การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

Controlling Canker Disease on Pummelo by Antagonistic Microorganism

นลินี ศิวากรณ์ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ วสันต์ ผ่องสมบูรณ์

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคแคงเกอร์ของส้มโอมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 35 ไอโซเลทต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอด้วยวิธี antagonistic reaction โดยเปรียบเทียบกับสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์และ Kanker-X พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 12 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท5102แสดงปฏิกิริยายับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอให้บริเวณวงใสขนาดรัศมีกว้าง 8.5 มม. Kanker-X ให้วงใสกว้าง 7.5 มม. ส่วนสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* นอกจากนี้สารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท5102บนอาหารPDBสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ และจากการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 ที่ได้คัดเลือกไปฉีดพ่นบนต้นส้มโอในเรือนทดลอง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102 สามารถควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ในสภาพเรือนทดลอง โดยแสดงจำนวนแผลจุดเฉลี่ย 21.86 จุดต่อใบ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบมีจำนวนแผลจุดเฉลี่ย 79.19 จุดต่อใบ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวทำให้พบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชโดยพบว่าจำนวนใบยอด ขนาดของใบ ความยาวของลำต้นส่วนยอดมีการขยายตัวใหญ่กว่าลำต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการจำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rDNA Sequence analysis พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain WD20 จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง โดยทดสอบบนต้นถั่วขียวและต้นส้มโอ ผลการทดลองพบว่าต้นถั่วเขียวที่ได้รับการฉีดพ่นเชื้อ *B. subtilis* WD20 มีจำนวนและน้ำหนักของฝักและเมล็ดมากกว่าต้นที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* strain ZJUT zy และต้นที่ฉีดพ่นด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในส้มโอพบว่าความยาวของลำต้นส่วนยอด จำนวนใบ และขนาดของใบ มีจำนวนมากและ

รหัสทะเบียนวิจัย 01-10-49-02-03-02-01-49

ขนาดใหญ่กว่าต้นที่ฉีดพ่นด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี พบว่าเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อPDB สามารถผลิตฮอร์โมน IAA 0.15 มก./ลิตร และ GA_3 5.2 มก. /ลิตร และจากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดผง เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* WD20 ที่เป็นเชื้อสดซึ่งเลี้ยงจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงกับสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์และน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยทดสอบบนยอดของส้มโอที่แตกใหม่ขนาดความยาว 1.5 นิ้ว และทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ด้วยการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงแกอร์ (*X. campestris* pv. *citri*) อัตราความเข้มข้นของเชื้อ 1.179 X 10^{11} โคโลนี/มล. ในแปลงปลูกส้มโอ อ.อุทัย จ.พระนครศรีอยุธยา ผลการทดลองพบว่า ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD20 สามารถยับยั้งและลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำที่สุดเท่ากับ 25.61% ซึ่งไม่แตกต่างกับการฉีดพ่นในรูปเชื้อสดที่เลี้ยงจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงให้เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 26.62% แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ให้เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 51.74% และกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำให้เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 54.02% นอกจากนี้การฉีดพ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD20 ทั้งในรูปผงเชื้อและเชื้อสดทำให้ต้นส้มโอมีการเจริญเติบโตดี ความยาวลำต้นส่วนยอดขยายตัวยาวกว่าปกติ ใบมีขนาดใหญ่ ต้นมีความสมบูรณ์และแข็งแรง

คำนำ

โรคแคงเกอร์ของส้มโอมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (synonym *X. campestris* pv. *citri*) เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินตั้งแต่ ใบ กิ่งก้าน และผล โดยมากมักพบระบาดในฤดูฝน จากการศึกษาโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยจัดเป็นพวก Canker A (Uematsu และคณะ, 1993) ส่วนการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์นั้นยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพโดยตรงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารประกอบคอปเปอร์ฉีดพ่นต่อเนื่องเป็นประจำ ทำให้ระบบนิเวศวิทยาถูกทำลายและมีสารประกอบคอปเปอร์ตกค้างในผลิตผลได้

ปัจจุบันนี้ประเทศที่มีความก้าวหน้าทางวิชาการทั่วโลกเริ่มตระหนักดีว่าการปฏิวัติเขียว (green revolution) ที่มุ่งใช้เทคโนโลยีทันสมัยเพื่อเพิ่มพูนผลผลิตทางการเกษตรเพื่อให้เพียงพอต่อประชากรโลก ซึ่งนับวันจะมีอัตราเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มิใช่หนทางแก้ไขปัญหาในระยะยาว กลับมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมและก่อให้เกิดปัญหาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นผู้เกี่ยวข้องในทุกวิชาการทั่วโลกต่างหันมาให้ความสนใจต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เร่งการวิจัยและพัฒนาการปฏิบัติให้เป็นไปในลักษณะกลับคืนสู่ธรรมชาติ การศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีวภาพ (ชีววิธี) เริ่มต้นเมื่อกลางปี ค.ศ. 1920 เมื่อมีการค้นพบว่าปัญหาโรคพืชสามารถแก้ไขหรือทำให้ความรุนแรงลดลงได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์ใส่ลง

ไปในดินที่ปลูกพืช โดยมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยอาศัยธรรมชาติจัดการกันเองหรือที่เรียกว่าโดยวิธีธรรมชาติ(สมคิด,2540) การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีก็เป็นกรรมวิธีหนึ่งในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน เพื่อการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพป้องกันการดื้อยาของสารเคมีรวมทั้งพิษตกค้างในอาหาร เพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าไปครอบครองพื้นที่ก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าทำลาย เพื่อกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งการปฏิบัติดังกล่าวจะลดการใช้สารเคมีได้ และลดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงได้ ซึ่งวิธีดังกล่าวควรได้ศึกษาเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในการจัดการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ โดยการดัดแปลงหรือพัฒนาให้มีความเหมาะสมต่อสภาพการผลิตส้มโอ อันจะเป็นแนวทางให้เกษตรกรสามารถเลือกและเพิ่มมูลค่าของผลผลิตที่ปราศจากพิษตกค้าง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง กระบะและดินปลูก
2. แปลงปลูกส้มโอที่ อ.อุทัย จ.พระนครศรีอยุธยา
3. ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain WD20
4. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain WD20
5. สารจับใบ และสารเคมีอมิสตา
6. กล้องจุลทรรศน์, เครื่องแก้ว, ตาชั่ง, เครื่องเขย่า
7. ผงทัลคัม, เมทิลเซลลูโล, แมกนีเซียมซัลเฟต
8. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA, PDA, NA, PSB, PDB และ NB

วิธีการ

1. การแยกเชื้อ เก็บรักษาและการเตรียมเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

1.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรค โดยเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของส้มโอจากแหล่งปลูกของเกษตรกรใน จ.นครปฐม และจ.ชัยนาท นำใบ กิ่ง ก้าน ผล ของส้มโอที่เป็นโรคแคงเกอร์มาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* บนอาหารPotato Semi-synthetic Agar Medium (PSA) ด้วยวิธี streak plate โดยนำส้มโอที่เป็นโรคแคงเกอร์มาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วใช้กรรไกรที่ลนไฟฆ่าเชื้อตัดจุดแผลแคงเกอร์ใส่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วบดด้วยโกร่งบดยาจนละเอียด นำมาทำ cross streak plate บนจานอาหาร PSA และบ่มไว้เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอมาเลี้ยงในหลอดอาหาร PSA

1.2 การเก็บรักษา นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่แยกได้มาเลี้ยงในหลอดอาหารPSA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30^{0}ซ เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าอาหารจึงเทพาราฟินออยล์ปิดทับ นำไป

เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 ^{0}ซ เพื่อหยุดการแบ่งตัวของเชื้อป้องกันการสูญเสียประสิทธิภาพของเชื้อและเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดสอบโรคแคงเกอร์ของส้มโอต่อไป

1.3 การเตรียมเชื้อ นำเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้มาเลี้ยงในหลอดอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ10 มล.ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำสารละลายเชื้อไปปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วดูดสารละลายเชื้อ 2 มล.ใส่บนจานอาหารPSA เอียงจานอาหารให้สารละลายของเชื้อเต็มผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปาดผิวหน้าของเชื้อที่เลี้ยงไว้ นำไปใส่ในน้ำอัตราเชื้อ 1 จานอาหารต่อน้ำ 500 มล. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เพื่อเตรียมปลูกเชื้อต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแคงเกอร์

ตัดใบส้มโอใต้น้ำแล้วนำสำลีพันรอบก้านใบเป็นวิธีตัดชำใบ(detached leaf technique) จากนั้นนำมาใส่ในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษฟางรองให้ความชื้น และนำมาวางใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ทำการปลูกเชื้อบนใบส้มโอตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

2.1 วิธีทำแผลด้วยเข็มที่มีเชื้อสาเหตุ โดยนำเข็มที่อบฆ่าเชื้อแล้วไปจุ่มลงในสารละลายของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3 แล้วนำไปเจาะทำแผลบนใบส้มโอ (a pin prick inoculation method)

2.2 วิธีฉีดพ่น โดยนำสารละลายของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เตรียมในข้อ 1.3 มาฉีดพ่นบนใบส้มโอ โดยทำการทดลองทั้งวิธีทำแผลและไม่ทำแผลก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุ จากนั้นตรวจลักษณะอาการของแผลจุดโดยมีกรรมวิธีการฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

3. การแยกเชื้อ และการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

3.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ นำตัวอย่างใบของส้มโอ มะนาว ยอ ทานตะวัน และมันสำปะหลังมาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบ โดยนำใบมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วตัดใบเป็นชิ้นเล็กขนาด 2 มม.จำนวน 15-20 ชิ้น/ต้น นำใส่โกร่งที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ม.ล.แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาหยดลงบนจานอาหารPDAจำนวน 1 ม.ล.ต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ ซ้ำละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวอาหาร จากนั้นทิ้งไว้ 1-5 วันที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ลักษณะโคโลนีที่แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อต่างๆ ที่ขึ้นมาปะปนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak และเก็บรักษาบนอาหารPSA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30^{0}ซ เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าอาหารจึงเทพาราฟินออยล์ปิดทับ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 ^{0}ซ

3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในหลอดอาหารPSA และขยายเพิ่มปริมาณบนจานอาหารPSAด้วยวิธี streak plate ให้เต็มผิวหน้า

อาหาร เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าอาหารเป็นเวลา 2 วัน จึงใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปาดผิวหน้าของเชื้อที่เลี้ยงไว้ นำไปใส่ในน้ำอัตราเชื้อ 1 จานอาหารต่อน้ำ 100 มล. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องmagnetic stirrer เพื่อเตรียมสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

4. การศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี antagonistic reaction ในห้องปฏิบัติการ

4.1 การเตรียมอาหารทดสอบ ด้วยวิธี A double-layer plate technique โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ที่หลอมละลายแล้วเทใส่จานอาหารเป็นชั้นบาง ๆ ซึ่งเป็นอาหารชั้นล่าง (basal layer) จากนั้นนำหลอดอาหารPSAที่เลี้ยงเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*ใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มล. แล้วนำไปปั่นเพื่อให้สารละลายของเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอนำไปเทลงในขวดอาหารPSA ที่หลอมละลายอัตรา 2:10 โดยปริมาตร แล้วเททับอาหารชั้นล่างที่เตรียมไว้ เป็นอาหารที่ผสมเชื้อในชั้นบน (upper layer) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 ศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทๆที่เลี้ยงในหลอดอาหารPSAเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงในหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทหลอดละ 10 มล. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2-3 นาที นำสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 2 µl มาหยดบนกระดาษทดสอบ(paper disc) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. และนำกระดาษทดสอบที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปวางบนจานอาหารทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 โดยวางให้ห่างจากขอบจานอาหาร 2 ซม. จานละ 4 จุด เปรียบเทียบกับกรรมวิธีสารเคมีคอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ 62% WP. อัตรา 3,000 ppm. และสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต + ออกซีเททราไซคลินไฮโดรคลอร์ไรด์ (Kanker-X) อัตรา 100 ppm. ตามอัตราที่ระบุในฉลากยา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-30^0 ซ. เป็นเวลา 1-7 วัน

4.3 การทดสอบปฏิกิริยาของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PSB และPDB เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียและนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบตามกรรมวิธีในข้อ 4.2

4.4 การบันทึกข้อมูล ทำการตรวจปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ สารเคมี สารปฏิชีวนะและสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวัดรัศมีวงใสที่ล้อมรอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนต้นส้มโอในเรือนทดลอง

5.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 2 กรรมวิธี ๆ ละ 7 ต้น ๆละ 4 ยอด ประกอบด้วย กรรมวิธีการฉีดพ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกแล้วในห้องปฏิบัติการ และกรรมวิธีเปรียบเทียบโดยฉีดพ่นด้วยน้ำ

5.2 การปฏิบัติการทดลอง นำสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 ผสมสารจับใบอัตรา 1 หยดต่อน้ำ 20 ซีซี.มาฉีดพ่นบนยอดอ่อนของส้มโอที่แตกยอดใหม่ที่มีขนาดยาว 1.5 ซม.โดยฉีดพ่นสัปดาห์ละ 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3-4 วัน หลังจากนั้น l สัปดาห์จึงฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่มีความเข้มข้นอัตรา 3.93 X 10^{8} cfu/ml. ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3 โดยผสมสารจับใบอัตรา 1 หยดต่อน้ำ 20 ซีซี. ต่อมาจึงฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อไปจนส้มโอแสดงอาการเกิดโรคแคงเกอร์

5.3 การบันทึกข้อมูล ตรวจนับจำนวนแผลจุดต่อใบและหาค่าเฉลี่ยจำนวนของแผลจุดต่อใบในแต่ละยอด และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

6. การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท ในการควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ไปทำการจำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rDNA ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อทราบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนที่จะนำไปทดสอบแพร่ขยายในบรรยากาศ

7. การทดสอบทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD 20 ต่อการเจริญเติบโตบนต้นถั่วเขียวและต้นส้มโอ (Bioassay Test)

7.1 การทดสอบบนต้นถั่วเขียว ทำการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ*B. subtilis* WD 20 กับ *B. subtilis* สายพันธุ์อื่นต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียว โดยวางแผนการทดลองแบบCRD มี 3 กรรมวิธี ๆละ 10 ซ้ำ(กระถาง)ๆ ละ 4 ต้นดังนี้

1. ฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2
2. ฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อ *B. subtilis* ZJUT zy ที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2
3. ฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

ฉีดพ่นแต่ละกรรมวิธีสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตั้งแต่ระยะต้นอ่อนจนถึงระยะเก็บเกี่ยว หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนฝักและน้ำหนักฝัก จำนวนเมล็ดและน้ำหนักเมล็ด

7.2 การทดสอบบนต้นส้มโอ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 2 กรรมวิธี ๆละ 7 ต้น ๆละ 4 ยอดดังนี้

1. ฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2
2. ฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

ฉีดพ่นสัปดาห์ละ 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3-4 วัน โดยเริ่มฉีดพ่นเมื่อยอดเริ่มแตกใหม่มีขนาดยาว 1.5 ซม. และฉีดพ่นต่อไปจนกระทั่งยอดนั้นๆโตเต็มที่ บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวของก้าน จำนวนใบ และขนาดของใบ

8. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปเชื้อสดและผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของส้มโอในแปลงปลูกอำเภออุทัย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

8.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 โดยใช้เข็มเขี่ยหัวกลมเขี่ยเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เลี้ยงในหลอดอาหาร PSA จำนวน 1 loop มาใส่ในอาหารเหลว PSBที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 145-150 รอบ/นาทีเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นจึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและเมททิลเซลลูโลสลงไปในขวดเลี้ยงเชื้อ กวนให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมดค่อย ๆเทใส่ลงในผงทัลคัมที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันและนำมาเทใส่ถาดที่วางรองด้วยอลูมินั่มฟอยล์เกลี่ยให้เรียบและผึ่งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

8.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 บนต้นส้มโอ

8.2.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบRCB มี 4 กรรมวิธี ๆละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ยอด ดังนี้

1. ฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2
2. ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 โดยใช้อัตรา 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
3. ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ อัตรา 4 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
4. ฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

8.2.2 การปฏิบัติการทดลอง นำสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ3.2 มาฉีดพ่นบนยอดอ่อนของส้มโอที่แตกยอดใหม่ขนาดยาว 1.5 ซม. ทำการฉีดพ่นสัปดาห์ละ 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3-4 วัน หลังจากนั้น l สัปดาห์จึงฉีดพ่นสารละลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่เตรียมไว้ในข้อ1.3 ด้วยปริมาณเชื้อ 1.179 X 10^{11} cfu/ml โดยผสมสารจับใบอัตรา 1 หยด/น้ำ 20 ซีซี ต่อจากนั้นจึงฉีดพ่นด้วยสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จนยอดส้มโอแสดงอาการเกิดโรค

8.2.3 การบันทึกข้อมูล ตรวจและประเมินให้คะแนนความรุนแรงระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนใบในแต่ละยอดตามคู่มือการประเมินระดับคะแนนของ James (1971) ดังนี้

0 = ไม่พบเกิดโรคแคงเกอร์

1 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 1-10 %ของพื้นที่ใบ

2 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 11-25 %ของพื้นที่ใบญ

3 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 26-50 %ของพื้นที่ใบ

4 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 51-75 %ของพื้นที่ใบ

5 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 76-100 %ของพื้นที่ใบ

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคตามวิธีของ Horsfall and Heuberger (1942) ดังนี้

$$\text{ความรุนแรงของการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวม (ระดับ x จำนวนใบของแต่ละระดับ)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด x ระดับสูงสุด}} \times 100$$

และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

9. วิเคราะห์หาชนิดของฮอร์โมนที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD 20 โดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD 20 จากหลอดอาหารPSA จำนวน 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลวPDB และ PSB ที่บรรจุในขวดทดลอง แล้วนำมาเลี้ยงภายใต้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ต่อมานำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เพื่อให้เชื้อที่แขวนลอยในอาหารตกตะกอน เทส่วนที่ใสใส่ขวดทดลองหุ้มปิดฟอยล์เพื่อกันไม่ให้สารที่ได้สลายตัวเมื่อถูกแสงหรือความร้อน จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาชนิดของสารที่สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารPDB และ PSB ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ

ระยะเวลาและสถานที่

- มกราคม 2550 – กันยายน 2553
- ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงส้มโอทดสอบโรคแคงเกอร์อ.อุทัย จ.พระนครศรีอยุธยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อ เก็บรักษาและการเตรียมเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอบนอาหารPSA เป็นโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน กลมนูนเป็นเมือก และให้ปฏิกิริยาแกรมลบเมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH 3%

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ วิธีการทำแผลด้วยเข็มที่มีเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคแคงเกอร์บนจุดที่ทำแผลอย่างรวดเร็วภายใน 4 วัน ส่วนการปลูกเชื้อบนใบโดยการฉีดพ่นเชื้อสามารถทำให้ใบเกิดแผลจุดหลังจากฉีดพ่นเชื้อ 12 วัน ลักษณะอาการในระยะแรกบริเวณที่ทำแผลปลูกเชื้อจะเป็นขุยฟูนูนสีขาวครีม ต่อมาแผลจุดพัฒนาเป็นจุดสะเก็ดสีน้ำตาลทั้งด้านหน้าและด้านหลังใบ

3. การแยกเชื้อ การเก็บรักษาและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆทั้งหมด 35 ไอโซเลทและเก็บรักษาเชื้อที่ได้ไว้ในหลอดอาหารที่ปิดทับด้วยพาราฟินออยล์โดยนำเชื้อทั้งหมดเข้าเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 15° ซ.

4. การศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี antagonistic reaction ในห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 35 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 7 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตโดยให้บริเวณวงใสรัศมีกว้างที่สุดขนาด 8.5 มม. Kanker-X ให้วงใสกว้าง 7.5 มม. และคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ (ตารางที่ 1) และจากการศึกษาปฏิกิริยาของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 พบว่าสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท5102ที่เลี้ยงในอาหารPDB สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดบริเวณวงใสรัศมีกว้าง 7 มม. ส่วนสารสกัดจากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารPSB ไม่ให้วงใสบนอาหารที่ทดสอบ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite)ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* WD 20 เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอและถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ โดยเชื้อสามารถผลิตได้บนอาหารPDB

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนต้นส้มโอในเรือนทดลอง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ โดยกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102 เกิดแผลจุดเฉลี่ย 21.86 จุด/ใบ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเกิดแผลจุดเฉลี่ย 79.19 จุด/ใบ (ตารางที่ 2)

6. การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จากการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102, 5702, 5206, 5702 และ5703 ด้วยวิธี16S rDNA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102 เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ไอโซเลท 5205 และ5206 เป็นเชื้อ *Bacillus* sp. DF 48 และไอโซเลท5702 และ 5703 เป็นเชื้อ *Burkholderia gladioli* จากการจำแนกชนิดของเชื้อพบว่าเชื้อจุลินทรีย์

ปฏิปักษ์ที่นำไปวิเคราะห์ชนิดทั้งหมดนั้น เชื้อ *Bacillus subtilis* WD20 เป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยที่สุดในการนำมาขยายผลเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช

7. การทดสอบทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตบนต้นถั่วเขียวและต้นส้มโอ (Bioassay Test)

7.1 การทดสอบบนต้นถั่วเขียว พบว่า ต้นถั่วเขียวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักฝัก จำนวนเมล็ดและน้ำหนักเมล็ดมากกว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* ZJUT zy และกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ให้จำนวนฝัก/ต้น 9.30 ฝัก น้ำหนักฝัก 4.50 กรัม จำนวนเมล็ด 58.00 เมล็ด น้ำหนักเมล็ด 3.32 กรัม ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ*B. subtilis* ZJUT zy ให้จำนวนฝัก/ต้น 5.70 ฝัก น้ำหนักฝัก 2.51 กรัม จำนวนเมล็ด 31.80 เมล็ดและน้ำหนักเมล็ด 1.87 กรัม ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบให้จำนวนฝัก/ต้น 6.60 ฝัก น้ำหนักฝัก 3.16 กรัม จำนวนเมล็ด 40.40 เมล็ด และน้ำหนักเมล็ด 2.34 กรัม (ตารางที่ 3)

7.2 การทดสอบบนต้นส้มโอ พบว่ายอดของส้มโอที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ให้ค่าเฉลี่ยของความยาวของลำต้นส่วนยอด จำนวนใบ ขนาดของใบทั้งด้านยาวและด้านกว้างมากกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ โดยการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ให้ความยาวของลำต้นส่วนยอด 19.93 ซม. จำนวนใบ 9.80 ใบ ขนาดของใบด้านกว้าง 5.62 ซม. ด้านยาว 8.44 ซม. ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำให้ความยาวของลำต้นส่วนยอด 15.80 ซม. จำนวนใบ 8.50 ซม. ขนาดของใบด้านกว้าง 4.49 ซม. และด้านยาว 7.06 ซม.(ตารางที่ 4)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* WD 20 ทำให้พืชทดสอบถั่วเขียวและส้มโอเจริญเติบโตดีกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

8. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปเชื้อสดและผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของส้มโอในแปลงปลูกอำเภออุทัย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปเชื้อสดและผลิตภัณฑ์ในรูปผงเชื้อสามารถลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ 27.40% และ 28.41 %ตามลำดับ โดยเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 ในรูปเชื้อสดแสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 26.62 % และผลิตภัณฑ์ในรูปผงเชื้อแสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 25.61% ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) แสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 54.02 % และสารเคมีคอปเปอร์ออกซีคลอไรด์แสดงความรุนแรงของการเกิดโรค 51.74 %(ตารางที่ 5)

9. วิเคราะห์หาชนิดของฮอร์โมนที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD 20 ผลการวิเคราะห์พบว่าอาหาร PDB ที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* WD 20 มีฮอร์โมน IAAปริมาณ

0.15 มก./ลิตร และมี GA_3ปริมาณ 5.2 มก./ลิตร ส่วนอาหารPSB ที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ตรวจไม่พบสารใดๆ เช่นเดียวกับอาหารPDB และPSB ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อก็ตรวจไม่พบสารใดๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite)ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* WD 20 สามารถสร้างฮอร์โมนได้ โดยเชื้อสามารถสร้างฮอร์โมนได้บนอาหารPDBเช่นเดียวกับการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอและถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ โดยเชื้อสามารถสร้างได้บนอาหารPDB

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

โรคแคงเกอร์ของส้มโอมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน กลมนูน เป็นเมือกบนอาหารPSA และให้ปฏิกิริยาแกรมลบเมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH 3% การปลูกเชื้อสาเหตุบนใบโดยการฉีดพ่นเชื้อสามารถทำให้ใบเกิดแผลจุดหลังจากฉีดพ่นเชื้อ 12 วัน ลักษณะอาการในระยะแรกบริเวณที่ทำแผลปลูกเชื้อจะเป็นขุยฟูนูนสีขาวครีม ต่อมาแผลจุดพัฒนาเป็นจุดสะเก็ดสีน้ำตาลทั้งด้านหน้าและด้านหลังใบ จากการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 35 ไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 7 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตโดยให้บริเวณวงใสรัศมีกว้างที่สุดขนาด 8.5 มม. Kanker-Xให้วงใสกว้าง 7.5 มม. และคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ เชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท5102ที่เลี้ยงในอาหารPDB สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดบริเวณวงใสรัศมีกว้าง 7 มม. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท5102 สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้ โดยกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 เกิดแผลจุดเฉลี่ย 21.86 จุด/ใบ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเกิดแผลจุดเฉลี่ย 79.19 จุด/ใบ และจากการจำแนกด้วยวิธี16S rDNA เชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท5102 เป็นเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ผลการทดสอบทางชีวภาพบนต้นถั่วเขียว พบว่าเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ทำให้จำนวนฝัก น้ำหนักฝัก จำนวนเมล็ดและน้ำหนักเมล็ดสูงกว่าต้นถั่วเขียวปกติและต้นถั่วเขียวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* ZJUT zy อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำให้ลำต้นส่วนยอด จำนวนใบ ขนาดของใบด้านกว้างและด้านยาวของส้มโอมีขนาดใหญ่และยาวกว่าต้นปกติที่ฉีดพ่นด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* WD 20สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB มีสารฮอร์โมน IAAปริมาณ 0.15 มก./ลิตร และมี GA_3ปริมาณ 5.2 มก./ลิตร นอกจากนี้ *B.*

subtilis WD 20 ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคลดลง 27.04-28.41 % ในขณะที่สารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคลดลง 2.28%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* WD 20

เอกสารอ้างอิง

สมคิด ดิสถาพร.2540. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร. 92 หน้า

James,C. 1971 . A Manual of Assessment Keys for Plant Diseases. The Amarican Phytopathological Society . St. Paul MN 55121 USA. 28 pp.

Uematsu, T.,Chuenchitt, S.Karnjanarat, S., Vivithajinda, S.,Nabheerong, S.,Benjathikul, S.,Nilmanee, S.,Dhirabhava, W. andBuanghuwon, D.1983.Bacterial Diseases on Economic Crops in Thailand, Topoical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.

ภาคผนวก

ตารางที่1 แสดงปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่างๆ ที่แยกได้ต่อเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*
สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท	แหล่งที่มา	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	บริเวณยับยั้ง (มม.)
5101	ทานตะวัน		3.50
5102	ทานตะวัน	*Bacillus subtilis* WD	8.50
5103	ทานตะวัน	20	7.00
5104	น้ำปุ๋ยหมัก		7.00
512	น้ำปุ๋ยหมัก		8.00
5105	ถั่วเหลือง		3.00
5031	ถั่วเหลือง		5.00
5205	มะนาว		5.38
5206	มะนาว	*Bacillus* sp. DF 48	2.50
5613	มะม่วง	*Bacillus* sp. DF 48	5.25
5701	ใบยอ	*B. subtilis* strain	2.44
5702	ใบยอ	ZJUT zy	4.05
5703	ใบยอ	*Burkholderia gladioli*	2.76
Kanker-X		*Burkholderia gladioli*	7.50
คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์		*Burkholderia gladioli*	0

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102 ในการควบคุมโรคแคงเกอร์และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของส้มโอในเรือนทดลอง

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยจำนวนจุดแผลแคงเกอร์ (จุดต่อใบ)	จำนวนใบยอด (ใบ)	ความยาวลำต้นส่วนยอด (ซม.)	ขนาดของใบยอด	
				ด้านกว้าง (ซม.)	ด้านยาว (ซม.)
ไอโซเลท 5102	21.86 a [1/]	14.43 a	25.99 a	5.67 a	12.56 a
ฉีดพ่นน้ำ (Control)	79.19 b	8.29 b	13.33 b	5.04 a	10.41 b
ยอดปกติ(Control) ไม่ฉีดพ่นเชื้อแคงเกอร์	0.00	9.29 b	15.66 b	4.32 b	9.11 b
ค่าเฉลี่ย	50.52	10.67	18.32	5.01	10.69
CV.	44.1 %	16.0 %	22.3 %	12.6 %	13.3 %

[1/] อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีDMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ผลของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 และ *B. subtilis* ZJUT zy ต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียว (Bioassay Test)

กรรมวิธี	จำนวนฝัก/ต้น	น้ำหนักฝัก(กรัม)	จำนวนเมล็ด	น้ำหนักเมล็ด (กรัม)
*B. subtilis*WD 20	9.30 a[1/]	4.50 a	58.00 a	3.32 a
B. subtilis ZJUT zy	5.70 b	2.51 b	31.80 b	1.87 b
น้ำ (Control)	6.60 b	3.16 b	40.40 b	2.34 b
Mean	7.20	3.39	43.40	2.51
CV.	21.1%**	22.6%**	21.6%**	23.3%**

[1/] อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีDMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 4 ผลของเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ต่อการเจริญเติบโตของต้นส้มโอ (Bioassay Test)

กรรมวิธี	ลำต้นส่วนยอด 1* (ซม.)	จำนวนใบ2* (ใบ)	ขนาดของใบ(ซม.)	
			ด้านกว้าง 3*	ด้านยาว 4*
B. subtilis WD 20	19.93	9.80	5.62	8.44
น้ำ (Control)	15.80	8.50	4.49	7.06
Mean	17.86	9.15	5.05	7.75
CV.	18,8%**	21.7%*	10.4%**	9.1%**

Comparison1*	SED	LSD(5%)	LSD(1%)
2-T means	1.06	2.15	2.88
Comparison2*	SED	LSD(5%)	LSD(1%)
2-T means	0.63	0.27	1.70
Comparison3*	SED	LSD(5%)	LSD(1%)
2-T means	0.17	0.34	0.45
Comparison4*	SED	LSD(5%)	LSD(1%)
2-T means	0.22	0.45	0.60

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* WD20 และสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนต้นส้มโอในแปลงปลูกที่อ.อุทัย จ.พระนครศรีอยุธยา

กรรมวิธี	ลำดับ	เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรค	ค่าความแตกต่างเพิ่ม (ลด)
น้ำ (Control)	4	54.02 b[1/]	0
คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์	3	51.74 b	(2.28)
เชื้อสด *B. subtilis* strain WD20	2	26.62 a	(27.40)
ผงเชื้อ *B. subtilis* strain WD20	1	25.61 a	(28.41)
ค่าเฉลี่ย		40.29	
CV.		28.8 %**	

1/ อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีDMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%