่ง (plant growth/yield promoter) จากการจำแนกชนิดโดยเทคนิค TLC พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทมีรูปแบบของ TLC amino-lipid chromatogram เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* (Figure 5) ซึ่งสอดคล้องกับที่นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้รายงานมาก่อนหน้านี้ (Suthaya, 1984; Sanaina *et al.*, 1998; Karuna

Figure 1. Survived potato plants in the heavily infested field with Rs. The rhizoplane materials (soil and root) were collected to isolate the potential anti-Rs bacteria.

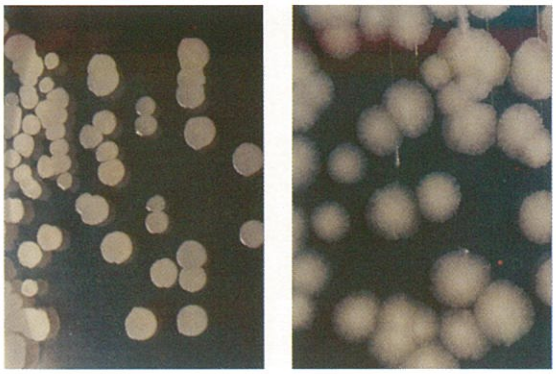

Figure 2. Colonies (3-7 days) of potential antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* on King-B medium; right picture = isolated from ginger rhizoplane at Nong Khai province, left picture = isolated from potato rhizoplane at Chiang Mai province

Table 3. Population of *Ralstonia solanacearum* from rhizoplane where pre-treated with the antagonistic bacteria of pre diseased control in green house

Treatment (antagonistic bacteria)	**Population of *Ralstonia solanacearum* (cfu / g soil)**			
	1 wk	**2 wks**	**3 wks**	**4 wks**
Control (SDW)	$1.8x10^6$	$1.2x10^6$	$3.6x10^6$	$5.4x10^6$
WB[1/] 1	$8.1x10^5$	$3.4x10^5$	$1.2x10^5$	$7.4x10^4$
WB 2	$1.6x10^5$	$1.2x10^5$	$3.6x10^5$	$2.4x10^5$
WB 3	$1.4x10^5$	$1.5x10^5$	$1.2x10^5$	$8.3x10^4$
WB 4	$3.4x10^4$	$1.2x10^4$	$6.6x10^3$	$2.1x10^2$
WB 5	$7.4x10^5$	$2.8x10^5$	$7x10^4$	$3.1x10^3$

[1/] WB = Wong Boonsuebsakul

Wk (s) = week after emergence

et al., 1998; Ciampi *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2002) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์ทั้งหมดต่อโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ที่ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ เชื้อปฏิปักษ์รหัส DOA.WB 4

แม้ว่าผลการทดลองพบว่า เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้จากการทดลองนี้สามารถควบคุมโดยป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวได้ แต่อย่างไรก็ดี ในสภาพความเป็นจริงเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า การทดลองการควบคุมโรคพืชที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ

Table 4. Population of *Ralstonia solanacearum* from rhizoplane where post-treated with the antagonistic bacteria of post diseased control in green house

Treatment (antagonistic bacteria)	Population of *Ralstonia solanacearum* (cfu / g soil)			
	1 wk[2/]	2 wks	3 wks	4 wks
Control (SDW)	$3.2x10^6$	$1.1x10^7$	$4.7x10^6$	$4.9x10^6$
WB[1/] 1	$4.1x10^5$	$4.8x10^5$	$3.5x10^6$	$6.3x10^6$
WB 2	$2.4x10^5$	$3.7x10^5$	$4.1x10^6$	$5.3x10^6$
WB 3	$2.4x10^5$	$6.3x10^5$	$8.2x10^4$	$6.7x10^4$
WB 4	$2.8x10^4$	$2.2x10^4$	$5.7x10^3$	$1.2x10^3$
WB 5	$4.3x10^5$	$1.3x10^5$	$4.6x10^4$	$3.3x10^3$

[1/] = Wong Boonsuebsakul

[2/] = week after emergence

Table 5. Bacterial wilt control on tomato in green house condition with antagonistic bacteria were found in this experiment (pre disease infected application) [1/]

Treatment (antagonistic bacteria)	Average bacterial wilt (%)	Disease control vs check (%)
Check (SDW)	86.7 d	-
WB[2/] 1	40.0 b	46.7
WB 2	60.0 c	26.7
WB 3	63.3 c	23.4
WB 4	6.7 a	80.0
WB 5	33.3 b	53.4
CV = 15.6 %		

[1/] = pre-treated with the antagonistic bacteria before infesting with *R. solanacearum* Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT.

[2/] = Wong Boonsuebsakul

Table 6. Bacterial wilt control on tomato in green house condition with *Ralstonia solanacearum* antagonistic bacteria were found in this experiment (post disease-infected application) [1/]

Treatment (antagonistic bacteria)	Average bacterial wilt %
Control (SDW)	86.7 b
WB[2/] 1	80.0 ab
WB 2	73.3 ab
WB 3	70.0 a
WB 4	66.7 a
WB 5	70.0 a
CV = 9.71 %	

[1/] = pre-treated with the antagonistic bacteria before infesting with *R. solanacearum*

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT.

[2/] = Wong Boonsuebsakul

Table 7. Biological control of bacterial wilt disease on potato in field condition by antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* were found in this experiment.

Treatment (antagonistic bacteria)	Average bacterial wilt (%)	Disease control vs check (%)
Control (SDW)	63.7 e	-
WB[1/] 1	30.2 b	33.5
WB 2	47.9 d	15.8
WB 3	40.2 c	23.5
WB 4	18.8 a	44.9
WB 5	36.5 c	27.2
CV = 7.3 %		

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT.

[1/] = Wong Boonsuebsakul

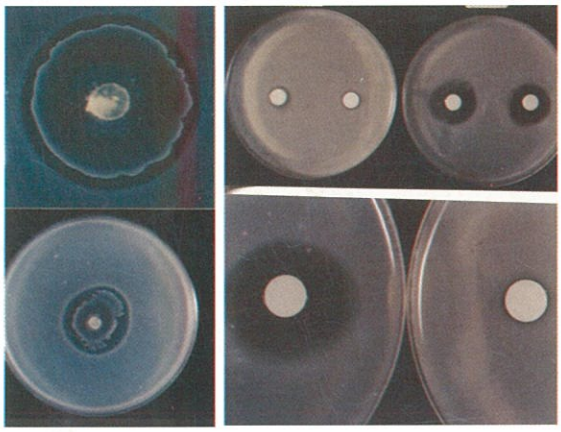

Figure 3. Direct bioassay test to screen the potential antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* with growth inhibition property; the centre point is antagonistic bacterial (right = live culture, left = culture filtrated) while the base culture is *R. solanacearum*

Figure 4. The biological comtrol of bacterial wilt on potato farm trial

A and B = typical symptom of potato bacterial wilt naturally infected

C = successful biological control with the antagonistic bacteria

D = the biological control trial, left side of pipe is the treatment without antagonistic bacteria ; whereas right side is treatment with antagonistic bacteria (dipping potato seed to the antagonistic bacteria followed by the drenching with same bacterial suspension)

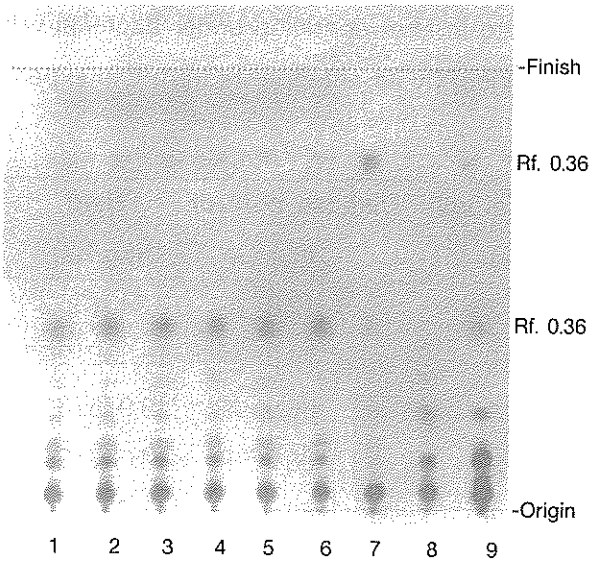

Figure 5. The TLC amino lipid chromatogram profile of 5 antagonistic bacteria against *R. solanacearum* from this experiment

Lane 1 = *B. subtilis* type culture NRBC 13719

Lane 2-6 = unknown antagonistic bacteria (WB 1, WB 2, WB 3, WB 4, WB 5)

Lane 7 = *B. turingiensis* NBRC 13865

Lane 8 = *Clavibacter mich.* subs. *michiganensis* T-culture NBRC 6204

Lane 9 = *B. cereus* type culture NBRC 15305

จุลินทรีย์ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพและการอยู่รอดของเชื้อ โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมในแต่ละท้องถิ่นที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของดิน อุณหภูมิ ความชื้น ชนิดของจุลินทรีย์คู่แข่งในท้องถิ่นนั้นๆ (competition micro flora) หรือชนิดของพืชปลูก เป็นต้น อีกประการหนึ่ง การผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมาก (mass production) ยังเป็นหัวข้อการวิจัยที่ท้าทายนักวิจัยให้ค้นคว้า เพื่อหาวิธีการ ชนิดของวัสดุและรูปแบบการบรรจุที่เหมาะสมที่มีคุณสมบัติรักษาคุณภาพของเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าว ให้สามารถคงประสิทธิภาพและช่วยให้อยู่รอดในธรรมชาติได้ดี ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคเหี่ยวที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่ง Bochow และ Gantcheva (1995) ได้ศึกษาความอยู่รอดในธรรมชาติของเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินและสามารถอยู่ได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ (flora microorganism) สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดีกว่าเชื้อ *R. solanacearum* ที่เข้าทำลายทางรากพืชโดยฝังตัวอยู่ในระบบท่อน้ำท่ออาหาร ไม่สามารถอยู่ด้วยประชากรเชื้อที่คงที่ถาวรตลอดไป แต่อาศัยพืชอาศัยอยู่ข้ามฤดูอย่างระยะยาวทั้งในพืชล้มลุก พืชยืนต้นและวัชพืช ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบความสามารถการอยู่รอดในธรรมชาติ ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวกับเชื้อปฏิปักษ์ เชื้อปฏิปักษ์จะดีกว่าเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว

สรุปผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากรากและดินบริเวณรากพืชที่ไม่เป็นโรค ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ได้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดทั่วไป 319 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว พบเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุของโรค15 ไอโซเลท คิดเป็น 4.70 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด

2. คัดเลือกเชื้อจากข้อ 1 ที่มีประสิทธิภาพ

Table 8. Biological control of bacterial wilt on potato in farm condition under bacterial wilt disease infected area (Kanchanaburi province) by its antagonists from this experiment.

Treatment (Rs. ant.)	No total plants	No plants disease	Bacterial wilt (%)	Disease control (%)	Yield (kg/ha)
Control (SDW)	3,356	2,927	87.2	12.8	2,343±35.3[2/]
WB[1/] 1	3,057	795	26.0	74.0	15,385±24.7
WB 2	3,123	1,034	33.1	66.9	13,976±31.7
WB 3	3,289	1,023	31.1	68.9	14,547±29.7
WB 4	3,380	488	14.4	85.6	18,750±40.3
WB 5	3,279	1,095	33.4	66.6	13,187±28.3

[1/] = Wong Boonsuebsakul

[2/] ± = standard deviation

Table 9. The potato production with Rs. antagonists seed dressing on farm condition at Chaing Mai province where was free from bacterial wilt disease.

Treatment (Rs. ant.)	No total plants	No plants disease	Bacterial wilt (%)	Yield (kg/ha)	% yield increasing/ha
Control (SDW)	13,543	0	0	22,835	-
WB[1/] 1	6,159	0	0	25,005	9.5
WB 2	5,139	0	0	23,798	4.2
WB 3	5,429	0	0	24,547	7.5
WB 4	6,058	0	0	26,089	14.3
WB 5	5,979	0	0	23,473	2.8

[1/] = Wong Boonsuebsakul

สูง 5 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคดังกล่าวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ไร่ทดลอง และไร่เกษตรกร พบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถนำมาใช้ควบคุมป้องกันโรคได้ 23.4 – 80.0 %, 15.8 – 44.9 % และ 66.6 – 85.6 % ตามลำดับ โดยการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อัตราความเข้มข้น 109 หน่วยโคโลนี/มล. นาน 2-3 นาที แล้วราดด้วยสารละลายเชื้อเดียวกันอัตราความเข้มข้น 106 หน่วยโคโลนี/มล. ปริมาตร 10 มล./หลุม จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน โดยเฉพาะการทดลองในไร่เกษตรกรที่มีการระบาด

ของโรค พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ดีมีผลผลิตเพิ่มขึ้นมาก เมื่อเทียบกับการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แม้ในสภาพที่ไม่มีโรคดังกล่าวระบาด เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากการทดลองนี้ ยังมีคุณสมบัติส่งเสริมผลผลิตให้เพิ่มมากขึ้น

3. ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งดีกว่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ เชื้อปฏิปักษ์รหัส DOA.WB 4

เอกสารอ้างอิง

Aino, M., Y. Maekawa, S. Mayama and H. Kato. 1998. The use of endophytic bacteria in biocontrol. *In* : *The Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium.* 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number 2.10.5s.

Ciampi, L., R. Fuentes, R. Schobitz, G. Bernal and J. Oyarzun. 1998. Biological control of *Ralstonia solanacearum* : Alginate beads as carriers for antagonistic cells. *In* : The *Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium.* 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number B 2.

French, E.R., R. Anguiz and P. Aley. 1997. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. Pages 381 – 385. *In* : *Bacterial Wilt : Molecular and Ecology Aspects.* P. Prior, C. Allen and J. Elphinestone (eds.) INRA edtion, Springer Verlag, Berlin, Germany.

Frey, P.,P. Prior, C. Marie, A. Kotoujansky, D. Trigalet and D. 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., H. Qi and S. Li. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to pepper bacteria wilt. *Bacterial Wilt Newsletter* 17: 3.

Hara, H. and K. Ono. 1984. The semi selective medium for soil isolation of *Ralstonia solanacearum. Plant protection (Shokubutsu boeki)* 38:76-79. (in Japanese)

Hayward, A.C. 1995. Symtematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123 – 135. *In* : *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative agent, Pseudomonas solanacearum.* Hayward, A.C. and G.L. Hartman (eds.) CABI, Wallingford, United Kingdom.

Karuna, K., A.N.A. Khan and M.R. Ravikumar.

1997. Potential of biocontrol agents in the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *In* : *The Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium*. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number B 3.

Kelaniyangoda, D.B. 1998. Bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) management in potato and tomato using botanicals and chemicals. *In* : *The Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium*. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number B 13.

Kelman, A. 1954. The relationship and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a triphenyl tetrazorium chloride media. *Phytopathology* 44:693 - 695.

Matsuyama, N. 1995a. Trials for rapid identification of phytopathogenic Bacteria by HPLC and the direct colony TLC. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 40(1-2):87-91.

Matsuyama, N. 1995b. Application of the direct colony TLC for identification of phytopathogenic bacteria (III). Disthinction of the *Pseudomonas* in the rRNA-homology group II (*Burkholderia* spp.). *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 40(1-2):189-196.

Matsuyama, N., A.A. Khan,K. Yoshimura, N. Furuya, N.,K. Manabe, M. Daikohara, K. Suyama and H. Negishi. 2003. Rapid identification of phytopathogenic bacteria by an improved extraction-TLC method. Page 96. *In* : *Proc. 8th*. International congress of plant pathology (ICPP2003), Chrischurch, New Zealand.

Nesmith, W.C. and J.S.F. Jenkins. 1985. Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* 75 : 1182-1187.

Richardson, J., J. Elephinstone, D. Stead and R. Coutts. 1998. Differentiation of Burkholderia cepacia isolates by fatty acid profiling and PCR for biocontrol of *Ralstonia solanacearum*. *In* : *The Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium*. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number 3.5.16

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1998. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of

Ralstonia solanacearum and other bacteria. *In : The Proc. of 2nd Bacterial Wilt International Symposium.* 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. Paper number B5.

Shiomi, Y., M. Nishiyama, T. Onizuka and T. Marumoto. 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9) : 3996-4001.

Suthaya, C. 1984. *Study on Bacterial Wilt of Tomato.* M.Sc. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 234 p.

Tans-Kersten, J., H. Huang and C. Allen. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Jour. of Bacteriology* 183 (12) : 3597-3605.

Urutchata, K. 1991. *Biological Control of Tomato Bacterial Wilt by Pseudomonas solanacearum.* M.Sc. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 199 p.

Yabuuchi, E.,Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta and Y. Nishiuchi. 1995.Transfer of 2 *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia gen.* Nov. : Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia Eutropha* (Davis, 1969) comb. Nov. *Microbiol. Immunol.* 39:897-904.