1. แผนงานวิจัย: วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. ชื่อโครงการวิจัย: สำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

ชื่อกิจกรรม: สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

3. ชื่อการทดลอง: การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดิน (damping-off) และโรคลำต้นเน่า (stem rot) สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในมะเขือเทศ

Selection and Potential Test of *Bacillus* spp. for Controlling Damping-off Disease on Tomato Cause by *Pythium aphanidermatum*

4. คณะผู้ดำเนินงาน: หัวหน้าการทดลอง: บุษราคัม อุดมศักดิ์

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และสุรีย์พร บัวอาจ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

โรคเน่าคอดินและโรคลำต้นเน่า เป็นโรคที่มีความสำคัญของมะเขือเทศ สามารถเข้าทำลายมะเขือเทศตั้งแต่ระยะเพาะกล้าจนถึงระยะต้นโต ส่งผลทำให้เมล็ดพันธุ์ซึ่งมีราคาแพงเน่าเสียหายในขณะเพาะกล้า การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดมักก่อให้เกิดผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมและผลผลิต จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคต่อไป ดำเนินการทดลองที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่าง ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 โดยนำ *Bacillus* spp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์โรคพืช ของกลุ่มวิจัยโรคพืช จำนวน 180 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี dual culture technique ผลการทดสอบ พบว่า มี *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลทที่มีศักยภาพยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* สูงสุด ได้แก่ 19W32 19W33 19W12 20W18 และ18 G6 โดยมีค่าเฉลี่ยของความกว้างของ Inhibition zoneเท่ากับ 0.23 0.35 1.20 0.55 และ 0.24 ซม. ตามลำดับ ปี พ.ศ. 2563 จึงนำ *Bacillus* spp.ทั้ง 5 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินมะเขือเทศในโรงเรือน โดยวิธีราดดิน ผลการทดลองพบว่า ที่ 52 วันหลังการทดสอบ กรรมวิธีที่ราดด้วย *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินมะเขือเทศ โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ทุกไอโซเลท โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 36.65 39.02 44.89 64.37 และ 67.77 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อโดยไม่มีการราด *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ 97.27 โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยไอโซเลท 19W32 และ19W33 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยสารmetalaxyl 25%WP ทั้งนี้ไอโซเลท 19W32 มีประสิทธิภาพสูงสุด จากนั้นนำไอโซเลท 19W12 19W32 และ 19W33 มาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงไปทดสอบการควบคุมโรคลำต้นเน่ามะเขือเทศ โดยวิธีราดดิน ผลการทดลองพบว่า ที่ 21 วันหลังการทดสอบ กรรมวิธีที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ 19W33 19W32 และ19W12 มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่

กรมวิชาการเกษตร

ราดด้วยสารmetalaxyl โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 60.84 67.50 และ71.67 ตามลำดับ โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยสารmetalaxyl มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ74.17 โดยที่ทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการราด จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32 และ19W33 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเน่าคอดินโดยสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 62.32 และ59.88 และในโรคลำต้นเน่ามะเขือเทศสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.50 และ 39.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น ทั้ง 2 ไอโซเลท จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ โดยจะต้องมีการศึกษาวิจัยการนำไปใช้ตลอดจนพัฒนาสูตรที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่อไป

คำหลัก : บาซิลลัส ซับทิลิส มะเขือเทศ โรคเน่าคอดิน

รหัสการทดลอง: 03-05-59-01-02-00-09-62

Abstract: Damping – off and stem rot disease it is an important disease of tomatoes able to destroy tomatoes from the seedling stage to the beginning of growing. As a result, the expensive seed will rot and damage while planting. The use of chemical seed mixtures often causes residual effects in the environment and productivity. Therefore, the efficacy of Bacillus bacteria was studied to select a potent isolate to inhibit *P. aphanidermatum* for further development into disease control biological products. The experiments were conducted at the Plant Pathology Research group, Plant Protection Research and Development office between October 2018 and September 2020, using *Bacillus* spp. from the culture collection of Plant pathogens Research group. The 180 isolates of Bacillus species were tested for the inhibition of causative fungi on PDA culture medium by dual culture technique. The test results showed that *Bacillus* spp. 5 isolates with the highest inhibition potential of *P. aphanidermatum* fibers were 19W32, 19W33, 19W12, 20W18, and 18 G6, with mean width of Inhibition zone 0.23, 0.35, 1.20, 0.55 and 0.24 cm, respectively. In order of 2020, all 5 isolates of *Bacillus* spp. were used to test their efficacy in the control of tomato damping-off disease in greenhouses by pouring the soil. The results of the experiment showed that at 52 days after testing the 5 isolates of *Bacillus* spp. were effective in controlling tomato damping - off disease which can reduce the incidence of disease at every isolate. The mean incidence percentages were 36.65, 39.02, 44.89, 64.37 and 67.77, respectively while the Inoculated treatment without *Bacillus* spp. was 97.27. The disease incidence which treated with *Bacillus* spp. isolates 19W32 and 19W33 were not statistically different from the treatment that was treated with metalaxyl 25% WP. The isolate 19W32 is the most efficient. The isolates 19W12, 19W32 and 19W33 were then used to produce the bio-powder formulations to test for control of tomato stem rot disease by pouring the soil. The results were found at 21 days after the test, 19W33 19W32 and 19W12 bio-treated treatments were as effective as metalaxyl-treated treatment. The percentage of disease incidence was 74.17 where every isolates can reduce the occurrence of disease when compared with the process without pouring. From the results of the

กรมวิชาการเกษตร

experiment, it was concluded that *Bacillus* spp. Isolate 19W32 and 19W33 were most effective in controlling damping-off disease by reducing the incidence of disease by 62.32 and 59.88, and in tomato stem rot disease could reduce the incidence to 32.50 and 39.16 percent, respectively. Therefore, both isolates are suitable for the development of bioproducts. There must be studies, research, application, as well as developing suitable formulations for further enhancement in disease control.

Keyword:, *Bacillus* damping – off stem rot tomato

6. คำนำ

Pythium spp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ก่อให้เกิดโรคบนพืชได้มากกว่า 50 ชนิดทั้งพืชไร่ พืชสวน และวัชพืช โดยพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น มะเขือเทศ พริก พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง มะพร้าว มะละกอ หรือพืชตระกูลถั่วต่างๆ (พัฒนาและคณะ 2537) และยังเป็นปัญหาสำคัญในระบบการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ โดยพืชที่สำคัญที่มักเกิดปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อนี้ได้แก่ มะเขือเทศ ซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ นอกจากบริโภคภายในประเทศแล้วยังสามารถส่งขายไปยังต่างประเทศอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งในการผลิตมะเขือเทศในปัจจุบันนั้น เกษตรกรมักต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ที่มีราคาแพง มาทำการเพาะก่อนนำไปย้ายปลูกในแปลง แต่ที่ผ่านมาการเพาะเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมักเกิดปัญหาโรคเน่าคอดิน และโรคลำต้นเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ดังกล่าวมาโดยตลอด ซึ่งเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชตั้งแต่ระยะเพาะกล้าจนถึงระยะต้นโต โดยเชื้อสามารถทำลายตั้งแต่เมล็ดที่หว่านเพาะลงในดินทำให้เมล็ดเสีย เกิดอาการเน่าฝ่อ ไม่สามารถงอกออกมาเป็นต้นได้ หรือถ้าเมล็ดที่สามารถรอดพ้นจากการทำลายระยะแรกจนสามารถงอกขึ้นเป็นต้นได้เชื้อก็จะเข้าทำลายต่อ ทำให้ต้นที่เพิ่งเริ่มงอกตายตั้งแต่ยังอยู่ในดิน หรือต้นกล้าบางต้นอาจงอกขึ้นมาเหนือผิวดินได้ แต่กลุ่มนี้ก็อาจถูกเชื้อเข้าทำลายให้ตายต่อไปได้อีก สังเกตได้จากที่ต้นกล้าอ่อนงอกขึ้นมาระยะหนึ่งจะเกิดมีแผลที่บริเวณโคนต้น กล้าจะหักล้มพับลงเป็นหย่อมๆ ใบจะแห้งตายซึ่งคล้ายกับถูกน้ำร้อนลวก อาการในต้นกล้าแต่ละต้นจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กันอย่างรวดเร็ว จุดที่เชื้อเข้าทำลายไม่ว่าจะเป็นระยะก่อนหรือหลังจากงอกขึ้นมาเหนือดินแล้ว จะเกิดตรงบริเวณลำต้น (hypocotyl) ระหว่างใบเลี้ยง (cotyledon) และรากแก้ว (tap root) เรียกอาการนี้ว่า โรคเน่าคอดิน ซึ่งโดยปกติแล้วต้นอ่อนของพืชที่เพิ่งงอกจากเมล็ดจะมีผนังเซลล์บางทำให้เนื้อเยื่ออ่อนแอ ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อ นอกจากนั้นเมื่อเข้าไปสู่ภายในได้แล้ว เซลล์พวกนี้ก็จะถูกทำลายให้ตาย สลายตัวลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นแผลแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ทำให้ส่วนนั้นของต้นกล้าหักพับลงในที่สุด โดยโรคเน่าคอดินเป็นโรคที่มักเกิดในระยะเพาะกล้า เนื่องจากการปลูกพืชที่มีความหนาแน่น อับทึบ การระบายน้ำ และอากาศไม่ดี และในโรงเพาะชำที่มีอุณหภูมิสูง โดยต้นกล้าจะมีอาการเป็นแผลช้ำที่โคนต้นระดับดิน (โคนต้น) เนื้อเยื่อตรงบริเวณแผลจะเน่าและแห้ง ทำให้ต้นกล้าหักพับ และเหี่ยวตายไปในที่สุด การแพร่ระบาดส่วนมากเกิดจากสปอร์ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค ติดมากับเมล็ด ในดิน ในวัสดุปลูก หรือในน้ำ โดยพบได้ทุกฤดู และพบมากที่สุดคือช่วงปลายฤดูฝน โรคเน่าคอดินมีสาเหตุมาจากเชื้อราหลายชนิด แต่ที่สำคัญและพบเสมอเกิดจากเชื้อรากลุ่ม Pythium เช่น *P. periilum* (อมรรัตน์, 2552) *P. ultium P. debaryanum P. arrhenomanes* และ *P. aphanidermatum* (พัฒนาและคณะ 2537) เป็นต้น

Pythium เป็นราชั้นต่ำ ที่สปอร์มีผนังห่อหุ้มหนาที่เรียกว่า oospore ทำให้ทนทานต่อสภาพสิ่งแวดล้อมที่ผิดปกติได้ดีและนาน การเข้าทำลายพืชของเชื้อนี้สามารถเข้าทำลายได้ง่าย โดยโรคจะเกิดและระบาดได้ดีในดินที่ชื้นแฉะที่มีการระบายน้ำไม่ดี นอกจากจะทำลายพืชในระยะกล้าแล้วยังพบว่าเชื้อ *Pythium* sp. บางตัวสามารถก่อให้เกิดโรคเน่ากับบรรดาผลิตผลและผักสดต่างๆ อีกหลายชนิด ทั้งขณะยังอยู่ในแปลงปลูกและหลังเก็บเกี่ยวแล้วไม่ว่าจะเป็นขณะขนส่งหรือวางขายอยู่ตามตลาดทำให้เกิดความเสียหายต่อมาได้อีก โดยพบว่า *Pythium* spp. การป้องกันกำจัดเชื้อรานี้จึงทำได้ค่อนข้างยาก การใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรามักมีข้อจำกัดและให้ผลดีในระยะสั้น เนื่องจากเชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูในดิน เศษวัสดุ เศษซากพืช หรือในน้ำได้เป็นเวลานานและมีพืชอาศัยมากมาย ดังกล่าว อีกทั้งการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มนี้จะมีโอกาสสูงที่จะทำให้เชื้อราสร้างความต้าทานสารเคมีในอนาคต ในปัจจุบันจึงได้มีความพยายามที่จะนำการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีมาใช้ในการควบคุมเชื้อราเพื่อลดปัญหาดังกล่าวอย่างยั่งยืน เช่น วาริน และคณะ (2551) ได้ทำการสกัดสารต่อต้านเชื้อราจาก *Bacillus* spp.สายพันธุ์ B-NST-03 และ B-NST-02 มาทดสอบการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *P. aphanidermatum* ทั้งในห้องปฏิบัติการและโรงเรือน พบว่า เมล็ดมะเขือเทศที่แช่ในสารสกัดจากสายพันธุ์ B-NST-03 และ B-NST-02 มีจำนวนการงอกที่ 85.5 และ 82.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทดสอบในระดับโรงเรือนพบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดมะเขือเทศในสารสกัดจากทั้งสองสายพันธุ์มีการงอกของเมล็ดที่ 92.5 และ 92.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และเมทานอล มีจำนวนการงอกของเมล็ดที่ 28.0 และ 26.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (http://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/viewFile/108/92) นอกจากนี้ จักรพงษ์และคณะ (2554) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแยกแบคทีเรียจากรากพืช จากพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคมีการแตกแขนงและการเคลื่อนที่ของ cytoplasm ผิดปกติ ส่งผลให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก (http://digital_collect.lib.buu.ac.th/journal/Science/v16n1/22-31.pdf)

ปี พ.ศ. 2556 มานะและคณะ (2556) ได้รายงานว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ที่แยกได้จากรากพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides*, *Aphanomyces* sp. และ *P.aphanidermatum* ที่พบในระบบไฮโดรโพนิกส์ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* มีความสามารถในการผลิต IAA มีขนาดเอ็นโดสปอร์ค่อนข้างใหญ่ และไม่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดอื่น

P. Juma, *et al* (2015) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. subtilis* BS-01 และ *Trichoderma asperellum* TRC-900 ในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดินในผักตระกูลคะน้า (ethiopian kale) โดยการเคลือบเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วย *B. subtilis* BS-01 และ *T. asperellum* TRC-900 ผลการทดลอง พบว่า สามารถลดความสูญเสียจากสาเหตุโรคเน่าคอดินของเมล็ดพันธุ์ก่อนงอกได้ 11 -25.4% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการเคลือบเมล็ดซึ่งเป็นโรคถึง 64.8%. P. (Juma *et al*., 2015)

เนื่องจากเชื้อรานี้อาศัยอยู่ในดิน สามารถอยู่ข้ามฤดูในดิน เศษวัสดุ เศษซากพืช หรือในน้ำได้เป็นเวลานาน ทำให้การแพร่ระบาดได้ง่าย รวดเร็ว การกำจัดโรคนี้จึงทำได้ค่อนข้างยาก และถ้าพืชเป็นโรคแล้วจะทำให้พืชตายไม่

กรมวิชาการเกษตร

สามารถหายกลับมาปกติได้ ส่งผลให้เกิดความสูญเสีย 100 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สารเคมีมักได้ผลในระยะสั้นและมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อราสามารถพักตัวได้เป็นเวลานาน อีกทั้งสารเคมีชนิดคลุกเมล็ดที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดโรคนี้ยังมีจำหน่ายในท้องตลาดน้อย และการใช้สารเคมีไม่ถูกวิธี เช่นใช้มากเกินความจำเป็นอาจมีผลให้เชื้อโรคเกิดความต้านทานต่อสารเคมีในอนาคตได้ ทำให้โรคนี้จึงเป็นปัญหาต่อเกษตรกรในการแก้ปัญหาโรคนี้มาโดยตลอด ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งมีศักยภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดิน และโรคลำต้นเน่า ในมะเขือเทศ เพื่อลดความสูญเสียในการงอกของเมล็ดกล้า และการเกิดโรคในระยะต้นโต เพื่อการแก้ปัญหาอย่างยั่งยืนและเพื่อลดการใช้สารเคมี ในอนาคต ต่อไป

7.วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ จานเลี้ยงเชื้อ ฟาสก์ กระบอกตวง ไมโครปิเปต
2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องเขย่า เครื่องผสมสาร hot water bath
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น PSA PSB
4. โรงเรือนปลูกพืช
5. เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
6. เกาลีน
7. วัสดุและอุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ ดินอบ ตระกร้า กระถาง
8. สาร metalaxyl 25% WP
9. สารเคมี เช่น Carboxymethyl-cellulose sodium salt (CMC) และ $MgSO_4.7H_2O$
10. แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 180 ไอโซเลท

วิธีทดลอง

1. การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์โรคพืช (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทำการทดสอบ

ทดสอบโดยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955) โดยทำการทดสอบ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ *Bacillus* spp. 1 ไอโซเลท โดย 4 จุด ต่อจาน รวม 40 จุดต่อ 1 ไอโซเลท

<u>การดำเนินงาน</u>:

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA และเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PSA จนกระทั่งโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

1.2 จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร PDA ไว้แล้ว ใช้ Loop แตะเบาๆ ที่โคโลนีของ *Bacillus* spp.ที่จะนำมาทดสอบ ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ช.ม. นำมาขีดเป็นเส้นตรงขนานกับโคโลนีของเชื้อราทดสอบ 4 ด้าน โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 ซม. โดยใช้ *Bacillus* spp. 1 ไอโซเลทต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) ที่ใช้น้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทดสอบ

1.4 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส

<u>การบันทึกข้อมูล</u> :

บันทึกผลโดยวัด inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆที่เชื้อรา *P. aphanidermatum* ไม่เจริญเติบโต โดยวัดระยะห่างจากแนวเส้น *Bacillus* spp. ถึงขอบเชื้อรา *P. aphanidermatum* ทั้งสี่ด้าน นำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยของ inhibition zone โดยตรวจผลเมื่อกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อรา *P. aphanidermatum* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากนั้นคัดเลือกไอโซเลท 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือนต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเน่าคอดิน(damping-off) ในมะเขือเทศ ในโรงเรือนทดลอง

นำ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการไปทดสอบการควบคุมโรค ในโรงเรือนทดลอง

<u>การวางแผนการทดลอง</u> : วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 18G6
กรรมวิธีที่ 2 ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W12
กรรมวิธีที่ 3 ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32
กรรมวิธีที่ 4 ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W33
กรรมวิธีที่ 5 ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W18
กรรมวิธีที่ 6 ราดด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 7 ราดด้วยสาร metalaxyl 25% WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8 ราดด้วย cell suspension ของ *P. aphanidermatum* (Control +)

<u>การดำเนินงาน</u>:

2.1 การเตรียมดินผสม โดยอบดินเพื่อฆ่าเชื้ออื่นที่อาจจะติดมากับดินปลูกด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชม. 2 ครั้ง ใส่ลงในกระบะเพาะกล้า

2.2 เลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA ให้มีอายุ 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

2.3 ขูดเส้นใยเชื้อบนอาหารวุ้น ใส่ลงในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 30 มล.ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4 นำ cell suspension ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ความเข้นข้นประมาณ 10^5 spores/mlคลุกกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วอัตรา 50 มล.ต่อดิน 300 กรัม บ่มไว้ 24 ชั่วโมง

2.5 ราดดินด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ซึ่งผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยราดในอัตรา 100 มล.ต่อดิน 300 กรัม

2.6 เพาะเมล็ดมะเขือเทศ ลงในดินที่เตรียมไว้ 100 เมล็ดต่อกระบะ

2.7 การเตรียมกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control +) ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ราดดินด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทน cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทดสอบ สำหรับ control – เตรียมโดยเพาะเมล็ดมะเขือเทศลงในดินอบฆ่าเชื้อ

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นที่แสดงอาการเน่า คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด

2.8 นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์สถิติ

3. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. 3 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคลำต้นเน่า(stem rot) ในมะเขือเทศ ในโรงเรือนทดลอง

จากผลการทดลองที่ 2 นำ *Bacillus* spp. 3 ไอโซเลท ได้แก่ 19W12 19W32 และ19W33 มาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงโดยใช้เกาลีนเป็นสารพา นำมาทดสอบโดยวิธีการราดดิน โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยราดด้วยชีวภัณฑ์ตามกรรมวิธีที่กำหนด และมะเขือเทศทดลองใช้ในระยะกล้าที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCB 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ราดด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19 W12
กรรมวิธีที่ 2 ราดด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19 W32
กรรมวิธีที่ 3 ราดด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19 W33
กรรมวิธีที่ 4 ราดด้วยสาร metalaxyl 25% WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 ราดน้ำเปล่า (ใส่เชื้อในดิน) Control +
กรรมวิธีที่ 6 ราดน้ำเปล่า (ไม่ใส่เชื้อในดิน) Control -

เวลาและสถานที่: ตุลาคม 2561 ถึง กันายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. รวมทั้งสิ้นจำนวน 180 ไอโซเลท พบว่า มี 29 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของความ

กรมวิชาการเกษตร

กว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 0.08-1.20 ซม. โดย 5 ไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้แก่ 19W12 20W18 19W33 18G6 และ9W32 โดยมีค่าเฉลี่ยของความกว้างของ Inhibition zoneเท่ากับ 1.20 0.55 0.35 0.24 และ 0.23 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่1 และภาพที่ 1)

ในปี 2563 จะนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 19W12 20W18 19W33 18G6 และ9W32 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินมะเขือเทศ ในโรงเรือนต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเน่าคอดิน(damping-off) ในมะเขือเทศ ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลอง ที่ 52 วันหลังการทดสอบ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ (กรรมวิธีปลูกเชื้อ) เกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 97.27 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากรรมวิธีที่ราดด้วย *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ 18 G6 19W12 19W32 19W33 และ20W18 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินมะเขือเทศ โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ทุกไอโซเลท โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 67.77 44.89 36.65 .39.02 และ64.37 เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อโดยไม่มีการราดด้วย *Bacillus* spp.อย่างเดียว (กรรมวิธีที่ 8) โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยไอโซเลท 19W32 และ19W33 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยสารmetalaxyl 25%WP ทั้งนี้ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคเท่ากับ 62.32 และ 59.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 2 และภาพที่3)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคลำต้นเน่า (stem rot) ในมะเขือเทศ ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลอง ที่ 52 วันหลังการทดสอบ พบว่ากรรมวิธีที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ 19W12 19W32 และ19W33 มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ราดด้วยสารmetalaxyl 25% WP โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 71.67 67.50 60.84 และ74.17 ตามลำดับ โดยที่ทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการราดสาร(กรรมวิธีที่ 5) โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ 19W32 มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ สามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 39.16% (ตารางที่ 3 ภาพที่ 4 และภาพที่ 5)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของความกว้างของ Inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 29 ไอโซเลท

Bacillus spp. (ไอโซเลท)	ค่าเฉลี่ยของความกว้างของ Inhibition zone (ซม.)
19W12	1.20

20W18	0.55
19W33	0.35
18G6	0.24
9W32	0.23
14G14	0.21
18G15	0.18
20W31	0.18
14G4	0.16
11G16	0.15
14G19	0.15
29G9	0.15
13G5	0.14
14G8	0.14
14G12	0.14
14G22	0.14
14G17	0.13
18G17	0.13
14G9	0.12
14G24	0.12
14G27	0.12
18G28	0.11
18G4	0.11
14G18	0.10
14G6	0.10
7W14	0.10
3G17	0.10
RBS001	0.09
18G9	0.08

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการเกิดโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ 14 18 21 24 และ 52 วัน หลังการทดสอบ

กรรมวิธี/ *Bacillus* spp.	ค่าเฉลี่ยการเกิดโรค (%) 1/				
	14 DAI*	18 DAI	21 DAI	24 DAI	52 DAI
T1 18 G6	40.76d 2/	44.38d	47.38cd	50.10de	67.77d
T2 19 W12	17.75b	21.18bc	21.72b	22.62b	44.89c
T3 19 W32	19.82b	22.38bc	23.41b	28.40c	36.65b
T4 19 W33	28.23c	28.87c	33.67c	35.10d	39.02b
T5 20W18	42.22d	42.59d	52.13cd	52.20de	64.37cd
T6 ราดน้ำเปล่า (ไม่ใส่เชื้อในดิน) Control -	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
T7 metalaxyl 25% WP	5.25ab	5.93b	6.78a	7.29a	24.15b
T8** ราดน้ำเปล่า (ใส่เชื้อในดิน) Control +	12.71b	20.07bc	60.25d	68.98e	97.27e
CV (%)	93.65	84.24	79.66	79.70	65.98

* DAI =day after inoculation

1/ ค่าเฉลี่ยของ 4 ซ้ำ

2/ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรมวิชาการเกษตร

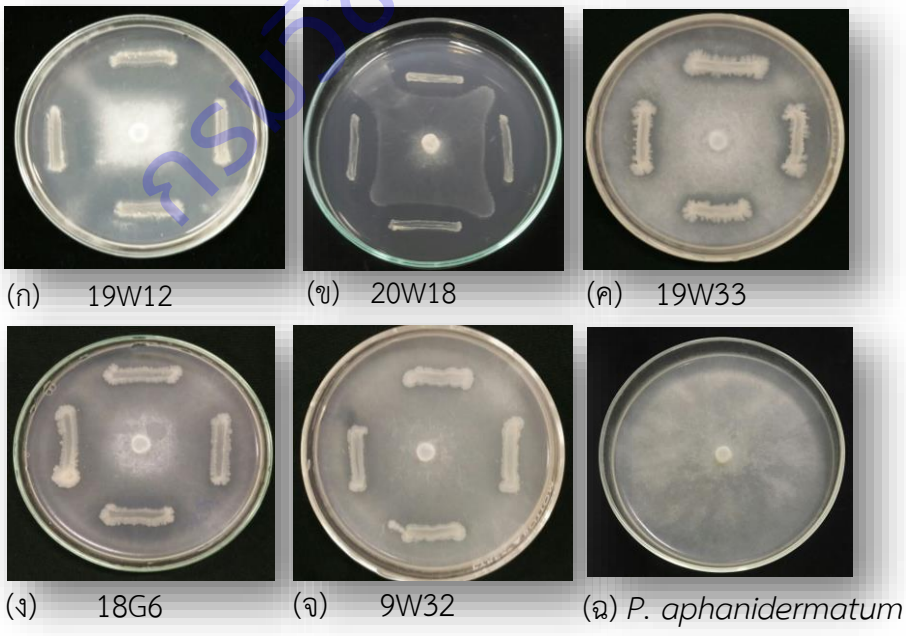
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลำต้นเน่า (stem rot)ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ 10 13 17 และ 21 วัน หลังการทดสอบ

กรรมวิธี/ *Bacillus* spp.	ค่าเฉลี่ยการเกิดโรค (%)[1/]			
	10DAI*	13DAI	17DAI	21DAI
T1 19 W12	43.34cb[2/]	55.83cb	62.50c	71.67b
T2 19 W32	52.50cb	55.84cb	58.34cb	67.50b
T3 19 W33	36.67b	48.33b	53.34cb	60.84b
T4 metalaxyl 25% WP	0.00a	0.83a	30.84b	74.17b
T5** ราดน้ำเปล่า (ใส่เชื้อในดิน) Control +	50.00c	64.17c	83.33cd	100.00c
T6 ราดน้ำเปล่า (ไม่ใส่เชื้อในดิน) Control -	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
CV (%)	82.25	76.11	61.63	52.10

* DAI =day after inoculation

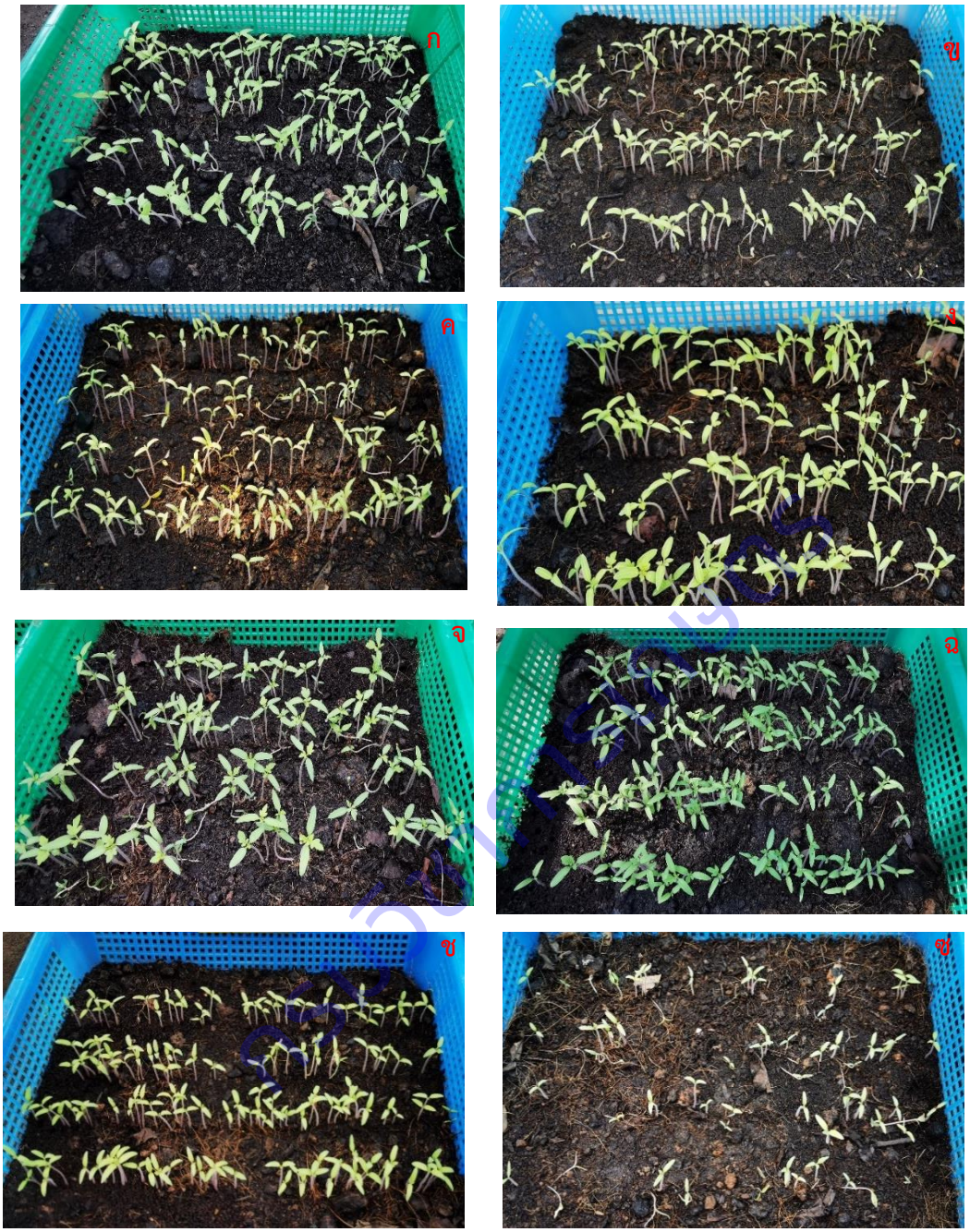
[1/] ค่าเฉลี่ยของ 4 ซ้ำ

[2/] ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 1 ภาพแสดงการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท (ก-จ) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (ฉ)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2 แสดงปริมาณการตายและการงอกของกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในดินติดเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ในกรรมวิธีต่างๆ ที่ 21 วันหลังทดสอบ

ก. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 18G6

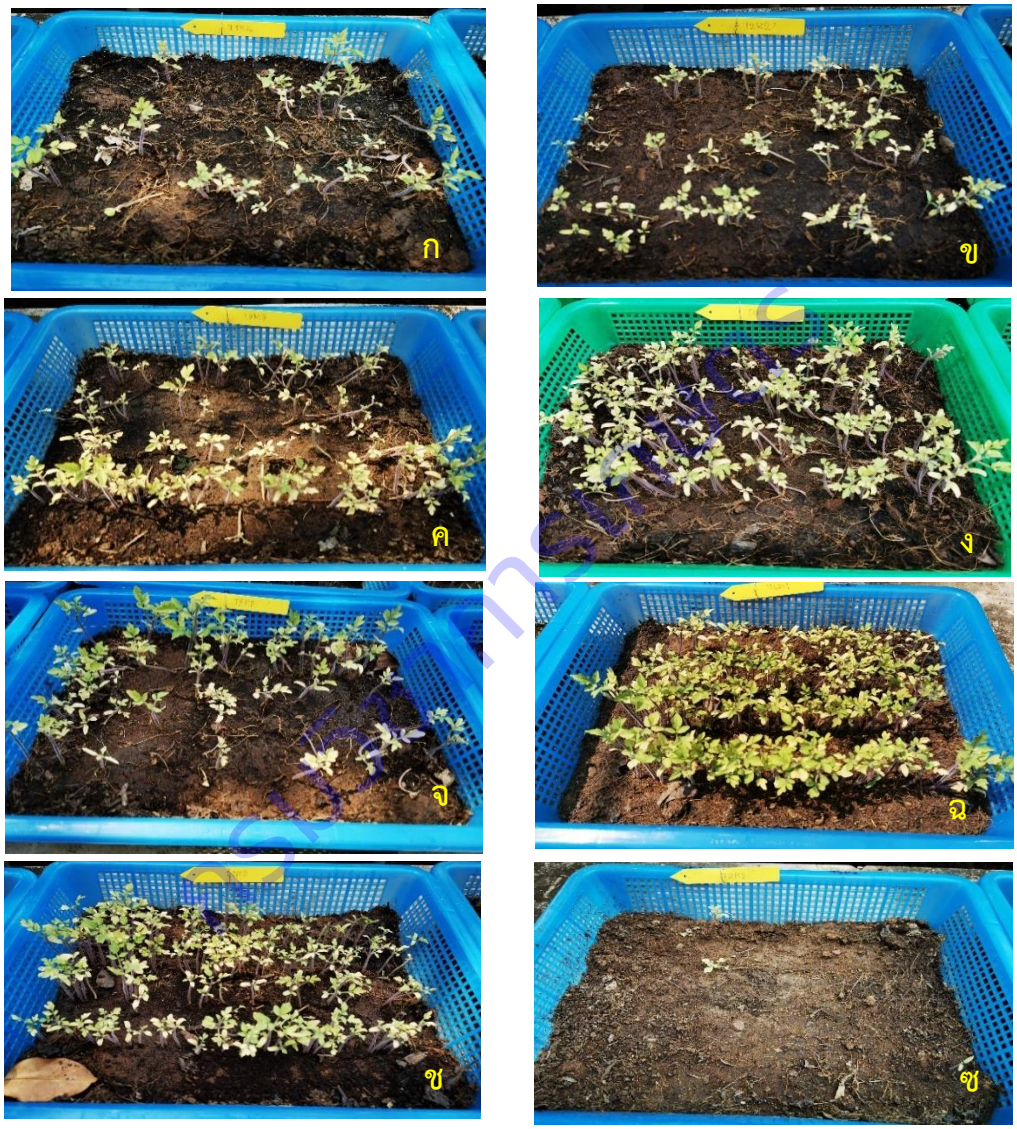
ข. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W12

ค. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32

ง. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W33

จ. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W18

ฉ. ราดด้วยน้ำเปล่า (ไม่ปลูกเชื้อ)



ภาพที่ 3 แสดงปริมาณการตายและการงอกของกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในดินติดเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ในกรรมวิธีต่างๆ ที่ 52 วันหลังทดสอบ

ก. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 18G6

ข. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W12

ค. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32

ง. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W33

จ. ราดด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W18

ฉ. ราดด้วยน้ำเปล่า (ไม่ปลูกเชื้อ)

ช. ราดด้วย metalaxyl 25%WP

ซ. ปลูกเชื้อด้วย *Pythium aphanidermatum* อย่างเดียว (control +)

ภาพที่ 4 แสดงการเกิดโรคลำต้นเน่าของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในดินติดเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ในกรรมวิธีต่างๆ ที่ 21 วันหลังทดสอบ

ก. ราดด้วย ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W12

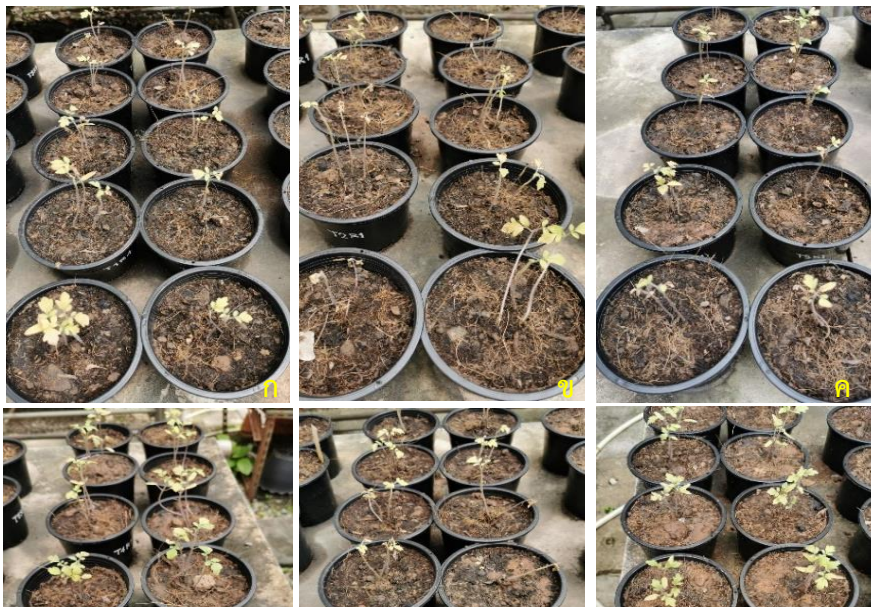
ข. ราดด้วย ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32

ค. ราดด้วย ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W33

ง. ราดด้วย metalaxyl 25%WP

จ. ราดด้วยน้ำเปล่า (ปลูกเชื้อ *Pythium aphanidermatum*) ; control +

ฉ. ราดด้วยน้ำเปล่า (ไม่ปลูกเชื้อ) ; control -



9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท 19W32 และ19W33 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเน่าคอดินโดยสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 62.32 และ59.88 และในโรคลำต้นเน่ามะเขือเทศสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.50 และ 39.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น ทั้ง 2 ไอโซเลท จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ แต่ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาวิจัยวิธีการนำไปใช้ เช่น เพิ่มจำนวนการราดดิน ซึ่งในการทดลองนี้ราดดินเพียง 1 ครั้ง หรือเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย Bacillus ที่ใส่ลงดินให้มีปริมาณหรืออัตาสูงขึ้น หรือกรณีโรคลำต้นเน่า อาจจำต้องใช้วิธีการคลุกดินก่อนปลูกมะเขือเทศร่วมด้วย ตลอดจนพัฒนาสูตรที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่อไป

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำไปเป็นโมเดลควบคุมโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในการเพาะกล้าในพืชอื่นๆ ที่ต้องทำการเพาะกล้าในโรงเรือนก่อนย้ายปลูกได้ เนื่องจากปัญหาโรคนี้มักมีการพัฒนาโรคและปัจจัยในการก่อให้เกิดโรคไม่ต่างกัน

2. นำไปต่อยอดพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมโรครากเน่า หรือโรคลำต้นเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในระบบการปฏิบัติทางการเกษตที่ดีและเหมาะสม (GAP) หรือระบบการปลูกพืชแบบอินทรีย์

กรมวิชาการเกษตร

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2554. การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ttp://digital_collect.lib.buu.ac.th/journal/Science/v16n1/22-31.pdf (14 กุมภาพันธ์ 2560)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.2549. การปลูกมะเขือเทศ.(ระบบออนไลน์).แหล่งข้อมูล: http://www.ku.ac.th/e-magazine/nov49/agri/lycopersicon.htm (11 กุมภาพันธ์ 2560)

มานะ กาญจนมณีเสถียร อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และวานิด รอดเนียม.2556. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์.(ระบบออนไลน์).แหล่งข้อมูล: http://doi.nrct.go.th/ListDoi/.../e9463a22904444282d89110ed735b9ff?... (14 กุมภาพันธ์ 2560)

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537.ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, 285 หน้า

วาริน อินทนา ประคอง เย็นจิตต์ ทักษิณ สุวรรณโน ศุภลักษณ์ เศรษฐสกุลชัย มนูญ สุวรรโณ และ จิระเดช แจ่มสว่าง.2551. ประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราจาก *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum*.(ระบบออนไลน์).แหล่งข้อมูล: *http://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/viewFile/108/92* (14 กุมภาพันธ์ 2560)

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และพีระวรรณ วัฒนวิภาส. 2552. สำรวจ รวบรวม และจำแนกรา Pythium สาเหตุโรคพืช. (ระบบออนไลน์).แหล่งข้อมูล: http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=1743 (9 กุมภาพันธ์ 2560)

Juma,P., Murungi,L and Losenge,T.2015. Biological Control of Pythium aphanidermatum causing dampling off disease in Ethiopian Kales. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://journals.jkuat.ac.ke/index.php/jscp/article/download/1235/1013

กรมวิชาการเกษตร