

ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* สูตรผงและสูตรน้ำ ในการผลิตผักกาดฮ่องเต้

Effect of *Bacillus subtilis* Dry and Liquid Formulas Application on Pak Chai Production

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินววัฒน์*

สาขาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Krittidet Anan and Dusit Athinuwat*

Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สูตรผงคาโอรินและสูตรน้ำกากถั่วเหลืองสำหรับเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 ได้พัฒนาขึ้นเพื่อประเมินประสิทธิภาพสำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองและใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) และรา *Alternaria* sp. ตามลำดับ สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง Xcc และ *Alternaria* sp. โดยแสดงบริเวณยับยั้ง 5.0-5.1 มิลลิเมตร และ 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ที่แสดงบริเวณยับยั้ง Xcc เท่ากับ 3.5 มิลลิเมตร และแมนโคเซ็บที่แสดงการยับยั้ง *Alternaria* sp. เท่ากับ 61.1 เปอร์เซ็นต์ การคลุกเมล็ดและพ่นใบด้วยสูตรผงหรือสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ($>10^8$ cfu/ml) เมื่อผักกาดฮ่องเต้อายุ 29 วัน ส่งผลให้มีการสะสม indole-3-acetic acid (IAA) ภายในลำต้น 11.2-12.3 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมน้ำหนักสด และส่งเสริมให้ต้นกล้าอายุ 14 วัน มีความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง 11.8-12.1 เซนติเมตร 3.7-3.8 เซนติเมตร 13.7-14.0 กรัม และ 3.2-3.5 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับการใช้สารเคมี ที่มีความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 9.1 เซนติเมตร 2.9 เซนติเมตร 8.5 กรัม และ 2.3 กรัม ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ยังสามารถชักนำให้เกิดการสะสม salicylic acid (SA) สูงสุด 0.72 และ 0.85 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ภายใน 1 วัน หลังปลูกเชื้อโรค เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของ Xcc และ *Alternaria* sp. ตามลำดับ การทดสอบภาคสนามโดยการพ่นใบด้วยสูตรผงหรือสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 6 ครั้ง ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร พร้อมใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ด 15 กิโลกรัม เพื่อควบคุมโรคที่ระบาดในสภาพธรรมชาติ พบว่าทั้ง 2 สูตร สามารถลดการเข้าทำลายของ Xcc ตลอดจนลดความเสียหายจากด้วงหมัดกระโดดและหนอนใยผักได้ ทำให้ผักกาดฮ่องเต้ผลผลิตสูงทัดเทียมกับกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร

คำสำคัญ : เกษตรอินทรีย์; แบคทีเรียปฏิปักษ์; โรคขอบใบทอง; การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี; การลดต้นทุนการผลิต

Abstract

Kaolin based formula and soybean meal based liquid formula were developed with *Bacillus subtilis* TU-Orga1, the biocontrol agent and evaluated on enhance growth of pak chai and control black rot and leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *Alternaria* sp., respectively. TU-Orga1 formulas showed significantly inhibitions of Xcc and *Alternaria* sp. with 5.0-5.1 mm clear zone and 80.0-83.3 %, respectively where copper hydroxide and mancozeb showed 3.5 mm clear zone and 61.1 % of Xcc and *Alternaria* sp. suppression, respectively. Seed treated and foliar sprayed at 29 day old plants with TU-Orga1 formulas ($>10^8$ cfu/ml) increased highest indole-3-acetic acid (IAA) accumulation in pak chai with 11.2-12.3 µg/mg fresh weight and promoted significantly seedling growth (14-day old) with increased shoot height, root length, fresh weight and dry weight by 11.8-12.1 cm, 3.7-3.8 cm, 13.7-14.0 g and 3.2-3.5 g, respectively whereas chemical control showed shoot height, root length, fresh weight and dry weight by 9.1 cm, 2.9 cm, 8.5 g and 2.3 g, respectively. Moreover, TU-Orga1 formulas induced salicylic acid (SA) accumulation within 1 day after challenge inoculation with 0.72 and 0.85 mg/g fresh weight against Xcc and *Alternaria* sp. infections, respectively. Field experiment with 6-foliar spray intervals of TU-Orga1 mixed with liquid fertilizer swine manure fermentation and added 15 kg of chicken manure fertilizer pellets was conducted against naturally-occurred diseases. The two bio-formulations significantly reduced Xcc pathogen colonization and decreased flea beetle and diamondback moth damaged on pak chai and exhibited the greatest yield compared to conventional treatment.

Keywords: organic farming; antagonistic bacteria; black rot; plant diseases biocontrol; cost reduction

1. บทนำ

ผักกาดฮ่องเต้ (*Brassica chinensis* var. *chinensis*) เป็นผักที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานเนื่องจากมีรสชาติหวาน และกรอบ มีวิตามินสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินเอและวิตามินซี นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารพวกแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูง นิยมนำมาผัดกับเนื้อสัตว์ ผัดน้ำมันหอย หรือต้มเป็นแกงจืด ซึ่งในระบบการปลูกผักกาดฮ่องเต้ มักถูกรบกวนจากศัตรูพืชหลายชนิดตั้งแต่ระยะกล้าจนกระทั่งถึงระยะ

เก็บเกี่ยวผลผลิต ตัวอย่าง เช่น โรคใบจุดที่เกิดจากรา *Alternaria* spp. และ *Cercospora* spp. โรคขอบใบทองที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* และโรคเน่าและที่เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ส่วนแมลงศัตรูที่สำคัญ ได้แก่ ตัวงมหัวผัก หนอนใยผัก เพลี้ยอ่อน และหนอนกระทู้ผัก เป็นต้น [22] ใน การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูเหล่านี้เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีซึ่งมีข้อจำกัดในการใช้บางประการ

ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการควบคุมศัตรูพืช เช่น ความรู้ในการใช้ อัตราการใช้ และเวลาที่ใช้ เป็นต้น ส่งผลให้ผู้ปลูกต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไปจนจำเป็น ทำให้ศัตรูพืชดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช รวมทั้งผู้บริโภคในปัจจุบันตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีทางการเกษตรตกค้างในสิ่งแวดล้อม เกษตรกรรมทางเลือกจึงมีบทบาทสำคัญในวิถีการปลูกพืชผักสดสำหรับตอบสนองผู้บริโภคในปัจจุบัน การศึกษาวิจัยสิ่งทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชสำหรับเกษตรทางเลือกจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องศึกษาอย่างเร่งด่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตและการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สำหรับใช้ภายในฟาร์มด้วยตัวเกษตรกรเอง ซึ่งที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยคัดเลือกใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 จากดินบริเวณรากข้าวที่มีสมบัติในการควบคุมโรคใบขีดโปร่งแสง ขอบใบแห้ง และโรคเมล็ดด่างของข้าว ผ่านการกระตุ้นให้ข้าวผลิตสารต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ salicylic acid, β -1,3-glucanase, peroxidase, phenolics, guaicol และ peroxidase [19, 20] รวมทั้งมีกลไกการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ [21] แต่ยังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ที่ผ่านการพัฒนาให้อยู่ในรูปสูตรผงและสูตรน้ำในระบบการผลิตผักกาดฮ่องเต้ หากสูตรผงหรือสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สามารถลดการระบาดของศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่เข้าทำลายผักกาดฮ่องเต้ในสภาพธรรมชาติเช่นเดียวกับผลการศึกษาวิจัยในพืชอื่น ๆ ที่ผ่านมา อาจทำให้ลดปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินความจำเป็นได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบทอง

ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทอง ด้วยวิธี agar diffusion โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ได้แก่ (1) เชื้อสด TU-Orga1 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร (2) สูตรผงเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (3) สูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร (4) สารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (5) สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และ (6) น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยนำเชื้อ Xcc ที่ปรับความเข้มข้นประมาณ 10^9 cfu/มิลลิลิตร มาผสมในอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ที่หลอมละลายและวางทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-55 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย : NGA เท่ากับ 1:20 [24] เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รองหน้าอาหารแข็ง แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหาร NGA ที่เตรียมไว้ จานละ 6 หลุม โดยให้ขอบด้านหนึ่งของหลุมห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วใช้ micropipette ดูดสิ่งทดลองดังรายละเอียดในกรรมวิธี 1-6 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ บ่มในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผล โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการยับยั้งราสาเหตุ

โรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย

ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ด้วยวิธี poisoned food technique โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ได้แก่ (1) เชื้อสด TU-Orga1 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร (2) สูตรผงเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (3) สูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร (4) สารเคมีแมนโคเซ็บ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และ (5) น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วผสมสิ่งทดลองต่าง ๆ ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการดังรายละเอียดกล่าวไว้ในกรรมวิธี 1-5 จากนั้นเทอาหารที่ผสมสิ่งทดลองลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากผิวหน้าของอาหารที่ผสมสิ่งทดลองต่าง ๆ แห้งสนิท ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหาร PDA ที่มีรา *Alternaria* sp. เจริญอยู่ ย้ายมาวางบนกึ่งกลางจานอาหารที่ผสมสิ่งทดลองต่าง ๆ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราในทุกกรรมวิธีเมื่อราในกรรมวิธีที่ 5 (กรรมวิธีควบคุม PDA ปกติที่ผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใย} = 100 - (r^2/R^2 \times 100)$$

โดยที่ r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราใน PDA ผสมสิ่งทดลองในกรรมวิธีทดสอบ) และ R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราใน PDA (กรรมวิธีควบคุม) [18] วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการ

เจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียในเรือนปลูกพืชทดลอง

2.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรค

ทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ที่ผลิตขึ้นเอง 2 สูตร ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียในเรือนปลูกพืชทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 6×2 factorial กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัยคือ ปัจจัย A มี 6 กรรมวิธี ได้แก่ (1) เชื้อสด TU-Orga1 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร (2) สูตรผงเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (3) สูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร (4) สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หรือแมนโคเซ็บ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (5) สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM และ (6) น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปัจจัย B มี 2 เชื้อโรคเป้าหมาย ได้แก่ เชื้อ *Xcc* และ *Alternaria* sp. ทุกกรรมวิธีคลุกเมล็ดด้วยสิ่งทดลองต่าง ๆ ตามกรรมวิธี 1-6 ความเข้มข้นที่แสดงไว้ข้างต้น อัตราเมล็ดพันธุ์ : สิ่งทดลองต่าง ๆ ที่ใช้คลุกเมล็ด เท่ากับ 1 กิโลกรัม : 50 มิลลิลิตร ผึ่งไว้ให้หมาด จึงนำไปปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว บรรจุดิน 2 กิโลกรัม กระถางละ 5 เมล็ด ทุกกระถางหลังหว่านเมล็ดผักกาดฮ่องเต้จะคลุมด้วยฟางข้าวเพื่อป้องกันนกจิกกินเมล็ดพืชและรักษาความชุ่มชื้นของดิน รดน้ำวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น รวมทั้งมีการกำจัดวัชพืชโดยการถอนด้วยมือ เมื่อผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 และ 28 วัน วัดข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของผักกาดฮ่องเต้แต่ละต้น และเมื่อผักกาดฮ่องเต้อายุ 29 วัน ทำการพ่นต้นพืชด้วยสิ่ง

ทดลองต่าง ๆ ตามกรรมวิธี 1-6 ความเข้มข้นที่แสดงไว้ข้างต้น อัตราต้นละ 20 มิลลิลิตร และเมื่อผักกาดฮ่องเต้อายุ 30 วัน ปลุกเชื้อ Xcc สาเหตุโรคขอบใบทองหรือ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ด้วยวิธีการพ่นใบด้วยเซลล์หรือสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร หรือ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ อัตราต้นละ 20 มิลลิลิตร และคลุมถุงเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความรุนแรงของโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ใบทั้งหมด หลังปลุกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน [26] วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.3.2 วิเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) ภายในผักกาดฮ่องเต้

เก็บใบผักกาดฮ่องเต้ 0.1 กรัม จากแต่ละกรรมวิธีในข้อ 2.3.1 อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน เริ่มตั้งแต่ผักกาดฮ่องเต้อายุ 28-34 วัน จากนั้นบดใน homogenization buffer [Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7, KCl ความเข้มข้น 0.1 M, PMSF ความเข้มข้น 1 mM, leupeptin ความเข้มข้น 1 µg/ml, 1 % (v/v) Triton X-100 ความเข้มข้น 1 %, PVPP ความเข้มข้น 3 % (w/v)] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำ homogenate ที่สกัดได้จากผักกาดฮ่องเต้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 535 nm (spectrophotometer รุ่น EC1011) โดยใช้หลักการความเข้มของสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร indole-3-acetic acid กับกรด sulfuric (colorimeter) คำนวณปริมาณสาร indole-3-acetic acid เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [13] วิเคราะห์ความ

แปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.3.3 วิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) ภายในผักกาดฮ่องเต้

นำสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากผักกาดฮ่องเต้ในแต่ละกรรมวิธี 1 – 6 ในข้อ 3.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำ 0.02 M ferric ammonium sulfate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มไว้สภาวะอุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น CE1011 ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยแสดงค่าเป็น มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด [14] เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามสมการ คือ $Y = 0.114X + 0.049$ โดย Y = ปริมาณการสะสมของ SA และ X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองในแปลงปลูกของเกษตรกร

2.4.1 การวางแผนการทดลองและเตรียมพื้นที่ปลูก

ทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ที่ผลิตขึ้นเอง 2 สูตรในแปลงปลูกผักกาดฮ่องเต้ของเกษตรกร อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี คือ (1) การปฏิบัติดั้งเดิมของเกษตรกรคือ การพ่นน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองจากมะละกอสุกและเศษผัก (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 15 กิโลกรัม /แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง

ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน (2) การพ่นสูตรผงเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน (3) การพ่นสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน และ (4) การพ่นสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน ทุกกรรมวิธีถูกวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสุ่มบูรณ์ (randomized complete block design, RCB) แบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 4x6 เมตร กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จำนวน 16 แปลง โดยเกลี่ยดินให้ทุกแปลงย่อยมีความสม่ำเสมอ [16] คลุมแปลงปลูกด้วยฟางข้าวเพื่อป้องกันนกจิกกินเมล็ดพืชและรักษาความชุ่มชื้นของแปลงปลูก รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น และกำจัดวัชพืชโดยการถอนด้วยมือและการถอนด้วยจอบ

2.4.2 การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิต

เก็บข้อมูลด้านการเจริญเติบโตจากผักกาดฮ่องเต้ 20 ต้น/แปลง ได้แก่ ความสูงต้น น้ำหนักเฉลี่ย/ต้น ปริมาณผลผลิตก่อนตัดแต่งและหลังตัดแต่ง รวมทั้งสำรวจปริมาณศัตรูพืชทุก 7 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว โดยสุ่มเก็บข้อมูลการระบาดของโรคพืชในสภาพธรรมชาติและความรุนแรงโรค รวมทั้ง

ปริมาณการระบาดของแมลงศัตรูพืช โดยการนับด้วยตาเปล่าภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 1 ตารางเมตร ทั้งหมด 5 จุด/แปลงย่อย [27] ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแต่ละชนิดที่สำรวจพบ จะคำนวณจากสมการ $\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่พบโรคระบาด}}{\text{จำนวนต้นที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$

สำหรับความรุนแรงโรค คำนวณจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ใบทั้งหมด [26] ของผักกาดฮ่องเต้ทุกต้นที่แสดงอาการโรคภายในกรอบไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1 ตารางเมตร และปริมาณการระบาดของแมลงศัตรูพืช (insect population) คำนวณจากค่าเฉลี่ยจำนวนแมลงศัตรูพืชแต่ละชนิดที่สำรวจพบต่อต้นพืช [27] วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.5 การยืนยันเชื้อสาเหตุโรค

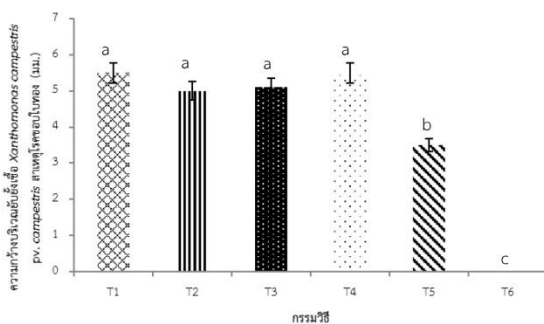
นำตัวอย่างผักกาดฮ่องเต้ที่เป็นโรค (ขอบใบทอง) จากแปลงทดลองในสภาพไร่ของเกษตรกรมายืนยันเชื้อสาเหตุโรคด้วยการทดสอบโรค (Koch's postulation) และวิธีทางโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ XCF และ XCR ซึ่งขึ้นต้นเอ็นเอเป้าหมายมีขนาด 525 bp และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing analysis นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST [10]

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคขอบใบทอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทอง เปรียบ

เทียบกับเชื้อสด TU-Orga1 สารปฏิชีวนะ kanamycin สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธี agar diffusion พบว่า ทั้งสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ Xcc ได้ดีทัดเทียมกับเชื้อสด TU-Orga1 และสารปฏิชีวนะ kanamycin และดีกว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์อย่างแตกต่างทางสถิติ ($p=0.05$) โดยสูตรผง สูตรน้ำ และเชื้อสดของ TU-Orga1 และสารปฏิชีวนะ แสดงบริเวณยับยั้ง 5.0, 5.1, 5.5 และ 5.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์แสดงบริเวณยับยั้ง 3.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 1)

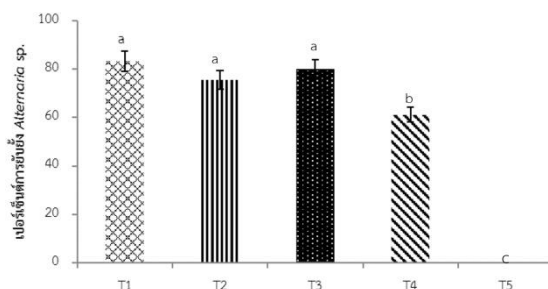


รูปที่ 1 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคขอบใบทองของผักกาดฮ่องเต้ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี agar diffusion ซึ่ง T1 คือ เชื้อสด *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, T5 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) และ T6 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU - Orga1 ในการยับยั้งเชื้อ

สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียเปรียบเทียบกับเชื้อสด TU-Orga1 สารเคมีแมนโคเซ็บและน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธี poisoned food technique พบว่าทั้งสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Alternaria* sp. ได้ดีทัดเทียมกับเชื้อสด TU-Orga1 และดีกว่าสารเคมีแมนโคเซ็บอย่างแตกต่างทางสถิติ โดยสูตรผง สูตรน้ำ และเชื้อสดของ TU-Orga1 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้ง 75.6, 80.0 และ 83.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารเคมีแมนโคเซ็บแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเพียง 61.1 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักกาดฮ่องเต้ ซึ่งทดสอบโดยวิธี poisoned food ซึ่ง T1 คือ เชื้อสด *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (1×10^8 cfu/มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ แมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) และ T5 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

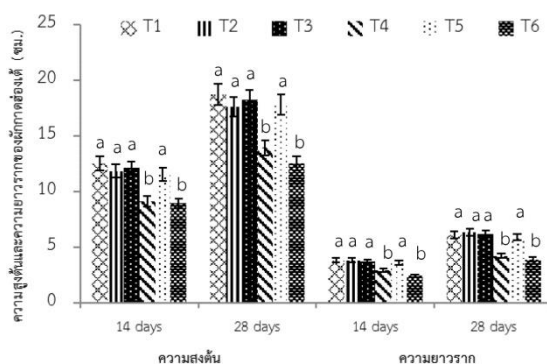
3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการ

เจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียในเรือนปลูกพืชทดลอง

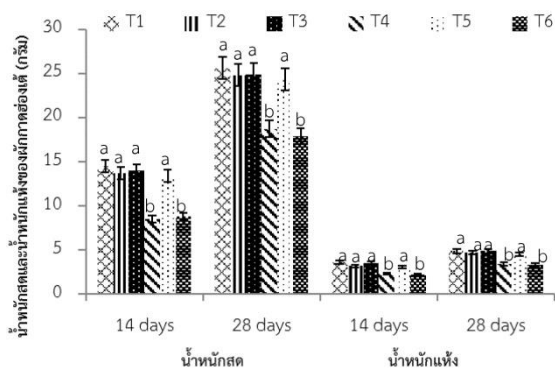
3.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองพบว่าสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้ได้ดีทัดเทียมกับเชื้อสด TU-Orga1 และสารสังเคราะห์ salicylic acid (SA) โดยส่งเสริมให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน มีความสูงต้น 11.8, 12.1, 12.5 และ 11.5 เซนติเมตร ตามลำดับ อายุ 28 วัน มีความสูงต้น 17.6, 18.2, 18.7 และ 17.8 เซนติเมตร ตามลำดับ และส่งเสริมให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน มีรากยาว 3.8, 3.7, 3.8 และ 3.6 เซนติเมตร ตามลำดับ อายุ 28 วัน มีความยาวราก 6.3, 6.2, 6.1 และ 5.9 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์หรือแมนโคเซ็บ ส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 และ 28 วัน มีความสูงต้น 9.1 และ 13.9 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีความยาวราก 2.9 และ 4.2 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 และ 28 วัน มีความสูงต้น 8.9 และ 12.5 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีความยาวราก 2.4 และ 3.9 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 3) เมื่อพิจารณาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งพบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญของลำต้นและราก คือ สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับเชื้อสด TU-Orga1 และสารสังเคราะห์ SA โดยส่งเสริมให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน มีน้ำหนักสด 13.7, 14.0, 14.5 และ 13.4 เซนติเมตร ตามลำดับ อายุ 28 วัน ความสูงต้น 24.8, 24.9, 25.6

และ 24.3 เซนติเมตร ตามลำดับ และส่งเสริมให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน มีน้ำหนักแห้ง 3.2, 3.5, 3.6 และ 3.1 เซนติเมตร ตามลำดับ อายุ 28 วัน มีน้ำหนักแห้ง 4.7, 4.9, 4.9 และ 4.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์หรือแมนโคเซ็บ ซึ่งส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 และ 28 วัน มีน้ำหนักสด 8.5 และ 18.7 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำหนักแห้ง 2.3 และ 3.4 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 และ 28 วัน มีน้ำหนักสด 8.8 และ 17.9 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีน้ำหนักแห้ง 2.2 และ 3.3 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4)



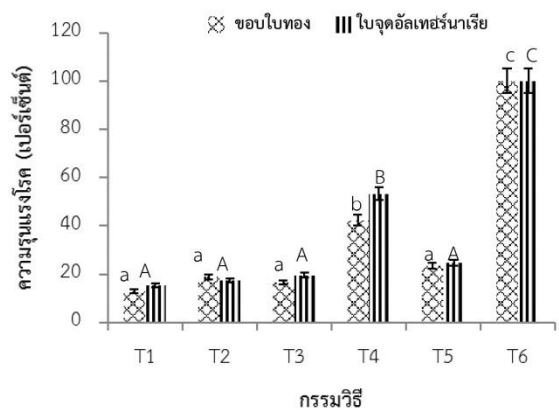
รูปที่ 3 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูงต้นและความยาวรากของผักกาดฮ่องเต้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) หรือแมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ



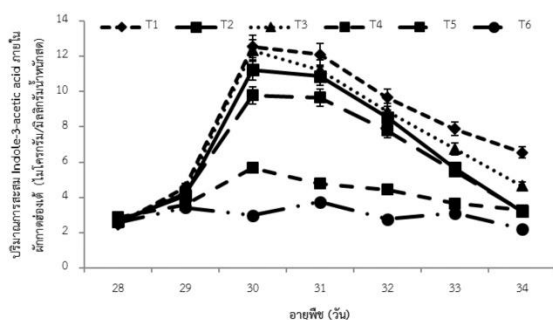
รูปที่ 4 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของผักกาดฮ่องเต้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) หรือแมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเป้าหมาย 2 โรค ได้แก่ ขอบใบทองและใบจุดอัลเทอร์นาเรีย พบว่าสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเป้าหมายทั้ง 2 โรค ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ดีทัดเทียมกับสารสังเคราะห์ SA และดีกว่าแตกต่างทางสถิติกับสารเคมี โดยประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบทองพบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้สูตรผง สูตรน้ำ เชื้อสด TU-Orga1 สารสังเคราะห์ SA และสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์

(กรรมวิธีที่ 2, 3, 1, 5 และ 4) ส่งผลให้พบความรุนแรงโรค 18.8, 16.5, 12.9, 23.6 และ 42.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย พบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้สูตรผง สูตรน้ำ เชื้อสด TU-Orga1 และสารเคมีแมนโคเซ็บ (กรรมวิธีที่ 2, 3, 1, 5 และ 4) ส่งผลให้พบความรุนแรงโรค 17.4, 19.6, 15.2, 24.7 และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักกาดฮ่องเต้ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) หรือแมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



รูปที่ 6 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม indole-3-acetic acid ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^{10} cfu/มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) หรือแมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

3.3.2 ผลการวิเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) ภายในผักกาดฮ่องเต้

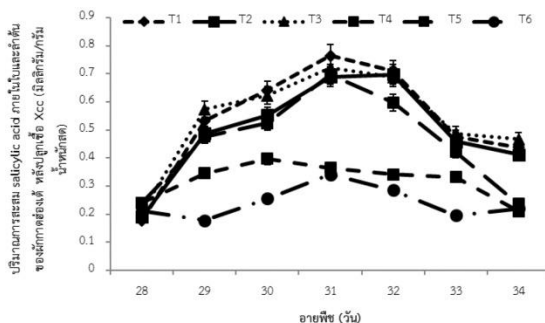
ผลการวิเคราะห์ IAA ในผักกาดฮ่องเต้ในแต่ละกรรมวิธีต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ระหว่างวันที่พืชอายุ 28 – 34 วัน พบว่าสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม IAA ซึ่งเป็นกลุ่มฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตพืชได้ดีทัดเทียมสารสังเคราะห์ SA และดีกว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์หรือแมนโคเซ็บและน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้ออย่างแตกต่างทางสถิติ โดยสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1

กระตุ้นให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม IAA สูงสุดภายใน 1 วัน หลังพ่นใบพืช (วันที่พืชอายุ 30 วัน) เท่ากับ 11.2, 12.3 และ 12.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรน้ำหนักสด ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์ SA สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์หรือแมนโคเซ็บ และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้มีปริมาณ IAA เท่ากับ 9.8, 5.7 และ 3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 6) นอกจากนี้ สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 ยังส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม IAA สูงกว่ากรรมวิธีการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์หรือแมนโคเซ็บและน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้ออย่างแตกต่างทางสถิติตลอดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวไว้ในผลการทดลองข้อ 3.1 และ รูปที่ 3 และ 4

3.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) ในผักกาดฮ่องเต้

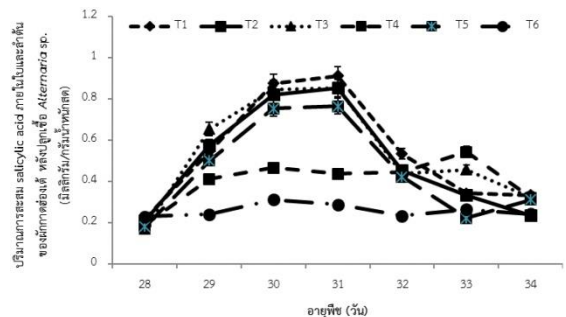
ผลการวิเคราะห์ SA ในผักกาดฮ่องเต้ในแต่ละกรรมวิธีต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ระหว่างวันที่พืชอายุ 28-34 วัน พบว่าสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในระบบภูมิคุ้มกันของพืชได้ดีทัดเทียมสารสังเคราะห์ SA และดีกว่าสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้ออย่างแตกต่างทางสถิติ โดยสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 กระตุ้นให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA สูงสุดภายใน 1 ชั่วโมง หลังพ่นใบพืช (วันที่พืชอายุ 29 วัน พ่นใบพืชด้วยสิ่งทดสอบต่าง ๆ) เท่ากับ 0.49, 0.57 และ 0.53 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์ SA สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้มีปริมาณ SA สะสมในผักกาดฮ่องเต้เท่ากับ 0.48, 0.36 และ 0.18 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 7) นอกจากนี้สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 ยังส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA

ได้ดีทัดเทียมกับสารสังเคราะห์ SA แต่สูงกว่ากรรมวิธีการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออย่างแตกต่างทางสถิติ ภายใน 1 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อ Xcc สาเหตุโรคขอบใบทอง เท่ากับ 0.56, 0.62 และ 0.64 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์ SA สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้มีปริมาณ SA สะสมในผักกาดฮ่องเต้เท่ากับ 0.52, 0.4 และ 0.26 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 ยัง



รูปที่ 7 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม salicylic acid และต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทอง ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^8 cfu/มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

กระตุ้นให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA สูงสุดภายใน 1 วัน หลังปลูกเชื้อ Xcc เท่ากับ 0.69, 0.72 และ 0.77 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ และ SA ภายในผักกาดฮ่องเต้จะลดลงอย่างรวดเร็วในวันต่อมาตลอดการทดลอง ส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบทองได้ทันสถานการณ์ (รูปที่ 5 และ 7)



รูปที่ 8 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม salicylic acid และต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดย T1 คือ เชื้อสด TU-Orga1 (1×10^8 cfu/มิลลิลิตร), T2 คือ สูตรผงของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T3 คือ สูตรน้ำของ TU-Orga1 (อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร), T4 คือ แมนโคเซ็บ (อัตราการใช้ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร), T5 คือ สารสังเคราะห์ salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ T6 คือ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้ สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 ยังมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดี

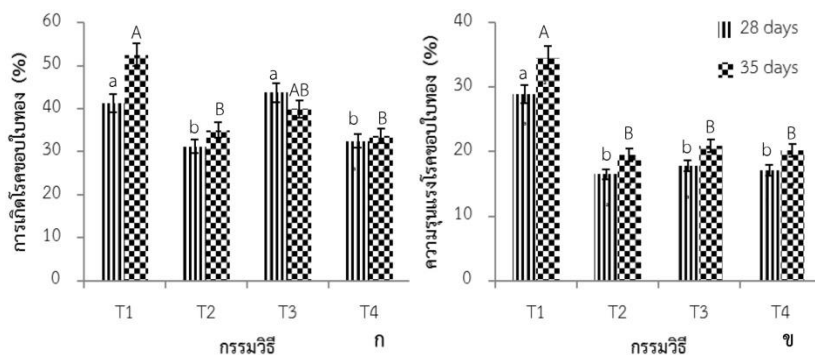
หัดเทียบกับสารสังเคราะห์ SA และดีกว่าสารเคมีแมนโคเซ็บและน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้ออย่างแตกต่างทางสถิติ ภายใน 1 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย เท่ากับ 0.82, 0.85 และ 0.88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์ SA สารเคมีแมนโคเซ็บ และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ส่งผลให้มีปริมาณ SA สะสมในผักกาดฮ่องเต้ เท่ากับ 0.75, 0.47 และ 0.31 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น สูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 และเชื้อสด TU-Orga1 ยังกระตุ้นให้ผักกาดฮ่องเต้สะสม SA สูงสุดภายใน 1 วัน หลังปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. เท่ากับ 0.85, 0.85 และ 0.91 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และ SA ภายในผักกาดฮ่องเต้จะลดลงอย่างรวดเร็วในวันต่อมาตลอดการทดลอง ส่งผลให้ผักกาดฮ่องเต้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียได้ทันสถานการณ์ (รูปที่ 5 และ 8)

3.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผงและสูตรน้ำเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทองในแปลงปลูกของเกษตรกร

3.4.1 การระบาดของโรคในสภาพธรรมชาติ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการปลูกผักกาดฮ่องเต้เปรียบเทียบกับ

กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร พบว่า การใช้เชื้อปฏิชีวนะสูตรผงหรือสูตรน้ำร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย โดยแบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน (กรรมวิธีที่ 2 และ 4 ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคขอบใบทองในสภาพธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (กรรมวิธีที่ 1) ทั้งการเกิดโรค และความรุนแรงโรค(รูปที่ 9ก และ 9ข) โดยเมื่อผักกาดฮ่องเต้ อายุ 28 วัน กรรมวิธีที่ 2 และ 4 แสดงการพบโรคเฉลี่ย 31.25 และ 32.5 เปอร์เซ็นต์ และแสดงความรุนแรงโรคเฉลี่ย 16.5 และ 17.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกรพบโรคเฉลี่ย 41.25 เปอร์เซ็นต์ และแสดงความรุนแรงโรคเฉลี่ย 28.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผักกาดฮ่องเต้ อายุ 35 วัน กรรมวิธีที่ 2 และ 4 แสดงการพบโรคเฉลี่ย 35.0 และ 33.8 เปอร์เซ็นต์ และแสดงความรุนแรงโรคเฉลี่ย 19.5 และ 20.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกรพบโรคเฉลี่ย 52.5 เปอร์เซ็นต์ และแสดงความรุนแรงโรคเฉลี่ย 34.6 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อปฏิชีวนะ TU-Orga1 ทั้ง 2 สูตร สามารถลดความรุนแรงโรคขอบใบทองได้ดีกว่ากรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (รูปที่ 9ข)

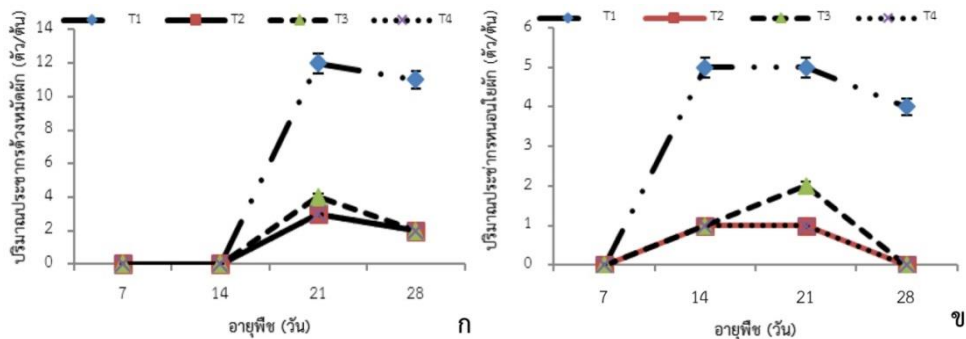


รูปที่ 9 การเกิดโรคขอบใบทองและความรุนแรงโรคในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร (รายละเอียดของกรรมวิธีที่ 1-4 ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 1)

3.4.2 การระบาดของแมลงศัตรูพืช

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ นอกจากเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีประสิทธิภาพควบคุมโรคขอบใบทองในสภาพแปลงของเกษตรกรแล้ว ยังมีผลต่อการระบาดของด้วงหมัดผักและผีเสื้อหนอนใยผัก (รูปที่

11) ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ 2-4 เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ทั้ง 2 สูตร ทั้งที่มีการใช้ร่วมหรือไม่ใช้ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกรมีการระบาดของศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิด น้อยกว่ากรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (รูปที่ 10ก และ 10ข)



รูปที่ 10 ปริมาณประชากรตัวหนอนใยผักและหนอนใยผัก (ตัว/ต้น) ในแปลงปลูกผักกาดฮ่องเต้ ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 โดยรายละเอียดของกรรมวิธีที่ 1-4 ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 11 ตัวหนอนใยผักเข้าทำลายต้นกล้าผักกาดฮ่องเต้ (ก) และการเข้าทำลายของหนอนใยผัก (ข) ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร

3.4.3 การเจริญเติบโตและผลผลิต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ร่วมในระบบการปลูกผักกาดฮ่องเต้ พบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์สูตรผงหรือสูตรน้ำร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ด

ปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน (กรรมวิธีที่ 2 และ 4 ตามลำดับ) และกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (กรรมวิธีที่ 1) มีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของผักกาดฮ่องเต้ โดยกรรมวิธีที่ 2 ผักกาดฮ่องเต้มีความ

สูงต้น 22.2 เซนติเมตร น้ำหนัก 118.2 กรัม/ต้น และ
ผลผลิต 2,173 กิโลกรัม/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ผักกาดฮ่องเต้
มีความสูงต้น 22.3 เซนติเมตร น้ำหนัก 119.8 กรัม/
ต้น และผลผลิต 2,120 กิโลกรัม/ไร่ และกรรมวิธีที่ 1

ผักกาดฮ่องเต้มีความสูงต้น 23.1 เซนติเมตร น้ำหนัก
120.1 กรัม/ต้น และผลผลิต 2,191 กิโลกรัม/ไร่
(ตารางที่ 1 และ รูปที่ 12)

ตารางที่ 1 ผลของการใช้ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำในการเพิ่มการเจริญเติบโตของผักกาด
ฮ่องเต้ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557^{1,2}

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้		
	ความสูงต้น (ซม.)	น้ำหนักสด/ต้น (กรัม/พืช)	ผลผลิตหลังการตัดแต่ง (กก./ไร่)
T1	23.1	120.1	2,191a
T2	22.2	118.2	2,173a
T3	21.8	117.6	1,934.5b
T4	22.3	119.8	2,120a

^{1/} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์ แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p = 0.05$

^{2/} T1 คือ การปฏิบัติดั้งเดิมของเกษตรกรคือ การพ่นน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองจากมะละกอสุกและเศษผัก (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 15 กิโลกรัม /แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน, T2 คือ การพ่นสูตรผงเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน T3 คือ การพ่นสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน และ T4 คือ การพ่นสูตรน้ำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ร่วมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ดปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน

3.5 ผลการยืนยันเชื้อสาเหตุโรค

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากผักกาดฮ่องเต้ที่คาดว่า เป็นโรคขอบใบทองในสภาพธรรมชาติ พบว่าแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ สีเหลือง เป็นมันวาว บนอาหาร nutrient glucose agar ชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ และก่อให้เกิดโรคขอบ

ใบทองบนผักกาดฮ่องเต้เช่นเดียวกับที่พบในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร เมื่อนำไปจำแนกในระดับโมเลกุลด้วยไพรเมอร์จำเพาะ XCF และ XCR ตามวิธีการของ [10] พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ที่ขนาด 525 bp ตรงตามขนาดที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ และเมื่อทำการแยกสกัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี sequencing

analysis นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรค

ดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 95 เปอร์เซ็นต์ กับ *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913



รูปที่ 12 ผักกาดฮ่องเต้ที่ปลูกด้วยการปฏิบัติดั้งเดิมของเกษตรกร (ซ้าย) และผักกาดฮ่องเต้ที่ปลูกโดยไม่ใช้สารเคมี แต่ใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เข้าร่วมในการปลูก (ขวา)

4. วิจารณ์

เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 สูตรผงและสูตรน้ำที่ใช้ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกรและปุ๋ยมูลไก่ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย รวมทั้งลดปริมาณการระบาดของด้วงหมัดผักและหนอนใยผักได้ดีกว่ากรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกรและการใช้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ที่ไม่ใช้ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร แสดงให้เห็นว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ทำงานร่วมกันได้ดีกับน้ำหมักมูลสุกร เนื่องจากเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีกลไกหลักในการควบคุมโรคพืชโดยผลิตสารปฏิชีวนะ กระตุ้นภูมิต้านทานศัตรูพืชผ่านการสะสม salicylic acid (SA) และส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช ผ่านการสะสม indole-3-acetic acid (IAA) ขณะที่น้ำหมักมูลสุกร

และปุ๋ยมูลไก่ทำหน้าที่ให้ธาตุอาหารแก่พืช สอดคล้องกับ Luna และคณะ [7] ที่รายงานว่าแบคทีเรียผิวใบพืช (epiphytic bacteria) ได้แก่ *B. subtilis* R14, *B. pumilus* C116, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 และ *B. cereus* C210 จะแสดงกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* LFR-3 สาเหตุโรคขอบใบทอง และวรรณวิไล และคณะ [23] รายงานว่า *Bacillus* sp. (WS16 และ WS18) และ *Trichoderma* sp. (CB-Pin-01 และ GV16) สามารถลดการเกิดโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียบนผักคะน้าได้ 9.3-14.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสารเคมีเบนโนมิล เมื่อทดสอบในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรพบว่า การพ่นใบผักคะน้าด้วย *Bacillus* sp. (WS16 และ WS18) และ

สารเคมีเบนนิล 1, 2 หรือ 3 ครั้ง ให้ผลในการควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้สามารถตรวจพบ *Bacillus* sp. (WS16 และ WS18) เกาะติดอยู่ที่ผิวใบผักคะน้าได้อีกด้วย วิลาวรรณ และสุดฤดี [25] รายงานประสิทธิภาพของ *B. subtilis* SP009s ในการลดความรุนแรงของโรคเน่าและ โรคขอบใบทอง โรคเน่าคอดิน และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของกะหล่ำดอก 52.6, 75.0, 28.0 และ 79.7 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มน้ำหนักสด ความสูงต้น และความยาวใบเฉลี่ย 82.5, 21.0 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตลอดจนให้ผลผลิตรวมเพิ่มขึ้น 41.7 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งบุษราคัมและคณะ [17]) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 20W4, 20W12 และ 20W11 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักคะน้า ซึ่งทัดเทียมกับการใช้สารเคมีแมนโคเซ็บ 80 % WP และการพ่นผลิตภัณฑ์ผงเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 20W1 อัตรา 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักคะน้าได้ดี ทัดเทียมกับสารเคมีแมนโคเซ็บ 80 % WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ขณะที่การพ่นผลิตภัณฑ์ผงเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* 20W1 อัตรา 40 -50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร จะควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียได้ดีกว่าสารเคมีแมนโคเซ็บ 80 % WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร นอกจากนี้ Xie และคณะ [15] ได้รายงานปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับแบคทีเรียบริเวณเขตรากพืชที่มีสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช (PGPR, plant-growth-promoting rhizobacteria) *B. subtilis* OKB105 โดยพืชจะผลิตสารประกอบต่าง ๆ ที่ PGPR สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นแหล่งพลังงานได้ เช่น คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนต่าง ๆ ส่วน PGPR จะผลิตฮอร์โมนพืชและเพิ่มปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน [5,6,9] ทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งกลไกของ

PGPR สายพันธุ์ OKB105 ได้ถูกรายงานว่าถูกควบคุมโดยยีน *yecA* (ทำหน้าที่ผลิต putative amino acid/polyamine permease) และ *speB* (ทำหน้าที่ผลิต agmatinase) ซึ่ง polyamine ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้พืชทนต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น acidic และ oxidative stresses รวมทั้งมีผลในการยับยั้งการผลิต ethylene ซึ่งทำหน้าที่ยังยั้งการเจริญเติบโตของพืช [15] อีกทั้ง *B. subtilis* ยังผลิตสารระเหย เช่น 3-hydroxy-2-butanone และ 2,3-butanediol ในระบบภูมิคุ้มกันพืช [12] นอกจากนี้ *spe* ของ *B. subtilis* จะมีหน้าที่ในการผลิตหรือปลดปล่อย polyamine ให้พืชทนต่อสภาวะเครียดโดยตรงแล้ว ยังทำหน้าที่โดยอ้อมที่มีต่อการสร้าง biofilm ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สามารถปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค [3]

นอกจากนี้ Chandrasekaran และคณะ [2] รายงานการสกัด chitinase จาก *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทุ้งผัก โดยการใช้ความเข้มข้น 6 μ M ส่งผลให้หนอนกระทุ้งมีการตายสูงที่สุดภายใน 48 ชั่วโมง รวมทั้งการพ่นใบพืชด้วย chitinase ที่ถูกสกัดจาก *B. subtilis* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและน้ำหนักของหนอน ตลอดจนเพิ่มอัตราการตายของหนอนอีกด้วย นอกจากนี้พืชยังมีระบบการต้านทานการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชทั้งระบบการต้านทานที่มีอยู่แล้วและระบบการต้านทานที่ถูกชักนำขึ้น ทั้ง 2 ระบบ จะถูกชักนำผ่าน signaling pathway ได้แก่ systemin, jasmonate, oligogalacturonic acid และ hydrogen peroxide ซึ่งพืชจะตอบสนองต่อการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชโดยการผลิตสารระเหยต่าง ๆ ไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช [4] ซึ่งมีรายงาน *Bacillus* sp. สามารถชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานพืชผ่าน jasmonate pathway และ hydrogen peroxide [1, 11] จากเหตุผลข้างต้นจึงสนับสนุนการ

ลดการระบาดของแมลงศัตรูพืชในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สำหรับน้ำหมักมูลสุกรมีรายงานว่าปริมาณธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และจุลธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเกือบทุกธาตุในปริมาณมากกว่าที่พบในน้ำสกัดมูลไก่ไข่และน้ำสกัดมูลโคนม ยกเว้นโพแทสเซียมที่พบในน้ำสกัดมูลไก่ไข่มากกว่าเล็กน้อย และแคลเซียมที่พบในน้ำสกัดมูลโคนมมากกว่า [8,28] เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตพบว่ากรรมวิธีที่ 1 การปฏิบัติดั้งเดิมของเกษตรกรให้ผลผลิตสูงที่สุด ถึงแม้ว่าจะพบการระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืชสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ เนื่องจากน้ำหนักสดของพืชจะผันแปรตรงกับปริมาณธาตุไนโตรเจน การใช้ปุ๋ยเคมีจึงทำให้พืชใช้ธาตุอาหารได้ดีขึ้น ผักกาดฮ่องเต้จึงมีความสูงและน้ำหนักต่อต้นสูงกว่าอย่างแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ ที่มีการใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกับน้ำหมักมูลสุกรและปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ด ซึ่งหากมีการพัฒนาสูตรปุ๋ยหมักคุณภาพสูงก็จะสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชผักที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีสมบัติเป็น PGPR และเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของผักกาดฮ่องเต้ เช่น *Xcc* และ *Alternaria* sp. ทั้งการใชในรูปแบบสูตรผง สูตรน้ำ หรือเชื้อสด ทั้งในลักษณะการพ่นเพียงลำพังหรือการพ่นร่วมกับน้ำหมักมูลสุกร พร้อมกับการใส่ปุ๋ยมูลไก่อัดเม็ด ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าการจัดการโรคพืชให้ประสบความสำเร็จดียิ่งขึ้นนั้น จะต้องใช้วิธีผสมผสานร่วมกันหลาย ๆ แนวทาง ทั้งการกำหนดระยะปลูกที่เหมาะสม การเฝ้าระวังการระบาดของศัตรูพืช การใช้ชีววิธี การใช้น้ำหมักมูลสุกร การใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และการทำความสะอาดแปลงปลูก เป็นต้น ซึ่งเกษตรกรหรือผู้ที่สนใจสามารถนำองค์ความรู้ผลของการใช้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ทั้งในรูปแบบสูตรผง สูตรน้ำ หรือเชื้อสด ไปใช้ร่วมในการปลูกผักกาดฮ่องเต้ของ

ตนเองได้ ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน โดยการใช้เชื้อสดและสูตรน้ำ เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจสามารถผลิตได้ด้วยตนเอง ต้นทุนต่ำ แต่มีอายุการเก็บรักษาสั้นและต้องมีการวางแผนเตรียมผลิตไว้ล่วงหน้า ในขณะที่สูตรผงสามารถเก็บรักษาได้นาน ใช้ง่าย ใช้ได้ทันที ไม่ต้องวางแผนผลิตล่วงหน้า แต่จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์หรือเครื่องมือพื้นฐาน รวมทั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเป็นที่ปรึกษา จึงส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น นอกจากนี้การใช้ชีววิธีโดยใช้เชื้อปฏิปักษ์ให้ประสบความสำเร็จ ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอีกหลายประการ เช่น การพัฒนาสูตรเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ ตลอดจนความสามารถในการครอบครองและการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัย โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทั้งสูตรผง สูตรน้ำ และเชื้อสดของ TU-Orga1 ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดฮ่องเต้และควบคุมโรคขอบใบทอง และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการพัฒนาสูตรเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบ อย่างไรก็ตามความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่รอดในชีวภัณฑ์ ลักษณะการละลายน้ำของชีวภัณฑ์ ลักษณะการแขวนลอยของชีวภัณฑ์ ลักษณะการจับใบของชีวภัณฑ์ รวมทั้งอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ จำเป็นต้องศึกษาวิจัยในระดับต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

- [1] Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwat, D. and Prathuangwong, S., 2012, The FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007. Afr. J. Microbiol. Res. 6: 603-610.
- [2] Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S.A., Narayanan, S.S. and Nathan, S.S., 2012, Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. Pestic. Biochem. Physiol. 104: 65-71.
- [3] Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R. and Guo, J.H., 2012, Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ. Microbiology 15: 848-864.
- [4] Gatehouse, J.A., 2002, Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction, New Phytol. 156: 145-169.
- [5] Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M., 2001, The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins, Physiol. Plant 111: 206-211.
- [6] Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R., 2002, Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect, Microbiology 148: 2097-2109.
- [7] Luna, C.L., Mariano, R.L.R. and Souto-Maior, A.M., 2002, Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease, Braz. J. Chem. Eng. 19: 133-140.
- [8] Mauyo, L.W., Anjichi, V.E., Wambugu, G.W. and Omunyini, M.E., 2008, Effect of nitrogen fertilizer levels on fresh leaf yield of spider plant (*Cleome gynandra*) in Western Kenya, Sci. Res. Essay 3: 240-244.
- [9] Ortiz-Castro, R., Valencia-Cantero, E. and López-Bucio, J., 2008, Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling, Plant Signal. Behav. 3: 263-265.
- [10] Park, Y.J., Lee, B.M., Hahn, J.H., Lee, G.B. and Park, D.S., 2004, Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences, Microbiol. Res. 159: 419-423.
- [11] Prathuangwong, S. and Buensanteai, N., 2007, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and 1,3-β-

- glucanase in soybean plant, Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 42: 321-330.
- [12] Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. and Kloepper, J.W., 2003, Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 4927-4932.
- [13] Schneider-Mullar, S., Kurosaki, F. and Nishi, A, 1994, Role of salicylic acid and intracellular Ca^{2+} in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture, Physiol. Mol. Plant Pathol. 45: 101-109.
- [14] 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.
- [15] Xie, S.S., Wu, H.J., Zang, H.Y., Wu, L.M., Zhu, Q.Q. and Gao, X.W., 2014, Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105, Mol. Plant Microbe Int. 27: 655-663.
- [16] ชุติศักดิ์ จอมพุก, 2551, สถิติการวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชไร่, ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม, 319 น.
- [17] บุษราคัม อุดมศักดิ์, ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล, บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และวรางคณา แซ่อ้วง, 2556, การทดสอบประสิทธิภาพ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*, น. 470-478, ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.
- [18] ปริศนา วงศ์ล้อม, 2548, การใช้พืชสมุนไพรและ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-022 ควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai) ในเห็ดหูหนู และผลของกานพลู (*Eugenia aromatic* Ktze.) ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.), วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- [19] ปาริชาติ สถิตธรรมพนา, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิวัฒน์, 2555, ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 180-188.
- [20] นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิวัฒน์, 2558, แบคทีเรียที่มีประโยชน์ชักนำการสะสมกาบาในเมล็ดข้าวกล้องงอกอินทรีย์, Thai J. Sci. Technol. 4(2): 123-132.
- [21] นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ลาวัลย์ กลัดสุวรรณ, มะลิดา ชูรินทร์ และดุสิต อธิวัฒน์, 2556, *Yutl* เป็นยีนใหม่ของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ในโตรเจนอย่างเหมาะสมเพื่อยับยั้งโรคใบขีดโปร่งแสงในระบบการผลิตข้าวอินทรีย์, น. 116-126, ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51, วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2556, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [22] นรินาม, ผักกาดฮ่องเต้ หรือกวาดงฮ่องเต้, แหล่งที่มา : <http://www.vegetweb.com>, 5 พฤศจิกายน 2558.
- [23] วรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง, วราภรณ์

- สุทธิสา, 2545, การควบคุมโรคใบจุดของคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์, น. 123-130, ใน เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40, วันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [24] วิชัย โฉมรัตน์, นิพนธ์ ทวีชัย และชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2541, ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยต่อการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช, น. 10, ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2541, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [25] วิลาวรรณ เชื้อบุญ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2551, ความถี่และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคสำคัญของกะหล่ำดอก, น. 572-580, ใน เอกสารการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46, วันที่ 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2551, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [26] ศศิธร วุฒิวนิชย์, 2545, โรคของผักและการควบคุมโรค, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 174 น.
- [27] สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2539, แมลงศัตรูข้าวและการประเมินประชากร, น. 61, ใน เอกสารประกอบการขอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักกีฏวิทยา 8ว. ด้านแมลงศัตรูข้าวหรือธัญพืชเมืองหนาว, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- [28] อุทัย คันโธ และสุกัญญา จัตตพรพงษ์, การใช้ประโยชน์มูลสัตว์เป็นปุ๋ยให้กับพืชอย่างมีประสิทธิภาพ, แหล่งที่มา : http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/08-integration/Uthai/integration_00.html, 5 พฤศจิกายน 2558.