

การประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์และสารกำจัดศัตรูพืช ตกค้างในระบบการผลิตกะหล่ำดอก

Microorganism Risks and Pesticide Residues Analysis in Cauliflower Production System

วิลาวรรณ เชื้อบุญ

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ดุสิต อธิพันธุ์*

สาขาวิชาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Wilawan Chuaboon

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok Campus,
Ladyaow, Chatuchak, Bangkok 10900

Dusit Athinuwat*

Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas fluorescens* SP007s และ *Bacillus licheniformis* SP009s เพื่อควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* โดยการคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและให้ต้นกะหล่ำดอกในสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้า และลดการเกิดโรคเน่าและได้ 66 ถึง 84 % เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการไม่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์และในสภาพไร่ พบว่ากรรมวิธีที่ประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรค ได้แก่ การคลุกเมล็ด และพ่นใบพืชด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s 4 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 14, 28, 42 และ 56 วันหลังปลูก มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมให้กะหล่ำดอกเจริญเติบโตและได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 57 % อีกทั้งยังลดความรุนแรงของโรคเน่าและเน่าดำ (เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) และใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (รา *Alternaria* sp.) ได้ 77.6, 82.3 และ 84.5 % ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติจากแปลงปลูกที่ไม่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์การประเมินความเสี่ยงของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในระบบการผลิต

กะหล่ำดอก พบว่าประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชหลังเก็บเกี่ยวที่อายุ 65 วัน ได้แก่ *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* และ *Serratia* มีจำนวนเปลี่ยนแปลง และ/หรือ เพิ่มขึ้น 1-2 เท่า ซึ่งตรงข้ามกับ *Pectobacterium* ที่มีจำนวนลดลงจากระยะก่อนปลูกพืช ยิ่งไปกว่านั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *hrcN* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส พบว่า SP007s ไม่มียีน *hrcN* ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ ATPase ในระบบ type III secretion ซึ่งจำเป็นต่อการก่อให้เกิดโรค ตลอดจนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเซลล์ใบยาสูบตายอย่างเฉียบพลัน ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่า *P. fluorescens* SP007s ไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรค สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่อาจตกค้างในกลุ่มออร์แกนอโฟสเฟต (โฟรฟิโนฟอส) และกลุ่มไพรีทรอยด์ (ไซเพอร์เมทริน) พบว่ากะหล่ำดอกทุกตัวอย่างทดสอบไม่มีสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิด ตกค้าง งานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP007s หรือ SP009s ร่วมกับการกำจัดศัตรูพืชอย่างเหมาะสมมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นการควบคุมทางเลือกหรือลดการใช้สารเคมีเพื่อการผลิตกะหล่ำดอกเชิงการค้าได้อย่างชัดเจน ($P = 0.05$)

คำสำคัญ : *Pseudomonas fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, ระบบ type III secretion, โพรฟิโนฟอส, ไซเพอร์เมทริน

Abstract

Bacterial antagonists, *Pseudomonas fluorescens* SP007s and *Bacillus licheniformis* SP009s were studied for biological control against cauliflower soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. All antagonists significantly enhanced seedling growth and decreased disease severity from 66 to 84 % compared to non-treated control. Under field conditions, seed treatment plus foliar spray with SP007s 4 times at 14, 28, 42 and 56 days after planting significantly promoted plant growth with 57 % yield increase, and decreased severity of soft rot, black rot (caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and Alternaria leaf spot (*Alternaria* sp.) of 77.6, 82.3 and 84.5 %, respectively. Risk assessment of bacterial antagonists used in cauliflower production for bacterial community impact revealed the rhizosphere populations from soil of plant grown for 65 days including *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* and *Serratia* populations were either constant and/or increased 1-2 folds, while *Pectobacterium* decreased from the initial cultivation. Moreover, the type III secretion system with the ATPase encoding gene *hrcN* necessary for bacterial pathogenicity was determined by PCR that the *hrcN* amplicon has not been found in SP007s. This strain also could not induce hypersensitive response on tobacco. These results indicate that SP007s is not a pathogen. Moreover, pesticide residues analysis including organophosphate (profenofos) and pyrethroid (cypermethrin) groups was investigated. The result revealed that all pesticides were not detected in each cauliflower samples. Results suggested that cauliflower production system using SP007s or SP009s and suitable pesticide has the potential for use in commercial field application as alternative control or reduced pesticide use.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, type III secretion system, profenofos, cypermethrin

1. คำนำ

สารเคมีทางการเกษตรที่ตกค้างในสภาพแวดล้อมนั้นไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีเท่านั้น แต่ยังสามารถแพร่กระจายตกค้างเป็นบริเวณกว้าง การใช้สารเคมีในระบบการผลิตพืชสามารถก่อให้เกิดการสะสมและตกค้างในสภาพแวดล้อมได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่การปลูกเมล็ดพืช ซึ่งจะทำให้สารเคมีตกค้างในดินและต้นพืช จากนั้นการพ่นฆ่าตามโปรแกรมกำหนดก่อให้เกิดการสะสมในดินเพิ่มเติมและยังฟุ้งกระจายไปในบรรยากาศตลอดจนบางส่วนซึมลงไปในดินและสะสมอยู่ในน้ำใต้ดิน และเกิดการนำพาและถ่ายทอดสารเคมีเหล่านี้เข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร รวมทั้งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อไป (Prathuangwong *et al.*, 2006) การผลิตกะหล่ำดอกในทุกพื้นที่มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของโรคพืชซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิต การควบคุมโรคในระบบการผลิตกะหล่ำดอกยังไม่มีวิธีการใดที่เหมาะสม โดยเฉพาะเกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีในการควบคุมโรคเป็นหลัก นอกจากนี้มีรายงานว่าหากใช้ผิดวิธีและผิดอัตราส่วนจะเป็นสาเหตุให้เชื้อโรคดื้อต่อสารเคมีชนิดนั้น ๆ และส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและระบบนิเวศการเกษตร (Rodriguez and Curl, 1980) การศึกษาวิธีการควบคุมโรคในระบบการผลิตกะหล่ำดอกจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาอย่างต่อเนื่อง การควบคุมโรคโดยชีววิธีด้วยการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ โดยมีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s, *Bacilluslicheniformis* SP009s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีศักยภาพสูงในการ

ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดตลอดจนเพิ่มพูนคุณภาพผลผลิต (วิลาวรรณ และคณะ, 2549; Prathuangwong *et al.*, 2005) รวมทั้งได้มีการศึกษาอัตราการใช้ ความถี่ และวิธีการใช้ที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเชื่อมั่นในการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์และสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเข้าร่วมในระบบการผลิตพืชแบบเกษตรดีที่เหมาะสมเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและสารเคมีบางชนิดสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพพืชหรือระบบนิเวศเกษตรได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์และสัตว์ (สุมาลี, 2542) การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและประเมินความเสี่ยงของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s และ *B. licheniformis* SP009s และสารกำจัดศัตรูพืชในระบบการผลิตกะหล่ำดอก

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทดสอบสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อโรคพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกะหล่ำดอก ได้แก่ *P. fluorescens* SP007s และ *B. licheniformis* SP009s (วิลาวรรณ และคณะ, 2549) และสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *B. amyloliquefaciens* KPS46 (Prathuangwong *et al.*, 2005) มาเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร nutrient agar (NA) ก่อนนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความคุ้มครองเนื้อและของกะหล่ำดอก

(1) การทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ

ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกะหล่ำดอกด้วย blotter method โดยนำแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ทั้ง 3 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) อายุ 24 ชั่วโมง ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียปฏิบั้กซ์แต่ละสายพันธุ์ที่ 1×10^8 cfu/ml ด้วยเครื่องspectrophotometer ($A_{600\text{ nm}}$) จากนั้นนำมาคลุกเมล็ดกะหล่ำดอก (อัตรา 1 มิลลิลิตร/เมล็ด 1 กิโลกรัม) กรรมวิธีละ 10 ชั่วโมง ผลโดยวัดอัตราการงอก ความยาวราก และความสูงของต้น เมื่อพืชอายุ 7 วัน หลังงอก เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นคลุกเมล็ด

(2) การทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

นำ suspension แบคทีเรียปฏิบั้กซ์แต่ละสายพันธุ์ (1×10^8 cfu/ml) คลุกเมล็ดกะหล่ำดอกเช่นเดียวกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำไปปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว ดูแลในสภาพเรือนทดลอง และพ่นด้วย suspension แบคทีเรียปฏิบั้กซ์สายพันธุ์เดิมที่ได้คลุกเมล็ดไว้ (1×10^8 cfu/ml) ทุก ๆ 14 วัน และเมื่อกะหล่ำดอกอายุ 56 วัน ทำการปลูกแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (1×10^8 cfu/ml) สาเหตุโรคเน่าและหลังพ่นแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ 24 ชั่วโมง ประเมินระดับความรุนแรงของโรคเน่าและ 7 วัน หลังปลูกเชื้อโรค

(3) การทดสอบในสภาพไร่

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) ในพื้นที่ปลูกกะหล่ำดอกเพื่อการค้า อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี จำนวน 1 ไร่ ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แสดงรายละเอียดใน Table 1 แต่ละกรรมวิธี

ใช้พื้นที่ทดลองขนาด 5x5 ตารางเมตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติและกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมโรค ประเมินผลโดยการเก็บข้อมูลในระยะกล้าอายุ 28 วัน หลังงอก โดยเปรียบเทียบน้ำหนักสดต้น ความสูง ความกว้างและความยาวใบ และในระยะเก็บเกี่ยว 65 วัน ทำการประเมินน้ำหนักดอก ขนาดของดอก การระบาดของโรคเน่า และโรคที่เกิดในสภาพธรรมชาติทุกชนิด ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม R

2.3 การประเมินความเสี่ยงในการเป็นแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบยืนยันว่า *P. Fluorescens* SP007s ไม่ใช่เชื้อก่อโรคในสิ่งมีชีวิต มีการศึกษาคุณสมบัติที่เกี่ยวข้อง 2 ลักษณะ ดังนี้

(1) การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน

เตรียม suspension แบคทีเรียปฏิบั้กซ์ *P. Fluorescens* SP007s (1×10^8 cfu/ml) และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *P. syringae* pv. *syringae* PS13 (1×10^8 cfu/ml) สาเหตุโรคใบไหม้ข้าวโพดปริมาณสายพันธุ์ละ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าสูใบยาสูบอายุ 45 วัน ด้วยหลอดฉีดยาที่ไม่มีเข็มขนาด 1 มิลลิลิตร ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาเซลล์ตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response, HR) บนใบยาสูบบริเวณฉีดเชื้อภายใน 24-48 ชั่วโมง (Schaad, 1988)

(2) การตรวจสอบการมีเอ็นก่อโรค *hrcN*

ตรวจสอบการมีเอ็น *hrcN* ภายใน *P. fluorescens* SP007s ซึ่งเป็นเอ็นที่เกี่ยวข้องกับระบบ ATPase และ Type III secretion ของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มของ *Pseudomonas* spp. และเป็นระบบที่พบในแบคทีเรียสาเหตุโรคทั่วไป (โรคคนและสัตว์) โดยเพิ่มการปริมาตรดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *hrcN*-4r: CGA GCA CAY TCA TGA

ACG และ hrcN-5rR: CCG GWT GGT ATT CAC CCA G (Rezzonico *et al.*, 2004) ซึ่งมีความจำเพาะในบริเวณของ *hrcN* ขนาด 250 bp ภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) เปรียบเทียบกับ

P. syringae pv. *syringae* PS13 จากนั้นตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet

Table 1 Treatments of bacterial antagonist strains SP007s and SP009s for growth promotion and natural diseases infection in cauliflower crops under commercial farming at Suphanburi

Code	Treatment details ^{1/}
T1	ST. + F. with SP007s 2 times (14 and 28 days)
T2	ST. + F. with SP007s 3 times (14, 28, and 42 days)
T3	ST. + F. with SP007s 4 times (14, 28, 42, and 56 days)
T4	ST. + F. with SP009s 2 times (14 and 28 days)
T5	ST. + F. with SP009s 3 times (14, 28, and 42 days)
T6	ST. + F. with SP009s 4 times (14, 28, 42, and 56 days)
T7	ST. + F. with KPS46 2 times (14 and 28 days)
T8	ST. + F. with KPS46 3 times (14, 28, and 42 days)
T9	ST. + F. with KPS46 4 times (14, 28, 42, and 56 days)
T10	Conventional treatment (ST. with copper hydroxide + F. with copper hydroxide plus swine placenta extract 8 times)
T11	Negative control

^{1/} ST = seed treatment, F = foliar spray, KPS46 = strain of *Bacillus amyloliquefaciens*, SP007s = strain of *Pseudomonas fluorescens*, SP009s = strain of *Bacillus licheniformis*, negative control = no input application. All treatments were combined with growers' standard practices of alachlor (weed control) and abamectin application (insect control).

2.4 การประเมินความเสี่ยงด้านแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดิน

ตรวจสอบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินโดยวิเคราะห์ด้วยระบบ biolog ซึ่งใช้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการออกซิไดซ์แหล่งพลังงานคาร์บอนชนิดต่าง ๆ 95 ชนิด ในภาดหลุมทดสอบ (Joseph *et al.*, 1999) ทดสอบโดยสุ่มเก็บดินก่อนและหลังปลูกกะหล่ำดอกจากแปลงทดลอง

ในกรรมวิธีที่ T3, T6, T9 (Table 1) กำหนดพื้นที่สุ่มเก็บดินกระจายทั่วแปลงสุ่มเก็บ 5 จุด ลึกประมาณ 10 เซนติเมตร (Engelen *et al.*, 1988) นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงใน 95 มิลลิลิตร NaCl 0.85 % เขย่า 200 รอบ/นาที แล้วปล่อยให้ตกตะกอน นำส่วนใสมาทำการเจือจางให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml มาหยอดลงบน GN2 plate หลุมละ 150 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophoto-

meter ที่ความยาวคลื่น 590 nm ทุก ๆ 12 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณโดยใช้สมการ $\text{average well color development} = (C-R)/\{\sum(C-R)/95\}$ (Garland, 1997) จากนั้นข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม principle component analysis

2.5 การประเมินความเสี่ยงด้านสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลผลิต

การตรวจสอบสารพิษตกค้างในกลุ่ม organophosphate และ pyrethroid โดยสุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตกะหล่ำดอกกรรมวิธีละ 10 ข้าง มาทำการตรวจสอบสารพิษตกค้างด้วยวิธี HPLC (high performance liquid chromatography) คำนวณปริมาณสารเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเคมีเปรียบเทียบ Profenofos และ Cypermethrin (Prathungwong *et al.*, 2011)

3. ผลการวิจัย

3.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคเน่าและ

(1) ผลการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ

การคลุกเมล็ดกะหล่ำดอกด้วย suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP007s มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดได้ 100 % มีความสูงต้นและความยาวราก 3.6 และ 5.0 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาการคลุกเมล็ดด้วย suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP009s และ KPS46 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และความสูงลำต้น เท่ากับ 100 % และ 100 %, 2.9 และ 2.8 เซนติเมตร และ 5.3 และ 4.8 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2) แสดงให้

เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสารเคมีควบคุมโรค ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อโรคเพียงอย่างเดียว (Prathungwong *et al.*, 2005)

(2) ผลการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง
การคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบกะหล่ำดอกด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP007s สามารถลดความรุนแรงโรคเน่าและได้สูงที่สุด 75.3 % ซึ่งไม่แตกต่างกับการคลุกเมล็ดรวมกับพ่นใบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP009s ที่สามารถลดความรุนแรงโรคเน่าและได้ 71.3 % (Figure 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าและเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ KPS46 และสารเคมี ($P=0.05$)

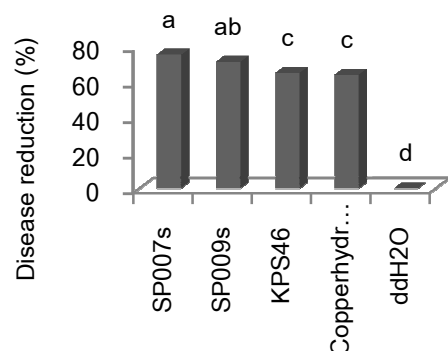


Figure 1 Soft rot reduction under greenhouse conditions after treated with bacterial antagonists.

(3) ผลการทดสอบในสภาพไร่

ผลการทดลองพบว่าในแต่ละกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและเพิ่มผลผลิตได้แตกต่างกัน และให้ผลดีกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ ($P=0.05$)

Table 2 Effect of seed treatment with antagonistic bacteria SP007s and SP009s as seed germination and growth promotion at 7 days after incubating under laboratory conditions^{1/}

Seed treatment ^{2/}	A _{600 nm}	Cell concentration (cfu/ml)	Seed germination (%)	Root length (cm)	Stem height (cm)
SP007s	0.10	2.0x10 ⁶	100a	3.6a	5.0a
SP009s	0.15	2.2x10 ⁶	100a	2.9b	5.3a
KPS46	0.15	2.0x10 ⁶	100a	2.8b	4.8ab
Copper hydroxide	-	-	98ab	2.3c	2.8c
Negative control	-	-	92c	2.5c	2.1c

^{1/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05).

^{2/} Description of antagonistic bacteria followed Table 1.

Table 3 Growth of cauliflower treated with antagonistic bacteria under commercial farming^{1/}

Code	Plant growth						
	Parameter (28 days after planting)				Yield (65 days after planting)		
	Plant height (cm)	Leaf wide (cm)	Leaf length (cm)	Plant weight (g)	Plant weight (g)	Head size (cm)	Marketable weight (g)
T1	17.6b	6.8a	9.9b	16.9b	754.3b	12.3b	642.3a
T2	16.0c	6.1b	11.6a	16.6b	721.3b	12.7b	612.2a
T3	18.5a	7.4a	12.0a	18.6a	784.0a	13.5 a	654.8a
T4	17.3b	6.3b	10.3b	17.7b	632.4c	12.4b	508.0c
T5	17.3b	6.5b	10.3b	17.1b	754.0b	12.4b	623.6a
T6	17.5b	6.3b	8.9c	17.0b	659.7c	12.0b	562.7b
T7	17.6b	7.2a	9.7c	17.3b	755.2b	12.3b	648.2a
T8	17.5b	6.4b	9.7c	17.2b	654.3c	11.8bc	535.4b
T9	16.9b	7.7a	10.7b	17.5b	692.3c	13.5a	562.3b
T10	16.9b	7.6a	9.4c	15.5c	648.0c	10.2c	558.3b
T11	14.3d	5.2c	8.3d	11.3d	476.3d	8.2d	416.3d

^{1/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05). Details of treatments code T1-T11 are the same as explained in Table 1.

โดยกรรมวิธี T3 คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบ 4 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 14, 28, 42 และ 56 วันหลังงอก ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกะหล่ำดอกทั้งระยะกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว (Table 3) เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดนี้มีความสามารถในการผลิต secondary metabolites บางกลุ่ม ซึ่งมีรายงานข่าวสารบางชนิดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการงอกและส่งเสริมเจริญของยอดและราก เช่น การผลิตสาร indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberellins ส่งผลให้กะหล่ำดอก

รอดพ้นจากการเข้าทำลายของโรคหลายชนิดที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ ได้แก่ โรคเน่าและ (จากแบคทีเรีย *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) ขอบใบทอง (แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) และใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (รา *Alternaria* sp.) ได้ดีที่สุด 77.6, 82.3 และ 84.5 % ตามลำดับ (Table 4) ยิ่งไปกว่านั้นกรรมวิธีดังกล่าวให้ผลผลิตกะหล่ำดอกคุณภาพโดยเฉลี่ย 2 ตัน/ไร่ นอกจากนี้กรรมวิธีดังกล่าวยังให้ผลดีกว่าในทุกตัวชี้วัดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ รวมทั้งกรรมวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ

Table 4 Effect of biological and conventional controls on disease severity of economic cauliflower diseases under commercial farming at Suphanburi^{1/}

Code	Disease severity (%) ^{2/}			Disease reduction (%)			Yield (ton/rai)
	SR	BR	AL	SR	BR	AL	
T1	17.4d	27.7c	12.0c	66.6b	56.2d	76.9b	1.7d
T2	16.3c	18.5b	11.1b	68.6b	70.7c	78.6b	1.4g
T3	11.6a	11.2a	8.1a	77.6a	82.3a	84.5a	2.0a
T4	13.0b	17.2b	11.1b	75.0a	72.7c	78.8b	1.5f
T5	13.6b	16.3b	11.2b	73.8a	74.2b	78.4b	1.8c
T6	12.8b	15.3b	11.3b	75.4a	75.8b	78.3b	1.6e
T7	11.2a	11.8a	10.3b	78.4a	81.3a	80.3a	1.9b
T8	10.6a	16.3b	9.6ab	69.9b	74.2b	81.5a	1.6e
T9	11.2a	12.6a	8.3a	78.4a	80.0a	84.0a	1.7d
T10	15.9c	24.8c	29.5d	69.5b	60.7d	43.4c	1.2h
T11	52.0e	63.2d	52.0e	0.0c	0.0e	0.0d	0.6i

^{1/} Mean values in column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05). Details of treatments code T1-T11 are the same as explained in Table 1.

^{2/} SR= soft rot, BR= black rot and AL= Alternaria leaf spot.

3.2 ความเสี่ยงในการเป็นแบคทีเรียก่อโรค

(1) ผลการทดสอบปฏิกริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน

การทดสอบสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ในการเป็นเชื้อก่อโรคในสิ่งมีชีวิต พบว่า SP007s ไม่สามารถชักนำให้เกิดปฏิกริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลันบน

ใบยาสูบได้ (Figure 2) ในขณะที่สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *P. syringae* pv. *syringae* PS13 สาเหตุโรคพืชกระตุ้นให้ยาสูบเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน โดยปรากฏอาการไหม้ตรงบริเวณที่ปลูกเชื้อ ทั้งนี้ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นวิธีการขั้นต้นสำหรับการตรวจสอบว่าแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือไม่ โดยอาศัยปฏิกิริยาการจดจำของเชื้อโรคและพืชอาศัยบนพื้นฐานของการศึกษาระบบ Type III secretion แสดงให้เห็นว่า SP007s ไม่ใช่แบคทีเรียสาเหตุโรค

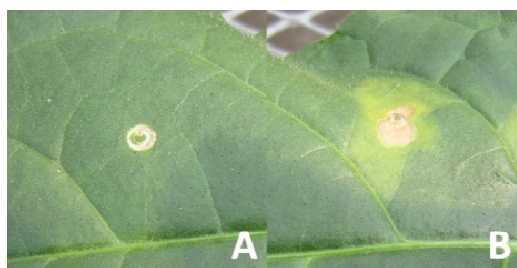


Figure 2 Hypersensitive response (HR) symptom on tobacco (*Nicotianatabacum* cv. *xanthi*) leaf infiltrated with cell suspension of *P. fluorescens* SP007s could not induce HR symptom at infiltration area (A) where *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* PS13 induced HR at 48 h after inoculation (B).

(2) ผลการตรวจสอบยีน *hrcN* ที่เกี่ยวข้องกับการเป็นเชื้อสาเหตุโรค

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s มาตรวจสอบการปรากฏของยีน *hrcN* เพื่อยืนยันว่า *P. fluorescens* SP007s ไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช มนุษย์ และสัตว์ พบว่าปฏิกิริยา PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *hrcN* ของ SP007s ได้ แสดงให้เห็นว่า SP007s ไม่

มียีน *hrcN* ในขณะที่สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *P. syringae* pv. *syringae* PS13 ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีขนาด 250 bp (Figure 3) ซึ่งผล sequencing พบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีความเหมือน 100 % กับยีน *hrcN* จึงสามารถยืนยันและสรุปได้ว่า *P. fluorescens* SP007s ไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรค และไม่มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนเป็นเชื้อก่อโรคได้

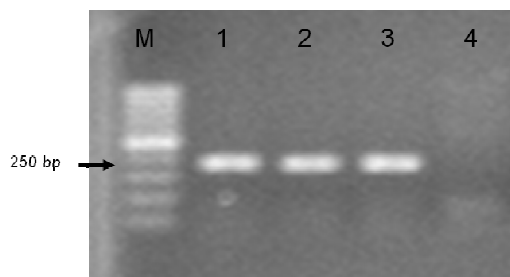


Figure 3 The PCR product of *hrcN* gene amplified with specific primers and separated by electrophoresis on a 0.8 % agarose gel. Lane M = 1 kb ladder, lanes 1, 2 and 3 = PCR products amplified, 250 bp fragment from genomic DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* PS13 and lane 4 = *P. fluorescens* SP007s.

3.3 ความเสี่ยงด้านการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดิน

ผลกระทบของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อโครงสร้างแบคทีเรียในดิน โดยการตรวจสอบตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บในแปลงทดลองก่อนและหลังใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (กรรมวิธีที่ T3, T6 และ T9) พบว่าจำนวนประชากรแบคทีเรียที่ตรวจพบมีชนิดและปริมาณแตกต่างกัน โดยตัวอย่างดินก่อนมีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* และ

Pectobacterium เท่ากับ 34, 26, 18, 8 และ 14 % ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณของแบคทีเรียที่ตรวจพบในดินหลังการเก็บเกี่ยวกะหล่ำดอกพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของประชากรของแบคทีเรียในดินนั้น ๆ โดยพบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้ SP007s ในการคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบ (T3) ตรวจพบ *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Serratia* และ

Pectobacterium มีปริมาณ 31, 23, 6 และ 8 % ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Pseudomonas* มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 32 % ในขณะที่กรรมวิธี T6 และ T9 ให้ผลการเปลี่ยนแปลงของประชากรในดินเช่นกัน โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus* มีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้น (Figure 4)

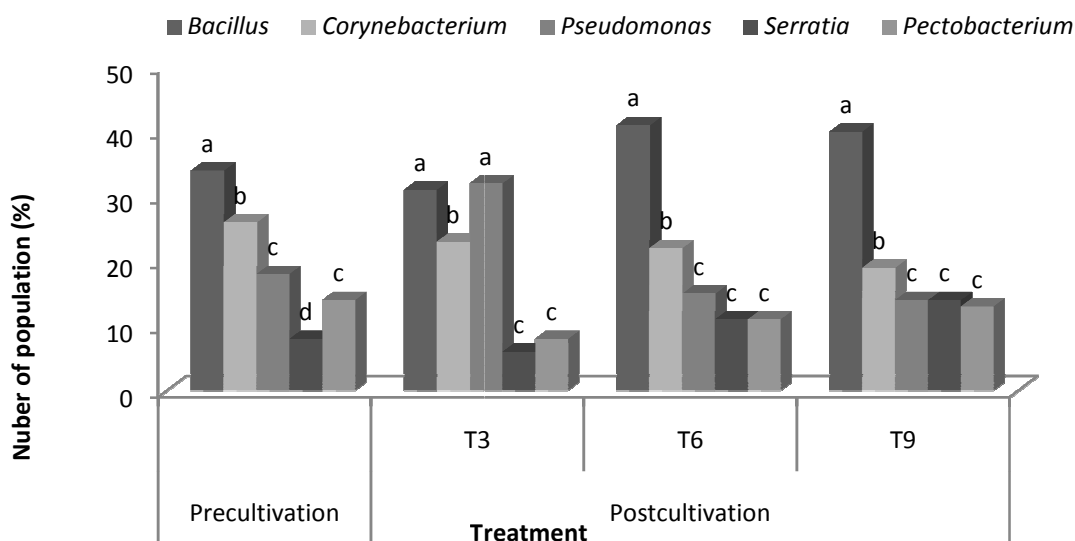


Figure 4 The impact of biological control agent on the bacterial community structure in cauliflower cultivated soil before and after treated with antagonistic bacteria.

3.4 การตรวจสอบสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลผลิต

ผลการตรวจสอบสารเคมีในกลุ่ม organophosphate และ pyrethroid ซึ่งเป็นสารเคมีกลุ่มที่นิยมใช้ในการควบคุมศัตรูพืชในระบบการผลิตกะหล่ำที่อาจตกค้างในผลผลิต พบว่าตัวอย่างกะหล่ำดอกที่ตรวจวิเคราะห์ทุกกรรมวิธีไม่พบสารพิษตกค้างเกินที่ประกาศของกระทรวงสาธารณสุข (2548) ในทุกกลุ่มที่มีการตรวจสอบ และจากการทดลองพบว่าปริมาณของสารเคมีในกรรมวิธีที่มีการใช้สารเคมีควบคุมทั้งโรคและแมลง

ศัตรูพืชอย่างสมบูรณ์มีการตกค้างของสารพิษสูงกว่าเมื่อเทียบกับการกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ด้วยแสดงให้เห็นว่ากลุ่มของแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์อาจมีกลไกในการยับยั้งเชื้อโรคและ/หรือย่อยสลายสารเคมีที่ตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อมได้ด้วย (Table 5)

4. วิจารณ์

การคลุกเมล็ดด้วย suspension แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด ความสูงต้น

Table 5 The residues analysis from marketable cauliflower sample^{1/}

Chemical	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
Organophosphate group											
Profenofos	0.07	0.08	0.05	0.06	0.07	0.08	0.07	0.07	0.09	0.12	0.08
Pyrethroid group											
Cypermethrin	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.1	0.03

^{1/} Maximal residue limited of profenofos and cypermethrin in cauliflower with 0.5 and 1 mg/kg, respectively.

และความยาวราก รวมทั้งกระตุ้นให้กะหล่ำดอกทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และสภาพไร่ เมื่อเปรียบเทียบกับ การควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิบัณช์ชนิดอื่นและกรรมวิธีควบคุมที่เกษตรกรปฏิบัติ (ใช้สารเคมี) แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์ด้วยความถี่และวิธีการที่เหมาะสมจะส่งเสริมประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัณช์เหล่านั้นให้แสดงออกอย่างเต็มศักยภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์ในการคลุกเมล็ดก่อนปลูก เป็นการกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ด (โรคขอบใบทอง) หรือป้องกันเชื้อโรคในดินเข้าทำลายเมล็ดหรือต้นกล้า (โรคเน่าระดับดินและโรคเน่าละ) ซึ่งโรคเน่าละยังสามารถอยู่ข้ามฤดูในดิน มีรายงานว่า การพ่นใบกะหล่ำดอกด้วยแบคทีเรียปฏิบัณช์เป็นการปกป้องพืชในส่วนเหนือดินให้รอดพ้นจากโรคที่สำคัญ (ขอบใบทอง ใบจุดอัลเทอร์นาเรีย และราน้ำค้าง) ซึ่งความถี่ในการพ่นแบคทีเรียปฏิบัณช์จำนวน 4 ครั้ง ทุก 14 วัน นั้น เป็นความถี่ที่เหมาะสมเนื่องมาจากเชื้อโรคแต่ละชนิดมีช่วงเวลาในการเข้าทำลายพืชได้แตกต่างกัน (ศศิธร, 2545)

การประเมินความเสี่ยงและผลกระทบของการใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์ต่อโครงสร้างแบคทีเรียในดิน พบว่าประชากรแบคทีเรียปฏิบัณช์เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันจำนวนประชากรเชื้อโรค โดยเฉพาะ

เชื้อสาเหตุโรคเน่าละ (*Pectobacterium*) ลดลง ในช่วงที่มีการศึกษาทดลองควบคุมโรคด้วยชีววิธีซึ่งมีความแปรผันตรงต่อความรุนแรงของโรคเน่าละ โดยแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. Fluorescens* SP007s ซึ่งมีกลไกในการแข่งขันสามารถผลิตสาร siderophores ออกมายึดจับเหล็กทำให้เชื้อโรคหรือแบคทีเรียบางชนิดขาดธาตุเหล็กไม่สามารถเจริญได้ (Bakker and Cook, 1974) การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีจึงมีทั้งผลบวกและลบซึ่งอาจมีผลต่อจำนวนของแบคทีเรียบางกลุ่มโดยการแทนที่จุลินทรีย์ท้องถิ่น (Raaijmakers *et al.*, 1995) การใช้แบคทีเรียปฏิบัณช์รวมในระบบการผลิตพืชจึงสามารถลดการใช้สารเคมีหรือใช้เท่าที่จำเป็น และลดค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนในการผลิตพืชให้ต่ำลง ขณะเดียวกันผู้ผลิตจะได้พืชผลคุณภาพปลอดภัยตามต้องการ โดยไม่มีสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างทั้งในผลผลิตและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิบัณช์จะยังคงอยู่ในสภาพแวดล้อมการปลูกพืช นั้น ๆ ได้ยาวนานต่อเนื่อง ไม่สูญเสียหรือใช้ซ้ำบ่อยครั้งเช่นสารเคมี ตลอดจนมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ทำลายระบบนิเวศเกษตร

5. สรุป

การคลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบกะหล่ำดอกด้วย *P. fluorescens* SP007s 4 ครั้ง เมื่อพืชอายุ

14, 28, 42 และ 56 วันหลังปลูก เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคเน่าและรวมทั้งโรคสำคัญอื่น ๆ ที่เข้าทำลายกะหล่ำดอกในสภาพธรรมชาติ ซึ่ง SP007s ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและไม่มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนเป็นเชื้อก่อโรคได้นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์นี้ยังมีฤทธิ์เลือกทำลายเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคพืช ไม่ทำลายโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (จุลินทรีย์ที่มีเป็นประโยชน์และจุลินทรีย์อิสระ) ในระบบนิเวศเกษตร อีกทั้งยังสามารถใช้ร่วมกับสารกำจัดศัตรูพืช (แมลงและวัชพืช) ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมตามมาตรฐานเกษตรที่ดีที่เหมาะสม

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ที่ให้คำแนะนำในระหว่างการศึกษาและอนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อ และขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

7. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข, 2548, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 288) พ.ศ. 2548 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้างอาหารที่มีสารพิษตกค้าง, 16 น.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒิวนิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2549, การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของกะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ, น. 795-810, ในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร วุฒิวนิชย์, 2545, โรคของผักและการควบคุมโรค, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2542, ศึกษาความผันแปรของยีนแฟคจิลินในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Pseudomonas ribotype I* และ *ribotype II* (Burkholderia), ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

Bakker, K.F. and Cook, R.J., 1974, Biological Control of Plant Pathogens, W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

Engelen, K.M., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.P. and Backhaus, H., 1988, Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures, Appl. Environ. Microbiol. 64: 2814-2821.

Garland, 1997, Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology, Microbiol. Ecol. 24: 289-300.

Joseph, A.O., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E. and McNab, W.B., 1999, Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems, J. Clin. Microbiol. 37: 944-949.

Prathuangwong, S., Kasem, S., Preecha, C., Chuaboon, W., Hiromitsu, N. and Suyama, K., 2006, Biological control and crop improvement against cauliflower diseases

- p>with new potential microorganisms and bioproducts, In Proc. of the ISSAAS International Congress, Dec 9-11, 2006. University Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Kuala Lumpur, 23-24.
- Prathuangwong, S., Chatnaparat, T., Chuaboon, W., Pupakdeeapan, W., Sulaiman, A. and Hemsanit, N., 2011, *Pseudomonas fluorescens* SP007s reduces plant infection and increases γ -aminobutyric acid in seed infected by a complex pathogens of rice, *Phytopathology* 101: S146.
- Prathungwong, S., Preecha, C., Vudtivanich, S., Kasem, S., Buensanteai, N. and Chuaboon, W., 2005, Occurrence and biological control of cauliflower at Suphanburi, In The ISSAAS International Congress 2005, Dec. 12-14, 2005, Hanoi.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M., 1995, Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp., *Phytopathology* 85: 1075-1081.
- Rezzonico, F., De'fago, G. and Moe'nneloccoz, Y., 2004, Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcN* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and in phytopathogenic proteobacteria, *AEM*. 70: 5119-5131.
- Rodriguez, K.R. and Curl, E.A., 1980, Non-target effect of pesticides on soilborne pathogen and disease, *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 311-322.
- Schaad, N.W., 1988, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Bacteriology Committee of American Phytopathological Society, St. Paul MN., 245 p.