พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

Development of New Isolate of *Bacillus subtilis* to Control *Alternaria brassicicola* , a Causal Agent of Chinese Kale Leaf Spot

บุษราคัม อุดมศักดิ์ [1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] สุรีย์พร บัวอาจ [1/]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/] รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง [1/]
Boossaracum Udomsak [1/] Nuttima Kositcharoenkul [1/] Sureeporn Bua-art [1/]
Buranee Puawongphat [1/] Rossukon Rungjang [1/]

ABSTRACT

Chinese kale leaf spot, causes by *Alternaria brassicicola*, has been one of important diseases of chinese kale causing damage at every growth stage in all production areas and brought about more fungicides use to control the disease. Biological control is an alternative consideration to reduce chemical usage. However, a limiting factor for biological control is the un-survival of antagonists on plant leaf surface. Promising antagonists may be the bacteria in Bacillus group which has a special ability in producing endospores that could tolerance and grew well in field condition. During October 2011 – September 2013, 135 isolates of *Bacillus* spp. isolated from soil, manure, and planting materials, were evaluated for the ability to inhibit growth of *A. brassicicola* using dual culture technique and 5 isolates found to highly inhibit mycelia growth of *A. brassicicola* were 20W1 20W5 20W4 20W12 and 17G18. These isolates were then tested for the disease control in the screen house by spraying of its cell suspension prior to the inoculation of the pathogen . We found that all isolates could effectively reduce chinese kale leaf spot disease to 46.77%, 52.81%, 59.99%, 60.45% and 71.31% respectively compared to 73.79% of the disease in non-antagonist spraying treatment. Field trial at Ta Maka District, Kanchanaburi province also showed the similar results. Those 5 isolates of *Bacillus* spp., then, were formulated into powder formulation and brought back to test at the same field. The results showed that all isolates could significantly control the disease better than a non-antagonist spraying treatment. *B. subtilis* 20W1 was the most effective one which could reduce the disease to 32.88%. Efficacy trial of the 20W1 isolate at 20-30 grams/20 liters of water showed the disease control at the same level as using mancozeb 80% WP at 40 grams/20 liters of water and significantly control the disease when applied at 40-50 grams/20 liters of water. In conclusion, *B. subtilis* 20W1 is a new isolate that showed high potential to develop to be bio-fungicide to use in farmers' field and upgrade to a commercial scale.

Key-words : *Alternaria brassicicola* , Chinese Kale Leaf Spot, Bacillus

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

โรคใบจุดคะน้า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เป็นโรคที่มีความสำคัญ ทำความเสียหายกับคะน้าทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกแหล่งปลูก ทำให้มีการใช้สารเคมีในปริมาณสูง การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะลดการใช้สารเคมีได้ แต่ที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบยังมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถเจริญบนพืชได้ ยกเว้นแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานและสามารถเจริญได้ดีบนพืช จึงได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 ทำการคัดเลือกเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture technique จาก *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ไอโซเลท 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มีศักยภาพสูงสุด นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบการควบคุมโรคเบื้องต้นในโรงเรือนโดยพ่น cell suspension ของ *Bacillus* spp. ก่อนปลูกเชื้อ *A. brassicicola* พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ 73.79 นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบในแปลงปลูกที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิธีพ่นด้วย cell suspension พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง นำไปทดสอบในแปลงปลูกเดิม พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การทดสอบอัตราการใช้ของ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 พบว่า อัตรา 20 - 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพ ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงเกษตรกร และสามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

คำหลัก: คะน้า โรคใบจุด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

คำนำ

ปัญหาหลักของการปลูกคะน้าคือโรคและแมลงศัตรู โดยโรคพืชที่สำคัญคือ โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire เป็นเชื้อราที่มักทำให้เกิดโรคกับพืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้านใบ และลำต้น และพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการในต้นแก่มักพบบนใบและก้านใบ เป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง ซึ่งจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของเชื้อราแพร่ไปตามลม น้ำ แมลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือ ระบาดมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้พบได้ทุกแหล่งปลูก สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเป็นอันดับแรก และมักใช้อย่างผิดวิธีจึงทำให้เกิดผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าว การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในต่างประเทศมีการผลิตจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น *Bacillus subtilis* MBI 600 ; Integral ® หรือ *Bacillus subtilis* QST 713 ซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา หรือ Environment Protection Agency ; EPA (WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถพบได้ทั่วไปในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม-สามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอุลตร้าไวโอเลต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker and Cook, 1974) นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994) ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาเป็นชีวินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช แบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้เช่นเดียวกับ Pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง (นิพนธ์, 2538) พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลองที่ปลูกข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48 52.53 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 65.46% อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ณัฏฐิมา

และคณะ (2548) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ 70-100% วรรณวิไล และคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และWS 18 เพื่อควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำนึ่ง ในปี พ.ศ. 2550 บุษราคัมและ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอกและวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4 22W10 20W12 17G18 และ 20W4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. solani* ได้ 100%

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานีสจะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ บุษราคัมและณัฏฐิมา (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 มิลลิลิตร ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียนี้ชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำให้ใช้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบให้อาหารกับหนูทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัว เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ที่มีความทนทาน สามารถพัฒนาและเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพแวดล้อม เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูกให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมโรคพืชที่ระบบรากมักประสบความสำเร็จ แต่การนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบมักมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิสูง จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาพแปลงปลูก จึงต้องทำการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรค

สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ ตลอดจนขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dextrose agar) PSA (Potato sucrose agar) PSB (Potato sucrose broth) และผงทัลคัม
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 135 ไอโซเลท
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) และตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
4. วัสดุเกษตร เช่น ดินปลูก กระถางปลูก ปุ๋ยเคมี และสารกำจัดแมลง

วิธีการ: ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์โรคพืช (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955) ดังนี้

- เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA และเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PSA จนกระทั่งโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร PDA ไว้แล้ว ใช้ Loop แตะเบา ๆ ที่โคโลนีของ *Bacillus* spp. ที่จะนำมาทดสอบ ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาขีดเป็นเส้นตรงขนานกับโคโลนีของเชื้อราทดสอบ 4 ด้าน โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 เซนติเมตร โดยใช้ *Bacillus* spp.

1 ไอโซเลทต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) ที่ใช้น้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทดสอบ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ± 3 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล : บันทึกผลโดยวัด inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆ ที่เชื้อรา *A. brassicicola* ไม่เจริญเติบโต โดยวัดระยะห่างจากแนวเส้น *Bacillus* spp. ถึงขอบเชื้อรา *A. brassicicola* ทั้งสี่ด้าน นำมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของ inhibition zone โดยตรวจผลเมื่อกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อรา *A. brassicicola* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากนั้นคัดเลือกไอโซเลท 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือนต่อไป

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง

นำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

วิธีดำเนินการ:

ปลูกคะน้าในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว 5 ต้นต่อกระถาง จำนวน 20 กระถางต่อกรรมวิธี รวมทั้งสิ้น 140 กระถาง

นำ cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ที่เลี้ยงโดยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร พ่นลงบนคะน้าที่มีอายุประมาณ 60 วัน ให้ชุ่มทั้งใบและต้น ด้วยกระบอกฉีดน้ำแบบอัดลม เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่น cell suspension เชื้อรา *A. brassicicola* ความเข้มข้นประมาณ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control -) พ่นด้วย และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control +) พ่นด้วย *A. brassicicola*

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรคโดยประเมินพื้นที่ใบและต้นคะน้าที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มนับจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 21 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง : เตรียมแปลงขนาดกว้าง 1.2 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร หว่านเมล็ดคะน้า และถอนแยกให้มีระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 10 เซนติเมตรและระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 25 เซนติเมตร เมื่อคะน้ามีอายุ 35 วัน จึงเริ่มดำเนินการทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบ: เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5ไอโซเลท บนอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน นำมาทำเป็น cell suspensionโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ขูดเอาเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารออก จากนั้นนำไปกวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร(magnetic stirrer) ปรับความเข้มข้นโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงไป เพื่อให้ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตรสำหรับเชื้อรา *A. brassicicola* เตรียมโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension โดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ *Bacillus* spp. ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร

การทดสอบ: พ่น cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp.ที่เตรียมไว้ลงบนต้นคะน้า โดยใช้เครื่องพ่นชนิดอัดลม พ่นเชื้อ *Bacillus* spp. 2 ครั้งๆ ที่ 1 ก่อนพ่นเชื้อ *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน และครั้งที่ 2 หลังจากพ่น *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วัน หลังการทดสอบ

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง

- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร PSB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมงแล้ว เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงไป เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่าของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมได้ คนให้เข้ากัน นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) นำมาบดให้ละเอียด เก็บในขวดแก้วและถุงพลาสติก ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ทดสอบ ต่อไป (Figure2)

การทดสอบ :

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ดำเนินการทดลองที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยนำชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ละลายน้ำ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นลงบนต้นคะน้าที่เตรียมไว้ 2 ครั้งโดยพ่นชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ก่อน การพ่นเชื้อรา *A. brassicicola* 2 วัน และหลังการพ่น *A. brassicicola* 2 วัน พ่นด้วยถังพ่นชนิดอัดลม

การบันทึกข้อมูล :บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 Control (+) พ่น เชื้อรา *A. brassicicola*

กรรมวิธีที่ 8 Control (-) พ่นน้ำเปล่า

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดสอบ:

- เตรียมแปลงปลูกคะน้า ที่ อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี จำนวน 16 แปลง โดยมีขนาดแปลง เท่ากับ 1.50 x 30 เมตร ปลูกคะน้าโดยวิธีหยอดเมล็ด เมื่อคะน้าอายุได้ 60 วัน ทำการพ่นสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 อัตราต่างๆ ตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4

การบันทึกข้อมูล: บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 7 วันหลังการทดสอบ

การจัดจำแนกสปีชี่ส์ Bacillus : จัดจำแนกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API ® strip range technique (แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร อ. ท่ามะกา และ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท พบว่า มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 90 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA โดยมี 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้แก่ 20W4 20W1 20W5 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.68 1.60 1.58 1.46 และ 1.36 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* ได้สูงสุด (Table1)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp.ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. (C+) โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรค รองลงมา ได้แก่ 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 73.79 (Table 2)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่า *Bacillus* spp.ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 2.70 และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.40 รองลงมาได้แก่ 20W4 และ 20W12 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.91 และ 6.44 ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 13.36 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 5 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท 20W1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.79 6.23 และ 1.90 ตามลำดับ โดยที่ไอโซเลท 20W4 20W1 และ 20W12 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 21.68 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.23 และ 2.42 ตามลำดับ โดยทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 23.50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3**)**

4. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในสภาพแปลงปลูก พบว่า หลังการทดสอบ 7 วัน กรรมวิธีที่มีการพ่น *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการพ่น *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 20W5 17G18 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 41.26 43.55 43.88 และ 48.52 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด โดยสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% (Table 4)

5. ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบ พบว่า การพ่นด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 ทุกอัตราที่ทดสอบได้แก่ 20 30 40 50 และ 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่พ่น *B. subtilis* โดย อัตรา 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5)

การจัดจำแนก *Bacillus* : ผลการการจัดจำแนก *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี API ® strip range technique พบว่า 20W5 20W12 20W4 และ 20W1 (Figure 1) เป็น *B. subtilis* สำหรับไอโซเลท 17G18 เป็น *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสปีชีส์หนึ่งที่ได้รับการขึ้นทะเบียนในต่างประเทศ ให้จำหน่ายเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช เช่นกัน (http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/21989.pdf)

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท โดยการพ่นด้วย cell suspension นั้น ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 20W4 แต่เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลท มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่า ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 41.26 โดยที่ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W5 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 43.55 และ 43.88 ตามลำดับ และไม่แตกต่างทางสถิติ กับ 20W1 ก็ตาม แต่ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่จะสามารถนำไปใช้ในแปลงปลูกซึ่งแต่ละพื้นที่ปลูกอาจจะมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของจุลินทรีย์นั้น จำเป็นจะต้องคัดเลือกสายพันธ์ที่มีศักยภาพสูงสุด เมื่อมีการนำไปผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่เกษตรกรสามารถใช้ได้สะดวก ง่าย ไม่ยุ่งยากนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวจะต้องสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และเพิ่มปริมาณในสภาพธรรมชาติได้ดี จึงจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ดังนั้นในงานทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์จึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์จนถึงระดับที่ทำเป็นสารชีวภัณฑ์ได้ จึงจะประสบผลสำเร็จ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่จำเป็นต้องคัดเลือกจนได้ไอโซเลทหรือสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเพียงหนึ่งเดียว ซึ่งก็เพียงพอต่อการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ เช่น Yun *et al.* (2013) ได้ทำการคัดเลือก *B. subtilis* ที่มีศักยภาพสูงสุดจากแบคทีเรีย Bacillus จำนวน 60 ไอโซเลทที่แยกได้จากธรรมชาติ เพื่อนำมาควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบศักยภาพเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 135 ไอโซเลท คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพสูงสุด เพื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในแปลงปลูกคะน้า พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงเพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *A. brassicicola* ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *B. subtilis* โดยอัตราการใช้ที่เหมาะสมคือ 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร พ่นเมื่อเริ่มพบการเกิดโรค

ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B subtilis* สายพันธุ์ใหม่ซึ่งคัดได้จากเศษวัสดุเกษตรมีศักยภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงปลูก และมีแนวโน้มที่สามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เจ้าหน้าที่ส่งเสริม และเกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า และพืชตระกูลกะหล่ำอื่นในแปลงปลูก
2. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการพัฒนา หรือต่อยอดกับงานวิจัยในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เพื่อขยายผลสู่เชิงพาณิชย์
3. เป็นทางเลือกในการนำไปใช้ในการผลิตพืชผักอินทรีย์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร. ศรีสุข พูลผลกุล เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆในการดำเนินการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ , อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. *ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. *ใน: เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช.* สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211.*ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ* .(บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ. เมือง จ. พิษณุโลก.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) : 4-12.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด.หน้า 93-94. *ใน: คู่มือโรคผัก*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวราภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. *ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 40 ม.เกษตรศาสตร์

อมรรัตน์ ทัศนกิจและมณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนูถีบจักร. หน้า 99-104.*ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 กรุงเทพฯ.

Baker, K.F. and R. J. Cook. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. W.H.Freeman, San Francisco. 433 p.

Environment Protection Agency. แหล่งที่มา: WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm., 28 พฤศจิกายน 2557

Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, J. Appl. Bacteriol. 76 (4) : 395-405.

Helene, C.; B.Wagner; F.Patrick and O. Marc.2011. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, Walloon Centre of Industrial Biolog , Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege , Belgium, Brazil. แหล่งที่มา: http://cdn.intechopen. com/pdfs-wm/21989.pdf, 7 เมษายน 2558

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon Sclerotium rolfsii. Phytopathology. 45:417-420.

Mugg, P; S.Seymour and S.Clark. A New Method for the Identification of Bacillus spp. And Related Species involved in Food Poisoning and Spoilage. แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document, 20 มกราคม 2558

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

Yun, C.; Fang Y. and G. Jian-hua. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus Subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediat Iing biofilm formation, J. Environmental microbiology. Mar 2013 ; 15(3): 848-864

Table 1 Five isolates of *Bacillus* spp. that could highly inhibited the mycelial growth of *Alternaria brassicicola*, a causal pathogen of chinese kale leaf spot, in laboratory.

***Bacillus* spp. isolates**	**Average of Inhibition zone (cm.)**
20W4	1.68
20W1	1.60
20W5	1.58
20W12	1.46
17G18	1.36
Control[1]	0.00

[1] compare to sterile water

Table 2 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 21 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* sp., compared to *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), in screen house.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	46.77
20W5	52.81
20W4	59.99
20W12	60.45
17G18	71.31
Control (-)	0.00
Control (+)	73.79

Table 3 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 3 5 and 7 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**		
	3 DAI[1/]	**5 DAI**[1/]	**7 DAI**[1/]
20W4	2.91 a	2.79 a	1.23 a
20W12	6.44 ba	10.38 cb	12.86 c
20W1	2.70 a	6.23 ba	8.72 cb
17G18	10.82 cb	15.24 dc	14.02 c
20W5	12.70 cb	14.60 dc	13.93 c
mancozeb 80% WP	1.40 a	1.90 a	2.42 ba
Control (-)	0.00 a	0.12 a	0.14 a
Control (+)	13.36 c	21.68 d	23.50 d
CV (%)	68.33	50.73	40.60

[1/] Days after inoculation

Table 4 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	41.26 c
20W5	43.55 c
17G18	43.88 c
20W4	48.52 c
20W12	61.70 d
mancozeb 80% WP	23.37 b
Control (-)	0.00 a
Control (+)	79.70 e
CV (%)	11.21

Table 5 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of *Bacillus subtilis* 20W1 , 20 30 40 50 and 60 grams/20 liters of water compared to mancozeb 80 % WP, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province, Thailand.

***Bacillus subtilis* 20W1 wettable powder (grams/20 liters of water)**	**Infected leaf area (%)**
20	7.79 b
30	5.76 b
40	1.88 a
50	0.91 a
60	5.85 b
mancozeb 40 grams	7.29 b
Control (-)	0.40 a
Control (+)	24.00 c
CV (%)	36.92

Figure 1 The colonies of *Bacillus subtilis* 20W1, on Potato Sucrose Agar medium

Figure 2 The wettable powder of *Bacillus subtilis* 20W1