บทความวิจัย (Research Article)

ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ ที่ผลิตระดับอุตสาหกรรม เพื่อใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวภายใต้สภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่

Pilot Scale Production of Novel Biopesticide Wettable Powder Formulation to Control Canker Disease of Lime in Large Field Application

พงศธร ปรโลกานนท์ และดุสิต อธินุวัฒน์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

จตุพร บุณณดากุล

บริษัท ใบธง จำกัด ตำบลเวียง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

Phongsathon Poralokanon and Dusit Athinuwat*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Chatuporn Boonnadakul

Bitoung Company Limited, Wiang, Muang, Phayao 56000

บทคัดย่อ

แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 2 จาก 33 สายพันธุ์ ถูกคัดเลือกและรวบรวมมาจากดินบริเวณรอบรากของต้นมะนาวอินทรีย์ เพื่อศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ โดยสายพันธุ์ TU-Orga13 และ TU-Orga14 มีศักยภาพในการกระตุ้นให้ต้นมะนาวสะสมกรดซาลิซิลิกสูงสุดเท่ากับ 0.714 และ 0.689 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด หลังการคลุกเมล็ดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ (ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml) อัตรา 10 มิลลิลิตร : เมล็ด 1 กิโลกรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับสายพันธุ์อื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม อีกทั้งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ นี้ ยังแสดงบริเวณยับยั้ง *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวได้กว้างที่สุด ด้วยวิธีมาตรฐาน agar diffusion เท่ากับ 2.00 และ 1.93 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับสายพันธุ์อื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม จากนั้นจึงพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำจากผงถ่านชีวภาพที่ประกอบด้วยสารพา สารเสริมประสิทธิภาพ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 หรือ TU-Orga14 รวม 6 สูตร ผลการวิจัยพบว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชชนิดผงผสมน้ำจากผงถ่านชีวภาพที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมสูตรที่ 3 หรือเรียกว่า Formula 3 [ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส และน้ำสกัดถั่วเหลือง

*Corresponding author: athinova6@hotmail.com
DOI: 10.14456/tjst.2018.46

ปริมาณ 500 กรัม ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร] สามารถคงความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับสูตรอื่น ๆ เท่ากับ 2.8×10^{16}, 2.8×10^{15}, 1.9×10^{13} และ 2.8×10^{10} cfu/g ของชีวภัณฑ์ หลังเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 1, 3, 6, และ 12 เดือน ตามลำดับ โดยในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง Formula 3 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแผลแคงเกอร์บนใบมะนาวและลดประมาณประชากร *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) โดยปรากฏแคงเกอร์เท่ากับ 5 แผล และพบประชากรเชื้อโรค 1.13×10^{6} cfu/g ของน้ำหนักสดใบมะนาว ยิ่งไปกว่านั้น Formula 3 สามารถชักนำให้ต้นมะนาวสะสมกรดซาลิซิลิกได้อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่ากับ 0.624 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตลอดจนพบว่าต้นมะนาวที่ราดดินด้วย Formula 3 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร/ต้น มีการสะสมกรดซาลิซิลิกได้มากที่สุดทั้ง 10 วัน ตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม ในทำนองเดียวกัน การราดดินด้วย Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน ในอัตราดังกล่าวข้างต้น ภายใต้สภาพแปลงปลูกของเกษตรกร สามารถลดความรุนแรงโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) โดยปรากฏแคงเกอร์ 5.33, 5.67, 6.00 และ 7.00 แผล ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณประชากร *X. axonopodis* pv. *citri* บนใบมะนาว ซึ่งตรวจพบเท่ากับ $1.12\text{-}1.28 \times 10^{8}$ cfu/g ของน้ำหนักสดใบมะนาว และสอดคล้องกับปริมาณการสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นมะนาวสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.654, 0.450, 0.440 และ 0.429 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ด้วยวิธีมาตรฐาน ทั้งในระดับสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และโมเลกุล พบว่ามีความเหมือนคล้ายคลึงกันกับ *Bacillus subtilis* 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่า *Bacillus subtilis* TU-Orga13 ในชีวภัณฑ์สูตรใหม่ Formula 3 มีการแสดงออกที่รวดเร็วในการผลิตสารทุติยภูมิและกรดซาลิซิลิกเพื่อกระตุ้นให้มะนาวต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *X. axonopodis* pv. *citri*

คำสำคัญ : เกษตรอินทรีย์; ถ่านชีวภาพ; การควบคุมโดยชีววิธี; แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช; กรดซาลิซิลิก

Abstract

Two of thirty-three strains of antagonistic bacteria collected from organic lime plant rhizosphere were characterized. Strains TU-Orga13 and TU-Orga14 were significantly (P = 0.05) high accumulation of salicylic acid within lime plant with 0.714 and 0.689 mg/g fresh weight, respectively, after seed treatments with each strain (1×10^{8} cfu/ml) ratio 10 ml/ 1 kg seed when compared to other strains and controls. Those two strains also showed the biggest clear zone of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of canker on lime plant, inhibition with 2.00 and 1.93 cm, respectively, when compared to other strains and controls which investigated by agar diffusion. The development of novel wettable powder biopesticides containing carriers, additives and biocontrol agent strains TU-Orga13 and TU-Orga14 in six formulations under pilot scale production, biochar-carrier based was established. A biochar-based formulation 3, Formula 3 [biochar, talcum, dolomite, calcium carbonate, CMC, and soybean extract mixed with TU-Orga13 (10^{16} cfu/ml) ratio 10 ml: 500 g of bioformula] showed the highest

survival cells of TU-Orga13 with 2.8×10^{16}, 2.8×10^{15}, 1.9×10^{13}, and 2.8×10^{10} cfu/g of biopesticide at 1, 3, 6, and 12 month-storages, respectively. Subsequently, Formula 3 significantly reduced the number of canker on lime plant leaves and significantly reduced the number of *X. axonopodis* pv. *citri* on lime plant leaves after soil drenched ratio 50 g/ 20 L. of water in total volume 300 ml/plant under greenhouse conditions with 5.00 sores and 1.13×10^{6} cfu/g fresh weight, respectively. Moreover, Formula 3 showed the highest accumulation of salicylic acid within 24 h after challenged inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri* with 0.624 mg/g fresh weight. Moreover, lime plant treated with Formula 3 soil drenched as mentioned above showed the highest accumulation of salicylic acid within 10 days when compared to other formulas and controls under greenhouse conditions. In the same trend, Formula 3 biopesticide, 1, 3, 6, and 12 month-storages, soil drenched significantly reduced the number of canker on lime plant leaves with 5.33, 5.67, 6.00 and 7.00 sores, respectively that correlated with *X. axonopodis* pv. *citri* population on leaves with $1.12-1.28 \times 10^{8}$ cfu/g fresh weight and the highest accumulation of salicylic acid within 24 h after challenged inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri* with 0.654, 0.450, 0.440 and 0.429 mg/g fresh weight, respectively under farmer field conditions. Identification of TU-Orga13 by standard methodology of morphological, biochemical and molecular levels was showed 100 % similarity of *Bacillus subtilis*. This study indicated that *Bacillus subtilis* TU-Orga13 in novel Formula 3 quickly expressed the secretion of secondary metabolites and salicylic acid within lime plant against *X. axonopodis* pv. *citri*.

Keywords: organic agriculture; biochar; biological control; plant pathogenic bacteria; salicylic acid

1. คำนำ

โรคแคงเกอร์จากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เป็นโรคที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายกับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก (Gottwald *et al*., 2001) รวมทั้งประเทศไทยซึ่งมีรายงานโรคแคงเกอร์ระบาดอย่างกว้างขวางอย่างต่อเนื่อง (นลินี และคณะ, 2553) ประกอบกับในต่างประเทศออกกฎระเบียบการนำเข้าผลิตผลพืชตระกูลส้มที่ปราศจากโรคแคงเกอร์ จึงจำเป็นต้องมีมาตรการป้องกันกำจัดอย่างมีประสิทธิภาพ (EPPO/CABI, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มะนาวซึ่งอ่อนแอและง่ายต่อการติดโรคแคงเกอร์มากที่สุด (ณัฏฐิมา, 2550) เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นมะนาว ได้แก่ ลำต้น ใบ กิ่ง และผล หากมีการระบาดรุนแรงจะทำให้ใบร่วง ต้นโทรม แคระแกร็น กิ่งแห้งตาย ผลผลิตลดลง และต้นตายในที่สุด (Civerolo,1984) โรคนี้พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม เชื้อสาเหตุโรคแพร่กระจายไปกับลม น้ำ น้ำฝน หรือกิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค นอกจากนี้การเข้าทำลายของแมลง เช่น หนอนชอนใบ จะทำให้เกิดแผล ซึ่งจะเป็นช่องทางให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่าย (นลินี และคณะ, 2553)

การป้องกันกำจัดสามารถทำได้โดยการใช้กิ่งพันธุ์ปลอดโรค หมั่นสำรวจแปลงอย่างสม่ำเสมอ โดยเฉพาะระยะแตกใบอ่อน ซึ่งเป็นระยะอ่อนแอต่อโรค หรือระยะติดผลอ่อนซึ่งเป็นระยะที่แมลงพาหะ เช่น หนอนชอนใบ มักทำให้เกิดแผลและเป็นช่องทางให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่าย ในฤดูฝนต้องหมั่นตัดแต่งกิ่งแห้ง กิ่งที่เป็นโรค รวมทั้งเก็บ

ใบและผลที่เป็นโรคออกจากบริเวณแปลงปลูก และเผาทำลายนอกแปลง เมื่อวิธีการดังกล่าวข้างต้นใช้ไม่ได้ผลจำเป็นต้องพ่นสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 15-20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7-10 วันอย่างสม่ำเสมอ (ณัฏฐิมา และคณะ, 2557) อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีมักไม่ได้ผลเนื่องจากการใช้สารเคมีผิดวิธีและผิดเวลา รวมทั้งเชื้อสาเหตุโรคดื้อสาร การควบคุมโรคทางเลือกโดยชีววิธีจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่เกษตรกรและผู้บริโภคให้ความสนใจ เพราะนอกจากความปลอดภัยของผลิตผลแล้วยังปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดย Kalita *et al.* (1996) นักวิจัยชาวอินเดียรายงานผลการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์และราปฏิปักษ์ในการควบคุม *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ พบว่า *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพดีที่สุด (P = 0.05) รองลงมา คือ *Pseudomonas fluorescens* และ *Aspergillus terreus* ตามลำดับ และ Huang และคณะ (2012) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ TKS1-1 และ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ WG6-14 สามารถยับยั้ง *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีที่สุด (P = 0.05) สำหรับการควบคุมโรคแคงเกอร์โดยชีววิธีในประเทศไทย จิระเดช (2552) รายงานประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. และแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. cereus* ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวได้เป็นอย่างดี รวมทั้ง นลินี และคณะ (2556) รายงานการใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืช *B. subtilis* อัตรา 5 และ 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวได้ดีทัดเทียมกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (P = 0.05) บ่งชี้ให้เห็นความสำเร็จของการใช้ชีววิธีและชีวภัณฑ์อารักขาพืชควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว หากมีการคัดสรรแบคทีเรียปฏิปักษ์จากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งและกระตุ้นภูมิต้านทานของต้นมะนาวต่อโรคแคงเกอร์ ตลอดจนพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์พร้อมใช้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในระดับอุตสาหกรรม ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ ในระบบการผลิตมะนาวแปลงใหญ่ได้อย่างยั่งยืน จะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับเกษตรกรทั่วไปและเกษตรกรอินทรีย์ที่กำลังมองหาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสำหรับใช้ทั้งในระบบการผลิตมะนาวปลอดภัยและมะนาวอินทรีย์ที่สามารถลดปัญหาสิ่งแวดล้อม แรงงาน และการดื้อต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรคไปในคราวเดียวกัน

ซึ่งการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืช สามารถพัฒนาได้ 2 แนวทาง ได้แก่ (1) สูตรน้ำ (liquid formula) และ (2) สูตรผง (powdered formula) ชีวภัณฑ์อารักขาพืช สูตรน้ำ แบคทีเรียปฏิปักษ์จะอยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ หรืออาจอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่ละลาย ความทนทานต่ออุณหภูมิและสารเคมีต่ำ อายุสั้นและต้องการการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุที่พิเศษ ต้องมีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซและความชื้นที่เหมาะสม ส่วนสูตรผงนิยมใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสปอร์ได้ เช่น *Bacillus* sp. ผสมกับสารพาและเติมสารป้องกันเซลล์จากความร้อนในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ได้แก่ หางนม เจลาติน คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส หรือซีเอ็มซี (carboxymethylcellulose, CMC) เป็นต้น ซึ่งสารที่เติมลงไปบางชนิดช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์ และช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำที่มีผงถ่านชีวภาพ (biochar) เป็นสารพาและเติมสารเสริมประสิทธิภาพต่างชนิดกัน เพื่อการผลิตระดับอุตสาหกรรม ภายใต้ความร่วมมือกับบริษัท ใบธง จำกัด สำหรับใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวภายใต้สภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่ ซึ่งผงถ่านชีวภาพจัดเป็นวัสดุที่อุดมด้วยคาร์บอน ผลิตจากการให้ความร้อนมวลชีวภาพ (biomass) โดยไม่ใช้ออกซิเจนหรือใช้น้อยมาก ส่งผลให้ผงถ่าน

ชีวภาพมีรูพรุน ซึ่งจะเป็นที่กักเก็บแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับทำหน้าที่ครอบครองผิวรากพืชและส่งสัญญาณกระตุ้นภูมิต้านทานโรคพืชทั้งระบบ ตลอดจนทำกิจกรรมสร้างธาตุอาหารพืชหรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช นอกจากนี้รูพรุนของผงถ่านชีวภาพยังสามารถเก็บน้ำและธาตุอาหารในดิน เมื่อดินอุดมสมบูรณ์จะส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดีและผลผลิตเพิ่มขึ้น อีกทั้งผงถ่านชีวภาพยังสามารถกักเก็บคาร์บอนในดินและลดคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศในระยะยาว

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การแยกและรวบรวมแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์

นำดินรอบรากต้นมะนาวอินทรีย์ที่สมบูรณ์แข็งแรงมาแยกแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์ด้วยวิธีมาตรฐาน ten-fold serial dilution (Alcamo, 2001) จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (33±2 ºC) นาน 48 ชั่วโมง สุ่มเก็บตัวแทนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร nutrient glucose agar (NGA) โดยใช้เกณฑ์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโคโลนี ได้แก่ สี (color) รูปร่าง (shape) ขนาด (size) และรูปแบบขอบ (margin) สุ่มเก็บแบคทีเรีย 3 จาก 10 โคโลนี ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน และนำแบคทีเรียทั้งหมดไป cross streak บนอาหาร NGA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำไปทดสอบสมบัติแกรมด้วย potassium hydroxide (KOH) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันด้วยการย้อมสีแกรมตามวิธีมาตรฐาน (Alcamo, 2001) และทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการชักนำการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ (hypersensitive reaction) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชออกจากกลุ่มประชากรตัวอย่าง โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized designs (CRD) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ เริ่มต้นเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งเป็นประชากรตัวอย่างทุกสายพันธุ์ในอาหารเหลว NGB ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง และบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ปรับความขุ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml) จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อ โดยไม่ใส่เข็มฉีดยา ดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกแล้วฉีดเข้าสู่ใบของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ตรวจดูปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน โดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชจะเกิดอาการตายของเซลล์ (necrotic) บนใบยาสูบทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้มีค่าเท่ากับ 1 และถ้าไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชจะไม่เกิดอาการเซลล์ตายบนใบยาสูบ ให้มีค่าเท่ากับ 0 (Schaad, 1988) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์โดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551)

2.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่กระตุ้นให้ระบบภูมิต้านทานของต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิก

คัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิต้านทานของต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิก เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์นั้น เริ่มจากการล้างเมล็ดมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ (ณัฏฐิมา, 2550) ด้วย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผึ่งเมล็ดพอหมาด ๆ คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จำนวน 33

สายพันธุ์ ที่แยกได้จากข้อ 2.1 (ความเข้มข้นสายพันธุ์ละประมาณ 10^8 cfu/ml) เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์อารักขาพืชทางการค้า *Bacillus subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร กรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 2.5 mM สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราเมล็ด 1 กิโลกรัม/สิ่งทดสอบต่าง ๆ ในแต่ละกรรมวิธีปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ รวม 38 กรรมวิธี นำเมล็ดมะนาวในแต่ละกรรมวิธีไปปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 4 นิ้ว ที่บรรจุดินร่วนนึ่งฆ่าเชื้อกระถางละ 300 กรัม โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 10 กระถาง (ซ้ำ) ซ้ำละ 6 เมล็ด รดน้ำเช้า-เย็น เมื่อเมล็ดงอก ถอนแยกเหลือกระถาง (ซ้ำ) ละ 3 ต้น เก็บรักษาต้นมะนาวไว้ภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง จนกระทั่งต้นมะนาวอายุ 15 วัน เก็บใบมะนาว 0.1 กรัม/ต้น จากแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น มาบดใน homogenization buffer [methanol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร acetic acid ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร] จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 ºC นาน 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม methanol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมสาร 0.02 M ferric ammonium sulfate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มไว้สภาพอุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยแสดงค่าเป็นมิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด (Tatyane *et al*., 2007) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามสมการ คือ Y = 0.114X + 0.049 โดย Y = ปริมาณการสะสมของกรดซาลิซิลิก และ X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์จากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการสะสมกรดซาลิซิลิกในต้นมะนาว โดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่กระตุ้นให้ระบบภูมิต้านทานของต้นมะนาวสังเคราะห์กรดซาลิซิลิกต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

2.3 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จำนวน 33 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากข้อ 2.1 ในการยับยั้ง *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว (พงศธร, 2560) ด้วยวิธีมาตรฐาน agar diffusion เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์อารักขาพืชทางการค้า *B. subtilis* กรดซาลิซิลิก สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ และแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์บนอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียแต่ละชนิด (แบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์หรือแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์) ใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในปริมาตรตามที่ต้องการ ปรับความขุ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ micropipette ดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่หลอมละลายตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ 45-50 ºC ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำให้เกิดหลุมขนาด 0.5 เซนติเมตร บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่

เตรียมไว้ จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์จำนวน 33 สายพันธุ์ (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) หรือชีวภัณฑ์อารักขาพืชทางการค้า *B. subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หรือกรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 2.5 mM หรือสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ โดยคำนวณจากสูตร บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) = (ความกว้างบริเวณยับยั้งตามแนวแกน X + ความกว้างบริเวณยับยั้งตามแนวแกน Y) ÷ 2

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์โดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากพืชที่ทำหน้าที่ 2 แนวทาง ทั้งการเป็นปฏิปักษ์และการกระตุ้นภูมิต้านทานของต้นมะนาว เพื่อนำไปจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์และพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำจากผงถ่านชีวภาพต่อไป

2.4 พัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2.4.1 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TU-Orga13 และ TU-Orga14 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ฆ่าเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์โดยตรงและกระตุ้นภูมิต้านทานของต้นมะนาวด้วยการสะสมกรดซาลิซิลิก มาเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงภายใต้สภาพถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับอุตสาหกรรมขนาด 150 ลิตร โดยเริ่มจากการเลี้ยง TU-Orga13 และ TU-Orga14 แยกกันในอาหาร NGB ปริมาตรสายพันธุ์ละ 1 ลิตร เขย่า 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วย NGB นึ่งฆ่าเชื้อให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) จึงย้ายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อัตราส่วน 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารที่ใช้เลี้ยงปริมาตร 150 ลิตร ภายใต้สภาพค่า antifoam ค่าออกซิเจน แสง และคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 1, 41.66 slpm, 0.0 และ 91200 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 (ความเข้มข้นแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ประมาณ 10^{16} cfu/ml)

2.4.2 การเตรียมสูตรชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ ชนิดผงผสมน้ำ

นำผงถ่านชีวภาพ (biochar) แป้งทัลคัม (talcum) โดโลไมต์ (dolomite) แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (carboxymethylcellulose, CMC) และน้ำสกัดถั่วเหลือง มานึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคภายใต้สภาพอุณหภูมิ 121 ºC ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง ห่างกัน 1 วัน และนำส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วมาผสมกันตามอัตราส่วนดังต่อไปนี้ 60 : 20 : 10 : 8 : 2 โดยสูตรที่ 1 ประกอบด้วยผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง สูตรที่ 2 ประกอบด้วยผงถ่านชีวภาพ โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง และสูตรที่ 3 ประกอบด้วยผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1) แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง หลังจากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.1 ผสมลงไปในสูตรชีวภัณฑ์ที่ 1, 2 และ 3 อัตรา 10 มิลลิลิตร/สูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม นำไปผึ่งลมร้อนให้หมาด นำมาบรรจุถุงฟอยด์ ปริมาณ 1 กิโลกรัม/ถุง วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 10 ถุง และเก็บรักษา

ไว้ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง เพื่อทดสอบสมบัติการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ โดยนำชีวภัณฑ์สูตรใหม่แต่ละสูตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่มีอายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน มาศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธีมาตรฐาน ten-fold serial dilution (Alcamo, 2001) วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อคัดเลือกสูตรชีวภัณฑ์สูตรใหม่ที่คงความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ดีที่สุดในสภาพอุณหภูมิห้อง

2.5 ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในเรือนปลูกพืชทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 10 กระถาง (ซ้ำ) ซ้ำละ 1 กระถาง กระถางละ 1 ต้น นำชีวภัณฑ์สูตรใหม่ทั้ง 3 สูตร ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ผลิตขึ้นในข้อ 4 รวม 6 สูตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์และกระตุ้นภูมิต้านทานของมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ อายุ 1 ปี ด้วยวิธีการราดดิน อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ปริมาตรกระถางละ 300 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร เชื้อสด TU-Orga14 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร กรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 2.5 mM สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ชีวภัณฑ์ทางการค้า *B. subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ผงถ่านชีวภาพ อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรกระถางละ 300 มิลลิลิตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ ซึ่งหลังจากราดดิน 3 วัน ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) ด้วยวิธีการฉีดเชื้อโรคเข้าที่ใบ อัตรา 0.5 มิลลิลิตร/ใบ และบ่มไว้ในเรือนปลูกพืชทดลอง ให้มีความชื้นสัมพัทธ์สูงที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค (ประมาณ 98-100 %) ประเมินประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แต่ละสูตรของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ โดยวิเคราะห์การสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นมะนาวเป็นเวลา 10 วัน (เริ่มตั้งแต่การใช้ชีวภัณฑ์ราดดินครั้งแรก) และวิเคราะห์อัตราการเกิดโรคแคงเกอร์ 7 วันหลังปลูกเชื้อ วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมกรดซาลิซิลิกและความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ในแต่ละกรรมวิธี

2.6 ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในแปลงเกษตรขนาดใหญ่

การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในแปลงเกษตรขนาดใหญ่สำหรับใช้ร่วมในระบบการปลูกมะนาวอินทรีย์ของเกษตรกร วางแผนการทดลองแบบ randomized completely blocks design (RCBD) โดยคัดเลือกชีวภัณฑ์สูตรใหม่จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TU-Orga13 สูตรที่ 3 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พร้อมศึกษาอายุการเก็บรักษาที่ 1, 3, 6 และ 12 เดือน ในการควบคุมโรคแคงเกอร์และกระตุ้นภูมิต้านทานของมะนาวอินทรีย์ในสภาพแปลงเกษตรกร อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา บนมะนาวพันธุ์แป้นรำไพ อายุ 1 ปี ด้วยการราดดิน อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ปริมาตรต้นละ 300 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร กรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 2.5

mM อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ชีวภัณฑ์ทางการค้า *B. subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ผงถ่านชีวภาพ อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรต้นละ 300 มิลลิลิตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการ ใด ๆ ซึ่งหลังจากราดดิน 3 วัน ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) ด้วยวิธีการฉีดใบ อัตรา 0.5 มิลลิลิตร/ใบ ประเมินประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรใหม่จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TU-Orga13 สูตรที่ 3 ซึ่งผ่านการเก็บรักษานาน 1, 3, 6 และ 12 เดือน โดยวิเคราะห์การสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นมะนาวเป็นเวลา 10 วัน (เริ่มตั้งแต่การใช้ชีวภัณฑ์ราดดินครั้งแรก) และวิเคราะห์อัตราการเกิดโรคแคงเกอร์ 7 วันหลังปลูกเชื้อ วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมกรดซาลิซิลิกที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน กระตุ้นให้มะนาวอินทรีย์ผลิตขึ้นกับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ภายใต้สภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่ เพื่อระบุอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์และใช้เป็นรายละเอียดของชีวภัณฑ์ก่อนถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีการผลิตสู่ภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2.7 การจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13

2.7.1 ศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์และกระตุ้นภูมิต้านทานของต้นมะนาวได้ดีที่สุด บนอาหาร NGA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี โดยเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ สี และลักษณะรูปร่างของโคโลนี

2.7.2 ศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการ

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 บนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ oxidase test, catalase production, oxygen relationship, indole production, motility test, citrate utilization, urease test และ starch hydrolysis โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD การทดสอบละ 10 ซ้ำ วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10th Ed.)

2.7.3 การจำแนกระดับ species

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ด้วยเทคนิค colony PCR และตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้ UV transilluminator ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร และบันทึกภาพ และสกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นเจลเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการแยกและรวบรวมแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์

ผลการแยกแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์จากดินรอบรากต้นมะนาวอินทรีย์ที่สมบูรณ์แข็งแรง สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 110 สายพันธุ์ และสุ่มเก็บแบคทีเรีย 3 จาก 10 โคโลนี ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันได้ 33 สายพันธุ์ เมื่อนำมาจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถจัดได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 โคโลนีกลม นูน ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ เป็นมันวาว สีขาวขุ่น จำนวน 2 สายพันธุ์ กลุ่ม 2 โคโลนีกลม นูน ผิวหน้าขรุขระ ขอบเรียบ เป็นมันวาว สีขาวขุ่น จำนวน 11 สายพันธุ์ กลุ่ม 3 โคโลนีกลม นูน ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ เป็นมันวาว สีน้ำตาลอ่อน จำนวน 8 สายพันธุ์ กลุ่ม 4 โคโลนีกลม นูน ผิวหน้าขรุขระ ขอบไม่เรียบ สีขาวขุ่น จำนวน 5 สายพันธุ์ กลุ่ม 5 โคโลนีกลม ไม่นูน ผิวหน้าขรุขระ ขอบเป็นคลื่นเว้าเล็กน้อย สีขาวขุ่น จำนวน 4 สายพันธุ์ และกลุ่ม 6 โคโลนีกลม ไม่นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว ขอบเรียบ สีขาวใส จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียทั้ง 33 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก [จากการทดสอบด้วย KOH ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และการย้อมสีแกรมตามวิธีมาตรฐาน (Alcamo, 2001)] และไม่สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response, HR) บนใบยาสูบ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) บ่งชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากต้นมะนาวอินทรีย์ทั้ง 33 สายพันธุ์ นี้ไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช (Schaad *et al*., 2001)

3.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่กระตุ้นให้ระบบภูมิต้านทานของต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิก

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่กระตุ้นให้ระบบภูมิต้านทานของต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิก (salicylic acid, SA) เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ พบว่า TU-Orga13 และ TU-Orga14 จาก 33 สายพันธุ์ สามารถกระตุ้นให้ต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิกได้สูงสุดเท่ากับ 0.714 และ 0.689 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นและกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1) ซึ่งการผลิตกรดซาลิซิลิกภายในพืชเป็นระบบภูมิต้านทานของพืชตามธรรมชาติในการปกป้องตัวเองให้รอดพ้นจากสภาวะความเครียดต่าง ๆ เมื่อเชื้อโรคเข้าทำลายพืช พืชจะเกิดการตอบสนองอย่างฉับพลัน (HR) และผลิตกรดซาลิซิลิกเพื่อทำหน้าที่เป็นสัญญาณส่งไปยังเซลล์ต่าง ๆ ทั่วทั้งต้นพืช กระตุ้นให้ยีนต้านทานโรค (pathogenicity related gene, PR gene) ผลิตโปรตีนต้านทานโรค (PR protein) เพื่อทำหน้าที่เป็นสารควบคุมและฆ่าเชื้อโรคหลาย ๆ ชนิด ทำให้พืชมีภูมิต้านทานรอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชได้ ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า systemic acquired resistance (SAR) ขณะที่การใช้เชื้อปฏิปักษ์โดยเฉพาะเชื้อปฏิปักษ์จากดินรอบรากพืชกระตุ้นภูมิต้านทานของพืชผ่านกระบวนการผลิตกรดซาลิซิลิกและ/หรือกรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) รวมทั้งสารประกอบต่าง ๆ เป็นอีกหนึ่งช่องทางในการช่วยให้พืชมีภูมิต้านทานและรอดพ้นจากสภาวะความเครียดต่าง ๆ ได้ ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า induced systemic resistance (ISR) โดย *Bacillus* spp. ถูกสันนิษฐานว่ามีส่วนร่วมในกิจกรรมต้านทานต่อเชื้อโรคพืชและการกระตุ้นให้พืชผลิตกรดซาลิซิลิก ซึ่งนำไปสู่การสะสมสารประกอบต่าง ๆ ในระบบภูมิต้านทานของพืช ได้แก่ chitinases, beta-1,3-1,4-glucanase และ lipopeptides (Alvarez *et al*., 1998; Zhang *et al*., 2015; Xu *et al*., 2016) เช่นเดียวกับ Wang and Li (2012) รายงานว่า *B. amyloliquefaciens* SQRT3 ที่แยกได้จากดินรอบรากมะเขือเทศสามารถลดความรุนแรงโรคเหี่ยวได้ 61 เปอร์เซ็นต์ และพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญสัญญาณในกระบวนการผลิตกรดซาลิซิลิกและกรดจัสโมนิกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบ

เทียบกับกรรมวิธีควบคุม (SAR/ISR) สอดคล้องกับรายงานของ Métraux และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าในใบพืชที่ถูกกระตุ้นให้มีภูมิต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชจะมีกรดซาลิซิลิก และ/หรือกรดจัสโมนิกสูงกว่าในพืชปกติ บ่งชี้ให้เห็นว่ากรดซาลิซิลิกและกรดจัสโมนิกจัดเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งระบบของพืช (SAR/ISR) ซึ่งผลการวิจัยพบว่า TU-Orga13 และ TU-Orga14 สามารถกระตุ้นให้ต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิกได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานของพืชให้ต้นมะนาวต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากต้นมะนาวอินทรีย์ในการกระตุ้นให้ต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิก[1/]

กรรมวิธี	ปริมาณกรดซาลิซิลิกในพืช (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด)	กรรมวิธี	ปริมาณกรดซาลิซิลิกในพืช (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด)	กรรมวิธี	ปริมาณกรดซาลิซิลิกในพืช (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด)
TU-Orga1	0.504d	TU-Orga12	0.487d	TU-Orga23	0.493d
TU-Orga2	0.519de	TU-Orga13	0.714f	TU-Orga24	0.492d
TU-Orga3	0.518de	TU-Orga14	0.689f	TU-Orga25	0.482d
TU-Orga4	0.505d	TU-Orga15	0.476cd	TU-Orga26	0.482d
TU-Orga5	0.461cd	TU-Orga16	0.290a	TU-Orga27	0.512de
TU-Orga6	0.521de	TU-Orga17	0.503d	TU-Orga28	0.491d
TU-Orga7	0.587e	TU-Orga18	0.456cd	TU-Orga29	0.483d
TU-Orga8	0.484d	TU-Orga19	0.496d	TU-Orga30	0.372b
TU-Orga9	0.523de	TU-Orga20	0.500d	TU-Orga31	0.397bc
TU-Orga10	0.348ab	TU-Orga21	0.470cd	TU-Orga32	0.523de
TU-Orga11	0.479d	TU-Orga22	0.486d	TU-Orga33	0.518de
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.500d	กรดซาลิซิลิก	0.488d	-	-
ชีวภัณฑ์อารักขาพืชทางการค้า	0.499d	คอปเปอร์-ไฮดรอกไซด์	0.490d	กรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ	0.278a

[1/]อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test (DMRT)

3.3 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นปฏิปักษ์ทั้ง 33 สายพันธุ์ พบว่า TU-Orga13 และ TU-Orga14 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) โดยแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (clear zone) เท่ากับ 2.00 และ 1.93 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ TU-Orga26 TU-Orga31 และ TU-Orga25 โดยแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เท่ากับ 1.57, 1.33 และ 1.13 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยบริเวณยับยั้งเชื้อโรคบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดจากความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ทำลายเชื้อโรคได้โดยตรง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จัดเป็นหนึ่งในกลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งมีรายงาน *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin และ mycosubtilin (Peng and Mustafa, 2003) สอดคล้องกับ อมรรัตน์ และคณะ (2560) ที่รายงานประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. PSD-2 ในการยับยั้งการเจริญของ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้สูงสุดถึง 85.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ ที่ยับยั้งการเจริญได้สูงสุดเพียง 58.33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Das และคณะ (2014) ที่ศึกษาการใช้ *B. subtilis* S-12 ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยการพ่นเพียงครั้งเดียวให้ผลในการลดโรคถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และ Zhang และคณะ (2015) พบว่า *B. amyloliquefaciens* GB1 มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fan และคณะ (2017) พบว่า *B. subtilis* 9407 มีศักยภาพในการผลิต fengycin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคผลเน่าของแอปเปิ้ล ซึ่งผลการวิจัยพบว่า TU-Orga13 และ TU-Orga14 สามารถแสดงการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีแนวโน้มเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและ/หรือสารทุติยภูมิควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในสภาพธรรมชาติได้

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากต้นมะนาวอินทรีย์ในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว[1/]

กรรมวิธี	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)	กรรมวิธี	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)	กรรมวิธี	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)
TU-Orga1	0.00a	TU-Orga12	0.00a	TU-Orga23	0.00a
TU-Orga2	0.00a	TU-Orga13	2.00d	TU-Orga24	1.17b
TU-Orga3	0.00a	TU-Orga14	1.93d	TU-Orga25	1.13bc
TU-Orga4	0.00a	TU-Orga15	0.00a	TU-Orga26	1.57c
TU-Orga5	0.00a	TU-Orga16	0.00a	TU-Orga27	1.10b
TU-Orga6	0.00a	TU-Orga17	0.00a	TU-Orga28	1.07b
TU-Orga7	0.00a	TU-Orga18	0.00a	TU-Orga29	1.00b
TU-Orga8	0.00a	TU-Orga19	0.00a	TU-Orga30	1.20b
TU-Orga9	0.00a	TU-Orga20	0.00a	TU-Orga31	1.33bc
TU-Orga10	1.00b	TU-Orga21	0.00a	TU-Orga32	1.10b
TU-Orga11	0.00a	TU-Orga22	0.00a	TU-Orga33	1.03b
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.00a	กรดซาลิซิลิก	1.57c	-	-
ชีวภัณฑ์อารักขาพืชทางการค้า	1.10b	คอปเปอร์-ไฮดรอกไซด์	1.07b	กรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ	0.00a

[1/]อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ DMRT

3.4 ผลการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ผลของการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำจาก TU-Orga13 และ TU-Orga14 สายพันธุ์ละ 3 สูตร รวม 6 สูตร และทดสอบความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละสูตรที่อายุการเก็บรักษา 1, 3, 6 และ 12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่า Formula 3 (ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1) แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง (อัตราส่วนผสมอยู่ในระหว่างการจดสิทธิบัตร) ผสม TU-Orga13 ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร) มีอัตราการรอดชีวิตของ TU-Orga13 สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) โดยมีจำนวนเซลล์ TU-Orga13 เท่ากับ 2.8×10^{16}, 2.8×10^{15}, 1.9×10^{13} และ 2.8×10^{10} cfu/g ของชีวภัณฑ์ ที่อายุการเก็บรักษา 1, 3, 6 และ 12 เดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เนื่องจากในสูตรชีวภัณฑ์นี้ประกอบด้วยผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1), แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง โดยสารพา สารเหนียว และสารเสริมประสิทธิภาพที่เติมลงไปช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์และเพิ่มความสามารถของเซลล์ รวมทั้งช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา โดยเฉพาะลักษณะและสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของผงถ่านชีวภาพ ซึ่งลักษณะความเป็นรูพรุนจะช่วยกักเก็บน้ำและอาหารของแบคทีเรียปฏิปักษ์ รวมทั้งเป็นที่อยู่ให้กับ TU-Orga13 ที่มีความคล้ายคลึงกับแหล่งที่อยู่อาศัยในสภาพธรรมชาติ สอดคล้องกับ Pahari และคณะ (2017) รายงานการใช้ผงถ่านชีวภาพเป็นสารพาสามารถช่วยยืดอายุของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ให้มีอัตราการรอดชีวิตในดินที่ปลูกถั่วเขียว $6.63 \pm 0.29 \times 10^5$ cfu/g ของดิน หลังการใช้ 120 วัน การใช้สารพาแป้งทัลคัม โดโลไมต์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถใช้เป็นแหล่งที่อยู่เหมาะแก่การมีชีวิตรอด เนื่องจากช่วยเพิ่มความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงจากความร้อนได้ดี อีกทั้งสารคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี ยังเป็นสารช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความแข็งแรงทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับ Amalraj และคณะ (2013) รายงานผลของสารเสริมและสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ polyvinylpyrrolidone (PVP) 2 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ polysorbate ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ ในการยืดอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus* sp. ในสภาพอุณหภูมิ 30 ºC ได้นาน 480 วัน ซึ่งพบ *Bacillus* sp. ที่มีชีวิตเท่ากับ 5.6×10^7 cfu/g อีกทั้งในสูตรชีวภัณฑ์ที่ประสบความสำเร็จในการวิจัยนี้ยังมีสารอาหารเสริมประสิทธิภาพ ได้แก่ น้ำสกัดถั่วเหลือง ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานให้แก่แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และสารอาหารรองต่าง ๆ (ชัยสิทธิ์ และคณะ, 2550)

3.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในเรือนปลูกพืชทดลอง

3.5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ Formula 1 [ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] Formula 2 [ผงถ่านชีวภาพ โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และ

ตารางที่ 3 สมบัติของชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำต่อปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหลังการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 3, 6 และ 12 เดือน[1/]

สูตรชีวภัณฑ์[2/]	ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตในชีวภัณฑ์แต่ละสูตร (cfu/g)			
	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	12 เดือน
Formula 1	1.5×10^{16} c	1.2×10^{13}a	2.8×10^{6}a	1.6×10^{5}a
Formula 2	1.1×10^{15} a	1.0×10^{12}a	1.1×10^{6}a	1.0×10^{4}a
Formula 3	2.8×10^{16} d	2.8×10^{15}b	1.9×10^{13}b	2.8×10^{10}b
Formula 4	1.3×10^{16} b	1.2×10^{13}a	1.0×10^{6}a	2.8×10^{4}a
Formula 5	1.1×10^{15} a	1.0×10^{11}a	2.4×10^{5}a	0a
Formula 6	1.1×10^{14} a	1.0×10^{11}a	1.5×10^{4}a	0a

[1/]อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ DMRT

[2/]Formula 1 หมายถึง สูตรที่ 1 ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร; Formula 2 หมายถึง สูตรที่ 2 ผงถ่านชีวภาพ โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร; Formula 3 หมายถึง สูตรที่ 3 ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1) แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร; Formula 4 หมายถึง สูตรที่ 1 ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga14 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga14 10 มิลลิลิตร; Formula 5 หมายถึง สูตรที่ 2 ผงถ่านชีวภาพ โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga14 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga14 10 มิลลิลิตรว Formula 6 หมายถึง สูตรที่ 3 ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1) แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga14 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga14 10 มิลลิลิตร

น้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] และ Formula 3 [ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1) แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ซึ่งกันและกัน และทัดเทียมกับการใช้เชื้อสด TU-Orga13 และ TU-Orga14 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) โดย Formula 1, Formula 2 และ Formula 3 ปรากฏจำนวนแผลแคงเกอร์เท่ากับ 5.4, 4.6 และ 5.0 แผล ตามลำดับ จากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยวิธีการฉีดเชื้อ

โรค (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) เข้าที่ใบอัตรา 0.5 มิลลิลิตร/ใบ (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาความกว้างของบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล (halo) ที่ปรากฏ พบว่า Formula 3 มีความกว้างของบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลต่ำที่สุดเท่ากับ 0.54 เซนติเมตร ทัดเทียมกับการใช้เชื้อสด TU-Orga13 และ TU-Orga14 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (ตารางที่ 4) และเมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ 7 วัน พบว่า Formula 1-6 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนประชากรเชื้อสาเหตุโรคได้ทัดเทียมกัน 1.13×10^6 ถึง 1.96×10^6 cfu/g น้ำหนักสดพืช ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนแผล ความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล (halo) และปริมาณเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์บนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อโรค 7 วัน ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง[1/]

กรรมวิธี[2/]	จำนวนแผล	ความกว้างแผล (เซนติเมตร)	ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (cfu/g น้ำหนักสดพืช)
Formula 1	5.40abc	0.68b	1.96×10^6a
Formula 2	4.60ab	0.70b	1.96×10^6a
Formula 3	5.00ab	0.54a	1.13×10^6a
Formula 4	7.40bcd	0.70b	1.94×10^6a
Formula 5	8.40cd	0.69b	1.63×10^6a
Formula 6	8.80cd	0.71b	1.31×10^6a
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	32.00g	1.22d	1.33×10^7b
กรดซาลิซิลิก	15.00e	0.70b	2.47×10^6a
สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	25.20f	0.89c	1.14×10^7b
ชีวภัณฑ์ทางการค้า *Bacillus subtilis*	16.20e	0.72b	2.77×10^6a
เชื้อสดของแบคทีเรีย TU-Orga13	3.00a	0.55a	1.17×10^6a
เชื้อสดของแบคทีเรีย TU-Orga14	5.20abc	0.57a	1.23×10^6a
ไบโอชาร์เพียงอย่างเดียว	31.00g	1.18d	1.25×10^7b
กรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ	35.00g	1.25d	1.46×10^7b

[1/]อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ DMRT

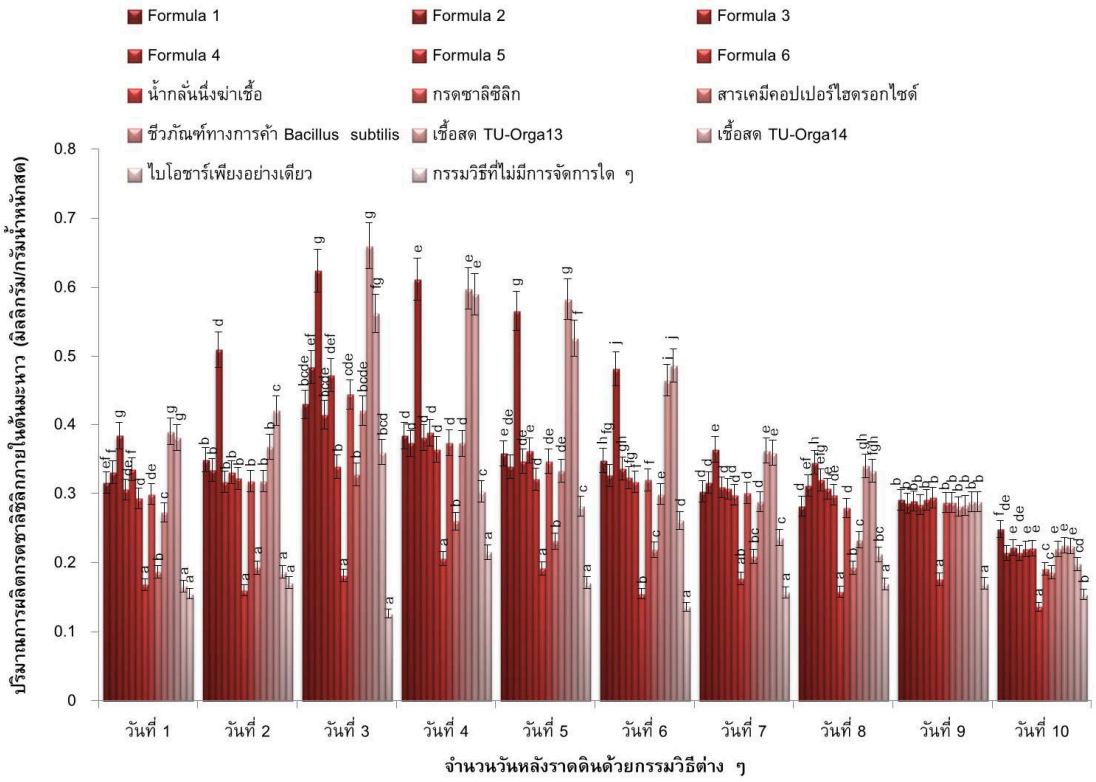
[2/]รายละเอียดกรรมวิธีดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า Formula 3 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม พิจารณาจากจำนวนแผล ความกว้างของบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล และปริมาณเชื้อโรคมีความสัมพันธ์กัน แสดงให้ถึงความเหมาะสมระหว่างสูตรชีวภัณฑ์และแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ซึ่งสูตร

ชีวภัณฑ์ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้รอดชีวิตได้ดีและส่งเสริมให้แบคทีเรียปฏิปักษ์แสดงออกได้เต็มศักยภาพ ลดปริมาณเชื้อโรคและลดความรุนแรงโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P=0.05) โดยกระบวนการที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีปฏิสัมพันธ์กับพืชนั้นอาจด้วยทางตรงหรือทางอ้อม ได้แก่ การเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อโดยตรงโดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตสารปฏิชีวนะและ/หรือ สารทุติยภูมิทำลายเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้โดยตรงเช่นเดียวกับ นลินี และคณะ (2553) รายงานว่า *B. subtilis* WD 20 สามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในส้มโอ สำหรับการที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีปฏิสัมพันธ์กับพืชทางอ้อมนั้น คือ ชีวภัณฑ์สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการสะสมสารประกอบทุติยภูมิในพืช ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ของเชื้อโรคได้ดีเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับ Clarke และคณะ (2000) รายงานว่ากรดซาลิซิลิกมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีน *Npr1* ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนความต้านทานในการส่งสัญญาณภูมิต้านทานพืชทั้งระบบ (SAR) โดยกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีน และสารชีวเคมีที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ นอกจากนี้บริเวณเนื้อเยื่อพืชที่มีกรดซาลิซิลิกยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) หรือเอนไซม์ในระบบการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, peroxidase และ superoxide dismutase ซึ่งจะเข้ามาช่วยในกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากสภาพเครียดต่าง ๆ ของพืช ตลอดจนช่วยลดอันตรายและความเสียหายที่จะเกิดขึ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (สุรัสวดี, 2555)

3.5.2 ผลการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในต้นมะนาวหลังการกระตุ้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรใหม่ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า Formula 3 [ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1), แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ต้นมะนาวพันธุ์แป้นรำไพสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นพืชสูงสุดอย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน เท่ากับ 0.624 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ซึ่งทัดเทียมกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 เชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga14 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (รูปที่ 1) ซึ่งการที่มะนาวสะสมกรดซาลิซิลิกสูงสุดในวันที่ 3 นี้ เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ซึ่งมีการปลูกเชื้อในวันเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าชีวภัณฑ์สูตรใหม่นี้สามารถกระตุ้นให้พืชเพิ่มการสะสมของกรดซาลิซิลิกให้มะนาวต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยข้างต้นในข้อ 3.2 และสอดคล้องกับ กฤติเดช และดุสิต (2559) รายงานประสิทธิภาพ *B. subtilis* TU-Orga1 ซึ่งสามารถใช้กระตุ้นให้พืชผลิตสารต่าง ๆ ในระบบภูมิต้านทานพืชได้ ได้แก่ salicylic acid, beta-1,3-glucanase, peroxidase, phenolic, guaiacol และ peroxidase โดยเอนไซม์บางชนิดที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต phytoalexin และโปรตีนต้านทานโรค (PR protein) ซึ่งมีความเป็นพิษสูงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช Bradley และคณะ (1992) รายงานว่ากรดซาลิซิลิกจะกระตุ้นการเชื่อมต่อของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนิน ซึ่งจะส่งผลให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น และทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยระดับของกรดซาลิซิลิกภายในเนื้อเยื่อจะสูงขึ้นเมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ซึ่งมีผลให้พืชต้านทาน

ต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด โดยกรดซาลิซิลิกจะส่งสัญญาณอย่างรวดเร็วไปยังยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อชักนำพืชให้เกิดระบบ SAR หรือ ISR ซึ่งโดยทั่วไป ยีนต้านทานโรค (PR gene) มักแสดงออกโดยผ่านการทำงานของกรดซาลิซิลิก เพื่อผลิตสารประกอบและโปรตีนที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อโรค (Glazebrook, 2005; Yasuda *et al*., 2008)



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในต้นมะนาวหลังการกระตุ้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร เชื้อสด TU-Orga14 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร กรดซาลิ- ซิลิก ความเข้มข้น 2.5 mM สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ชีวภัณฑ์ทางการค้า *Bacillus subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ผงถ่านชีวภาพ อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรกระถางละ 300 มิลลิลิตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

3.6 ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำในแปลงเกษตรขนาดใหญ่

3.6.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ Formula 3 [ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม : โดโลไมต์ (1 : 1), แคลเซียมคาร์บอเนต ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน

ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในแปลงเกษตรกรขนาดใหญ่ พบว่าผลการวิเคราะห์อัตราการเกิดโรคแคงเกอร์ 7 วันหลังปลูกเชื้อพบว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุดในทุกตัวชี้วัดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งกันและกัน และทัดเทียมกับการใช้เชื้อสด TU-Orga13 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) โดย Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน ปรากฏจำนวนแผลแคงเกอร์หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ด้วยวิธีการฉีดเชื้อโรค (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml) เข้าที่ใบ อัตรา 0.5 มิลลิลิตร/ใบ เท่ากับ 5.33, 5.67, 6.00 และ 7.00 แผล ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาความกว้างของบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล (halo) ที่ปรากฏ พบว่า Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน มีความกว้างของบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลต่ำที่สุด เท่ากับ 0.53, 0.56, 0.57 และ 0.59 เซนติเมตร ตามลำดับ ทัดเทียมกับการใช้เชื้อสด TU-Orga13 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคบนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ 7 วัน พบว่า Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนประชากรเชื้อสาเหตุโรคได้ทัดเทียมกัน 1.12-1.28 x 10^8 cfu/g น้ำหนักสดพืช ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (ตารางที่ 5) ถึงอย่างไรก็ตามในเดือนที่ 12 ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีแนวโน้มลดลดได้ เนื่องจากระยะเวลาในการเก็บที่ผ่านไปทำให้แบคทีเรียบางส่วนสูญเสียความมีชีวิต เนื่องจากประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้าง endospore (Fan *et al*., 2017) สอดคล้องกับ กฤติเดช และดุสิต (2559) ที่ศึกษาความมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* TU-Orga1จากการผสมสารพา kaolin : potassium humate : glucose : $FeSO_4$ สามารถเก็บรักษาชีวภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้อง (28-33 °C) นาน 12 และ 24 เดือน เช่นเดียวกับ ณัฏฐิมา และคณะ (2557) รายงานผลการศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตรอดของ BS-DOA 24 ได้เป็นเวลา 12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง

3.6.2 ผลการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในต้นมะนาวหลังการกระตุ้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรใหม่ในแปลงเกษตรขนาดใหญ่ พบว่า Formula 3 อายุ 1 เดือน มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ต้นมะนาวพันธุ์แป้นรำไพสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นพืชสูงสุดอย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน เท่ากับ 0.654 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดพืช ซึ่งทัดเทียมกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (รูปที่ 2) รองลงมา คือ Formula 3 อายุ 3, 6 และ 12 เดือน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ต้นมะนาวพันธุ์แป้นรำไพสะสมกรดซาลิซิลิกภายในต้นพืชสูงสุดอย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน เช่นเดียวกันเท่ากับ 0.45, 0.44 และ 0.43 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดพืช ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) (รูปที่ 2) โดยการที่มะนาวสะสมกรดซาลิซิลิกสูงสุดในวันที่ 3 นี้ เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ซึ่งมีการปลูกเชื้อในวันเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้น Formula 3 ที่มีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกัน 1, 3, 6 และ 12 เดือน ยังชักนำให้ต้นมะนาวสะสม กรดซาลิซิลิกภายในต้นพืชสูงสุดทัดเทียมกับเชื้อสดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) ตลอดการทดลองอีกด้วย ทั้งนี้การกระตุ้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรใหม่มีผลต่อการสะสมกรดซาลิซิลิก ซึ่ง

ตารางที่ 5 จำนวนแผล ความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล (halo) และปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ 7 วัน ในสภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่[1/]

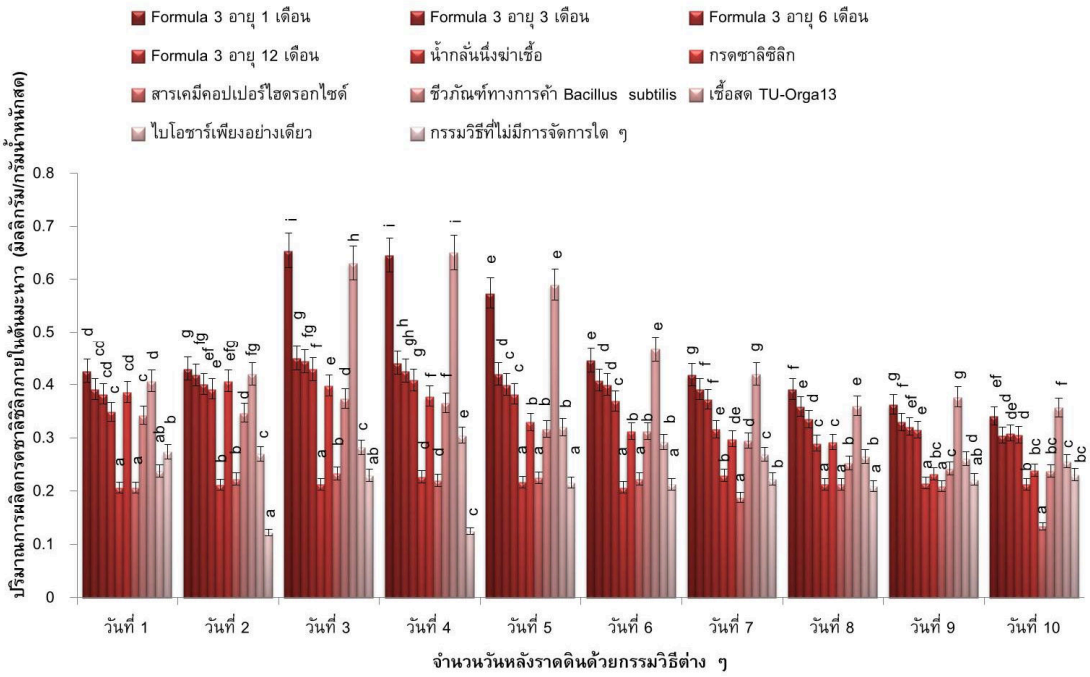
กรรมวิธี[2/]	จำนวนแผล	ความกว้างแผล (ซม.)	ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ (cfu/g น้ำหนักสดพืช)
Formula 3 อายุ 1 เดือน	5.33a	0.53a	1.12×10^{8}a
Formula 3 อายุ 3 เดือน	5.67a	0.56a	1.12×10^{8}a
Formula 3 อายุ 6 เดือน	6.00a	0.57a	1.14×10^{8}a
Formula 3 อายุ 12 เดือน	7.00a	0.59a	1.28×10^{8}ab
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	34.00d	1.43d	1.26×10^{9}d
กรดซาลิซิลิก	14.33b	0.75b	1.98×10^{8}b
สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	17.67c	0.93c	2.92×10^{8} c
ชีวภัณฑ์ทางการค้า *Bacillus subtilis*	15.67bc	0.85c	1.98×10^{8} b
เชื้อสดของแบคทีเรีย TU-Orga13	6.00a	0.57a	1.11×10^{8} a
ไบโอชาร์เพียงอย่างเดียว	32.00d	1.38d	2.12×10^{9}e
กรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ	36.00d	1.45d	1.32×10^{9}d

[1/]อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ DMRT

[2/] Formula 3 หมายถึง สูตรที่ 3 ผงถ่านชีวภาพ, แป้งทัลคัม:โดโลไมต์ (1:1), แคลเซียมคาร์บอเนต, ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/TU-Orga13 10 มิลลิลิตร

เป็นสารในกระบวนการปกป้องตนเองของพืช สอดคล้องกับรายงานของ จริงแท้ (2549) และ Schmid และคณะ (1990) ว่ากรดซาลิซิลิกเป็นโมเลกุลสัญญาณชนิดหนึ่งในพืช ซึ่งชักนำพืชให้เกิดระบบภูมิต้านทานป้องกันตนเอง ผ่านทางการแสดงออกของยีนและการสร้างสารที่เกี่ยวข้องหลังจากที่พืชถูกกระตุ้นด้วยชีวภัณฑ์ (SAR/ISR) สอดคล้องกับ อุไรวรรณ และคณะ (2560) ศึกษาการสะสมกรดซาลิซิลิกในยางพาราหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmi-vora* พบว่าปริมาณกรดซาลิซิลิกในใบยางพารา เริ่มต้นมีค่าต่ำ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivola* โดยปริมาณสูงสุดที่ตรวจพบในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา คือ ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งที่เวลา 48 ชั่วโมง การศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพืชสามารถผลิตกรดซาลิซิลิกเพื่อปกป้องตนเองได้ โดยเฉพาะในระหว่างกระบวนการเกิดโรคพืช (pathogenicity process) เพื่อปกป้องตนเองให้รอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการกระตุ้นภูมิต้านทานพืชด้วยชีวภัณฑ์อารักขาพืชชนิดใหม่ Formula 3 จัดเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับต้นพืช (priming) ให้มีการผลิตกรดซาลิซิลิกกระตุ้นภูมิต้านทานพืชทั้งระบบ (SAR/ISR) ให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวได้

อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งชีวภัณฑ์สูตรใหม่นี้ยังมีอายุการเก็บรักษาได้นาน 12 เดือน โดยที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 2.8×10^{10} cfu/g ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานชีวภัณฑ์ที่กำหนด โดยต้องมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต 10^7 cfu/g ขึ้นไป แสดงให้เห็นศักยภาพของชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่นี้ในการถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีการผลิตสู่ภาคอุตสาหกรรมต่อไป



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในต้นมะนาวหลังการกระตุ้นพืชด้วยชีวภัณฑ์สูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ Formula 3 อายุ 1, 3, 6 และ 12 เดือน อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อสดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (10^{16} cfu/ml) อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร กรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 2.5 mM สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ชีวภัณฑ์ทางการค้า *Bacillus subtilis* อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ผงถ่านชีวภาพ อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรต้นละ 300 มิลลิลิตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการจัดการใด ๆ ในสภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่

3.7 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว ผิวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก เมื่อทดสอบ Gram reaction และ Gram's stain พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญใต้ผิวหน้าอาหารลงมาเล็กน้อยจัดเป็น microaerophilic (Schaad *et al*., 2001) สำหรับผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อน ผลิต endospore และมี endospore อยู่ตรงกลางเซลล์ ใช้ออกซิเจน สามารถย่อยแป้ง ผลิต catalase ผลิตอินโดล (indole) จาก tryptophan ตลอดจนสามารถเคลื่อนที่ในอาหาร

ทดสอบได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาเซลล์ตายอย่างเฉียบพลันบนยาสูบ (HR) หลังการทดสอบ 24-48 ชั่วโมง (Schaad *et al*., 2001) เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10th Ed.) พบว่า TU-Orga13 มีสมบัติคล้ายคลึง *Bacillus subtilis* group (ตารางที่ 6) ทั้งนี้เพื่อให้การจำแนกชนิดมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้นจะยืนยันผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ด้วยเทคนิคด้านโมเลกุล

ตารางที่ 6 สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13

การทดสอบ	ชนิดแบคทีเรีย [1/]			
	TU-Orga13[2/]	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus licheniformis*
1. Gram reaction	Positive	Positive	Positive	Positive
2. Cell morphology	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
3. Endospore production	+	+	+	+
4. Endospore morphology	Central	Central	Central	Central
5. Catalase production	+	+	+	+
6. Oxygen relationship	*A*	*A*	*A*	*F*
7. Motility test	+	+	+	+
8. Urease test	+	+	+	+
9. *Starch hydrolysis*	+	+	+	+
10. Indole production	+	+	+	+

[1/] + = positive reaction; - = negative reaction; A = aerobe และ F = facultative

[2/] แบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว ซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ซึ่งผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ *16S rDNA* ของแบคทีเรียทั่วไป (universal primer) พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *16S rDNA* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 595-bp ตรงตามขนาดที่ได้ออกแบบไว้ และเมื่อแยกสกัดแถบดีเอ็นเอนี้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequence analysis (Macrogen) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 มีความเหมือนกับ *B. subtilis* 100 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 98 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการจำแนกโดยวิธีมาตรฐานและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S rDNA* (Schaad *et al*., 2001) สรุปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 คือ *Bacillus subtilis*

4. สรุป

แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TU-Orga13 และ TU-Orga14 จากดินรอบรากมะนาวอินทรีย์ มี

ศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวได้ 2 แนวทาง ได้แก่ การผลิตสารปฏิชีวนะและ/หรือสารทุติยภูมิยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้โดยตรง (antibiosis) และการชักนำให้ต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิกต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (ISR) เมื่อพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำ จากเชื้อปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นในระดับอุตสาหกรรม พบว่า TU-Orga13 มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรใหม่ Formula 3 [ผงถ่านชีวภาพ, แป้งทัลคัม:โดโลไมต์ (1:1), แคลเซียมคาร์บอเนต, ซีเอ็มซี และน้ำสกัดถั่วเหลือง ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga13 (ความเข้มข้นเชื้อ 10^{16} cfu/ml) อัตราสูตรชีวภัณฑ์ 500 กรัม/ TU-Orga13 10 มิลลิลิตร] โดยสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีชีวิตของ TU-Orga13 เท่ากับ 2.8 x 10^{16} cfu/g หลังกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และชีวภัณฑ์สูตรใหม่นี้สามารถเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องได้นาน 12 เดือน ซึ่งพบเซลล์ที่มีชีวิตของ TU-Orga13 เท่ากับ 2.8 x 10^{10} cfu/g เมื่อนำชีวภัณฑ์สูตรนี้ราดดินที่ใช้ปลูกต้นมะนาว อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร/ต้น จะทำให้ต้นมะนาวผลิตกรดซาลิซิลิกต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ดีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (P=0.05) และหลังจำแนกเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga13 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และระดับโมเลกุลด้วยวิธีมาตรฐาน พบว่า TU-Orga13 มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus subtilis* ทั้งในระดับสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นว่า ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ชนิดผงผสมน้ำที่มี *B.subtilis* TU-Orga13 เป็นแบคทีเรียออกฤทธิ์ ซึ่งผลิตในระดับอุตสาหกรรมและเป็นผลิตผลจากการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ราดดินที่ใช้ปลูกต้นมะนาวด้วยอัตราการใช้ 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร เพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ในสภาพแปลงเกษตรขนาดใหญ่ และสามารถขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการค้าและการตลาดต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2559 สป1/2559 และขอขอบคุณ บริษัท ใบธง จำกัด และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการสนับสนุนเครื่องมือและเครื่องจักรระดับอุตสาหกรรมในการวิจัยครั้งนี้

6. รายการอ้างอิง

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินุวัฒน์, 2559, การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24(5): 795-812.

จริงแท้ ศิริพานิช, 2549, สรีระวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง, 2552, การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว, ว.เคหการเกษตร 33(7): 109-110.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2550, ศักยภาพในการผลิตแบคทีเรียไอเอสอาร์ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ในรูปสูตรผง, น. 81-90, การประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 8, พิษณุโลก.

ชูศักดิ์ จอมพุก, 2551, สถิติการวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชไร่, ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม, 319 น.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญผล, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทิพวรรณ กันหาญาติ และรุ่งนภา ทองเคร็ง,

2557, การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*, ว.วิชาการเกษตร 32(3): 234-251.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญผล, 2550, ชีววิทยาและการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นลินี ศิวากรณ์, รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และวสันต์ ผ่องสมบูรณ์, 2553, การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ, น. 2614-2629, กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยและการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.

นลินี ศิวากรณ์, พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และวสันต์ ผ่องสมบูรณ์, 2556, ศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาว, น.429-436, รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พงศธร ปรโลกานนท์, 2560, การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์จากถ่านชีวภาพเพื่อกระตุ้นภูมิต้านทานมะนาวอินทรีย์ต่อต้านโรคแคงเกอร์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

สุรัสวดี พรหมอยู่, 2555, บทบาทของกรดซาลิไซลิกต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลพืชสวน, ว.เกษตรพระจอมเกล้า 30(3): 95-102.

อมรรัตน์ กุสลางกูรวัฒน์, ปัฐวิภา สงกุมาร, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และอำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์, 2560, ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์พืชตระกูลส้มและการควบคุมโรคด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์, น. 54-65, การประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 13, ตรัง.

อุไรวรรณ ขุนจันทร์, เขมมิการ์ โขมพัตร, กิติยา เอกเชวง และนันทา เชิงเชาว์, 2560, การชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส การสะสมของกรดซาลิไซลิกและสคอพอลิตินในยางพาราหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora*, ว.วิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 9(1): 1-13.

Alcamo, E.I., 2001, Fundamentals of Microbiology, 6th Ed., Jones and Bartlett Publishers Inc., United State of America.

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C., 1998, Reactive oxygen intermediates a systemic signal network, Plant Immunity Cell 92: 773-784.

Amalraj, D., Venkateswarlu, B., Desai, S., Kumar, P. and Ahmed, M.S., 2013, Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants, J. Plant Physiol. Pathol. 1(2): 1-5.

Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J., 1992, Elicitor and wound-induced oxidative crosslinking of a protein-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response, Cell 70: 21-30.

Civerolo, E., 1984, Bacterial canker disease of citrus, J. Rio Grande Valley Hort. 37: 127-146.

Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H. and Dong, X., 2000, Roles of salicylic acid, jasmonic

acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*, The Plant Cell 12: 2175-2190.

Das, R., Mondal, B., Mondal, P., Khatua, D.C. and Mukherjee, N., 2014, Biological management of citrus canker on acid lime through *Bacillus subtilis* (S-12) in West Bengal, India, J. Biopest. 7(supp): 38-41.

EPPO/CABI, 2005, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, In Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R. and M. Holderness, Quarantine Pests for Europe, 2nd Ed., CABI International, Wallingford.

Fan, H., Ru, J., Zhang, Y. and YanLi, Q.W., 2017, Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease, Microbiol. Res. 199: 89-97.

Glazebrook, J., 2005, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, Ann. Rev. Phytopathol. 43: 205-227.

Gottwald, T.R., Hughes, G., Graham, J.H., Sun, X. and Riley, T., 2001, The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species, Phytopathology 91: 30-34.

Huang, T.P., Tzeng, D.D.S., Wong, A.C.L., Chen, C.H. and Lu, K.M., 2012, DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllo-sphere biofilms, PLoS ONE 7(7): 1-11.

Kalita, P.L., Bora, C. and Bhagabati, K.N., 1996, *Phylloplane microflora* of citrus and their role in management of citrus canker, Ind. Phytopathol. 49: 234-237.

Me´traux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Pahari, A., Pradhan, A., Maity, S. and Mishra, B.B., 2005, Carrier based formulation of plant growth promoting *Bacillus* species and their effect on different crop plants, World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 941-945.

Pahari, A., Pradhan, A., Maity, S. and Mishra, B.B., 2017, Carrier based formulation of plant growth promoting *Bacillus* species and their effect on different crop plants, Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 6: 379-385.

Peng, L.P. and Mustafa, M., 2003, Production of non-volatile antifungal from *Bacillus subtilis* on selected solid medium, Available Source: http://www.fsas.upm-edu.my/~muska/Thesis%20AH%20 Peng.pdf, October 26, 2017.

Schaad, N.W., Jones, J.B. and Lacy, G.H., 2001, Gram-negative bacteria: *Xanthomonas*, In Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (Eds.), Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed., Saint Paul, Minnesota.

Schaad, R., 1988, Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, The American Phytopathological Society (APS), APS Press, Minnesota.

Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B., 1990, Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber, Science 250: 1004-1006.

Tatyane, S., Valdman, E., Valdman, B. and Selma, G.F.L., 2007, Salicylic acid degradation

from aqueous solution using *Pseudomonas fluorescens* HK44: Parameter study and application tools, Braz. J. Microbiol. 38: 39-44.

Wang, Y. and Li, J.H., 2012, Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck), J. Plant Physiol. 169: 1143-1149.

Xu, Y.H., Liao, Y.C., Zhang, Z., Liu, J., Sun, P.W., Gao, Z.H., Sui, C. and Wei, J.H., 2016, Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesqui-terpene formation in *Aquilaria ainensis*, Sci. Rep. 6: 21843.

Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S. and Nakashita, H., 2008, Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*, Plant Cell 20: 1678-1692.

Zhang, J.X., Gu, Y.B., Chi, F.M., Ji, Z.R., Wu, J.Y., Dong, Q.l. and Zhou, Z.S., 2015, *Bacillus amyloliquefaciens* GB1 can effectively control apple Valsa canker, Biol. Control 88: 1-7.