

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยว  
พืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*

Evaluation of an efficiency of *Bacillus subtilis* for controlling  
*Fusarium* wilt of cucurbitaceae caused by *Fusarium solani*

อภิรักษ์ สมฤทธิ์ บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณีฐริมา โฆษิตเจริญกุล  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani* ได้ดำเนินการตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สร้าง clear zone ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้ดี นำเชื้อ *F. solani* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และมาเลี้ยงขยายบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ทำการปลูกแตงกวา แตงร้าน และมะระ ในแปลงปลูกที่คลุกเชื้อในดินด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วรดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* เมื่อตรวจสอบการทดลองพบว่า แตงกวา แตงร้าน และมะระ ที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F. solani* แล้วรดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย มีการงอกเมล็ดและเจริญของต้นได้ดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F.solani* แต่ไม่ได้รดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* อย่างเห็นได้ชัดเจน

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-09-56

## คำนำ

การปลูกพืชตระกูลแตงเป็นการค้า เช่น แตงกวา แตงโม แคนตาลูป และฟักทอง เกษตรกรผู้ปลูกแตงเป็นการค้ามักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. อยู่เสมอ โรคที่มักเกิดจากเชื้อราสกุล *Fusarium* คือโรคเหี่ยว (*Fusarium wilt*) ที่เกิดกับพืชตระกูลแตงในระหว่างการปลูกในแปลงปลูก และโรคผลเน่า ทั้งที่เกิดขึ้นกับผลแตงในระหว่างการปลูก และมักพบในระยะที่ผลแตงที่เก็บเกี่ยวมาแล้ว และรอการขนส่งจำหน่าย ในต่างประเทศพบว่าโรคผลเน่าเป็นปัญหาที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกแตงเป็นการค้ามาก โดยมีรายงานการพบเชื้อราสกุล *Fusarium* หลายชนิด ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่า ได้แก่ *F. gramineum*, *F. acuminatum*, *F. culmorum*, and *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. scirpi*, และ *F. solani* ซึ่งลักษณะอาการที่เกิดบนผลแตงก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา *Fusarium* สำหรับในประเทศไทย ความเสียหายในพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* นั้น เป็นอาการโรคเหี่ยว (*Fusarium wilt*) ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium* 2 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum* และ *F. solani* โดยเชื้อรา *F. solani* มีแนวโน้มว่าจะพบทำให้เกิดโรคเหี่ยวมากขึ้น โดยเฉพาะกับแตงกวาที่ปลูกเป็นการค้า อาการของโรคจะพบเห็นชัดเจน เมื่อใบและลำต้นของแตงเหี่ยวเฉา เป็นสีเหลือง และแห้งเป็นสีน้ำตาล ซึ่งอาการเริ่มแรกนั้นมาจากโคนต้นของแตงกวา ที่มีแผลแห้งตายสีน้ำตาลเนื่องจากเชื้อสาเหตุเข้าทำลายทางราก จนทำให้เนื้อเยื่อที่ลำเลียงน้ำ และแห้งตายในที่สุด จากปัญหาที่เกิดขึ้น แม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในการป้องกันกำจัดหรือควบคุมการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน และมีการอยู่รอดในเศษซากพืชข้ามฤดูได้ ทำให้การใช้สารเคมียังไม่ได้ผลดี คู่มาพร้อมกับค่าใช้จ่ายที่เสียไป แต่กลับทำให้เสียเงินลงทุนทำการเกษตรมากขึ้น ในขณะที่ราคาผลผลิตเกษตรยังคงตกต่ำ เช่นปัจจุบัน

จากปัญหาการระบาดและเข้าทำลายของเชื้อราในกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเนื้อหลังการใช้ ทดแทนการใช้สารเคมีที่ ซึ่งปัจจุบันวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช ดังนั้นจึงได้วางแผนการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีการจำหน่ายเป็นการค้า และที่มีการทดสอบแล้วว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* มาใช้เป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* ซึ่งคาดว่าผลการศึกษาและข้อมูลรวมถึงผลสรุปที่ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในการป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นทางเลือกการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อสร้างระบบเกษตรกรรมของประเทศไทยให้ยั่งยืน และยั่งยืนสืบต่อไป

## วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาสเหตุจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช เช่น ตู้เย็บเชื้อ เข็มเขี่ย จานแก้วเลี้ยงเชื้อ แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA), Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Corn Leaf Ager (CLA)
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope) กล้อง Stereoscopic microscope และกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์
4. เอกสารและตำราเกี่ยวกับชนิดและภาพ (monograph) ของเชื้อรา
5. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
6. เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Bacillus subtilis*

### วิธีการทดลอง

1. เตรียมดินผสมเพื่อใช้ทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงในเมล็ดข้าวฟ่าง ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ปมเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อรา มาคลุกเคล้ากับดินในแปลงปลูกแตงขนาด 10x1.20 เมตร พักดินไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อราฟื้นตัวและเจริญอยู่ในดินได้
2. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ซึ่งผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนแล้วว่า สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงในสภาพโรงเรือนปลูกพืชได้ ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PSB (Potato Sucrose Broth) วางขวดบนเครื่องเขย่า (shaker) เปิดอัตราการเขย่าด้วยความเร็วต่ำประมาณ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เตรียม cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis*. ทดสอบ ที่ความเข้มข้นประมาณ  $10^7$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำ cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis*. ราวดินที่มีเชื้อรา *F. solani* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร
4. หยอดเมล็ดพืชตระกูลแตงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรีน 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite) ลงในดินที่เตรียมไว้ ในแปลงขนาด 10x1.20 เมตร โดยมีระยะปลูกระหว่างต้น และระหว่างแถว 30 เซนติเมตร จำนวน 3 เมล็ดต่อ 1 หลุม ทำการทดลอง 4 แปลง (ซ้ำ) โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบกรรมวิธีไม่ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* (รดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* (ใส่เมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อ)
5. ตรวจสอบผลโดยนับจำนวนต้นเหี่ยว ทุก ๆ 7 วัน หลังจากปลูกพืชตระกูลแตงได้ 1 สัปดาห์ แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นแตงทั้งหมด และวิเคราะห์ผลการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* (รดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ) และกรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* (ใส่เมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อ)

### เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2557
สถานที่	กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani* ได้ดำเนินการตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สร้าง clear zone ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้ดี นำเชื้อ *F. solani* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และมาเลี้ยงขยายบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ทำการปลูกแตงกวา แตงร้าน และมะระ ในแปลงปลูกที่คลุกเชื้อในดินด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วรดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* เมื่อตรวจสอบการทดลองพบว่า แตงกวา แตงร้าน และมะระ ที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F. solani* แล้วรดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย มีการงอกเมล็ดและเจริญของต้นได้ดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F.solani* แต่ไม่ได้รดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* อย่างเห็นได้ชัดเจน

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สร้าง clear zone ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้ดี นำเชื้อ *F. solani* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และมาเลี้ยงขยายบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ทำการปลูกแตงกวา แตงร้าน และมะระ ในแปลงปลูกที่คลุกเชื้อในดินด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วรดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* เมื่อตรวจสอบการทดลองพบว่า แตงกวา แตงร้าน และมะระ ที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F. solani* แล้วรดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย มีการงอกเมล็ดและเจริญของต้นได้ดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F.solani* แต่ไม่ได้รดด้วยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* อย่างเห็นได้ชัดเจน

### เอกสารอ้างอิง

- Abeyasinghe, S. 2007. Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01. RUHUNA JOURNAL OF SCIENCE Vol. 2, September 2007,pp. 82-88. <http://www.ruh.ac.lk/rjs/rjs.html>
- Cavaglieri, L., J. Orlando, M.I. Rodriguez, S. Chulze and M. Etcheverry. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156 (5-6): 748-754.
- Czarczyk, K., K. Trojanowska, and B. Stachowiak. 2002. Inhibition of Ergosterol Biosynthesis in Fungal Plant Pathogens by *Bacillus* sp. *Polish Journal of Environmental Studies* 11 (5): 593-597.
- El-hamshary, O.I.M., and A.A Khattab. 2008. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and Their Fusants Against *Fusarium solani*. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2(2): 24-29.

El-Mohamedy, R. S. R. 2009. Efficiency of different application methods of biocontrol agents and biocides in control of Fusarium root rot on some citrus rootstocks. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, Volume 42, Issue 9 September 2009 , pages 819 – 828.