



ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม
ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ในสภาพแปลงปลูก

Efficacy of Endophytic Bacteria Formulation for Control Canker Disease of Pomelo cv.

‘Tup Tim Siam’ Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in the Field Conditions

พรศิลป์ สีเผือก* นภัสวรรณ เลี่ยมนิมิตร และชัยสิทธิ์ ปรีชา

Pornsil Seephueak*, Napassawan Liamnimitr and Chaisit Preecha

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช

Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya,
Nakhon Si Thammarat Campus, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand

*Corresponding author, e-mail: pornsil.s@rmutsv.ac.th

(Received: Mar 10, 2023; Revised: Jul 26, 2023; Accepted: Aug 9, 2023)

บทคัดย่อ

โรคแคงเกอร์ของส้มโอเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เป็นโรคที่สำคัญสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ จำนวน 12 สูตร ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามในสภาพแปลงปลูก ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus subtilis* S1-4 สารพา และสารเสริมประสิทธิภาพ ในอัตราต่างกัน ผลการวิจัยพบว่าสูตรสำเร็จที่ประกอบด้วย ดินขาว (Kaolin) น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO₂) คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (CMC) แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃) และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีที่สุด และมีแบคทีเรียมีชีวิตรอด เท่ากับ 2×10^{10} cfu ต่อมิลลิลิตร หลังเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 เดือน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ดีที่สุด เท่ากับ 1.62 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับแอมพิซิลลิน (Ampicillin) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper disc diffusion พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อทดสอบใช้สูตรสำเร็จ *B. subtilis* S1-4 ควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามในแปลงปลูก ด้วยวิธีฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบ จำนวน 5 ครั้ง ทุก 10 วัน พบว่า วิธีการฉีดเข้าลำต้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรค 60.20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลแคงเกอร์ 5.46 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.38 เซนติเมตร ส่วนวิธีการพ่นทางใบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรค 69.20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลแคงเกอร์ 5.41 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.49 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมี ยาปฏิชีวนะ ชีวภัณฑ์การค้า *B. subtilis* ที่จำหน่ายในตลาด และชุดควบคุม (ไม่พ่นสาร)

คำสำคัญ : ชีววิธี สูตรสำเร็จ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ โรคแคงเกอร์ ส้มโอทับทิมสยาม

Abstract

The canker disease of pomelo cv. ‘Tup Tim Siam’ caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which an important disease resulting serious economic effects. The research aims to formulate and study on control the canker disease by 12 formulas of the endophytic bacteria *Bacillus subtilis* S1-4 in the field conditions. The formula composed of *B. subtilis* S1-4, carrier substances and performance enhancers in different ratios. The results showed that the best water soluble formula was kaolin, sugar, SiO₂, CMC, CaCO₃ and FeSO₄ at the ratio 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 which the highest number of bacteria survival in this formula at 2.0×10^{10} cfu/mL at room temperature for nine months storage. The formula effectively inhibited the growth of *X. citri* subsp. *citri* at 1.62 cm compared with Ampicillin by the paper disc diffusion method, a significant difference ($P < 0.05$). To control Tup Tim Siam pomelo canker in the field by



B. subtilis S1-4 formula was intra-plant injected and sprayed on pomelo leaves for 5 times every ten days. The results showed 60.20% inhibited *X. citri* subsp. *citri* by intra-plant injection, canker lesions at 5.46 lesions/leaf, and 0.38 cm width of yellow area surrounding wound. Spraying method had 69.20% of *X. citri* subsp. *citri* inhibition 5.41 canker lesions/leaf and 0.49 cm width of the yellow area surrounding the wound with non-significantly different ($P>0.05$) when compared with chemical, antibiotic, *B. subtilis* product from market, and control (untreated).

Keyword: Biocontrol, Formulation, Endophytic bacteria, Canker disease, Tup Tim Siam pomelo

บทนำ

ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (*Citrus maxima* cv. 'Tub Tim Siam' (Burm.) Merr.) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae ปลูกครั้งแรกในพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง บ้านแสวงเวียน อำเภopakพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มีผลมีขนอ่อนปกคลุมคล้ายกำมะหยี่ เนื้อสีแดงเข้มเหมือนสีทับทิม รสชาติหวานหอม เนื้อนุ่ม อร่อย นำมารับประทาน จึงเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคและตลาดอย่างต่อเนื่อง ราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง กิโลกรัมละ 150-200 บาท ทำให้ปัจจุบันเกษตรกรสนใจปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม คือปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะโรคแคงเกอร์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ก่อให้เกิดความเสียหายกับพื้นที่ปลูกส้มโอที่อำเภopakพนัง เนื่องจากพื้นที่ปลูกเป็นพื้นที่ลุ่มแม่น้ำติดชายฝั่งทะเลทำให้เกิดน้ำท่วมขัง และในช่วงปี พ.ศ. 2559 เกิดฝนตกชุกติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรง และก่อให้เกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะส้มโอ เพราะเชื้อสามารถเข้าทำลายได้อย่างรุนแรง หากสภาพของต้นส้มโออ่อนแอ (Preecha *et al.*, 2018) เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เป็นแบคทีเรียก่อโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองอ่อนถึงเข้ม สร้างรงควัตถุ (Pigment) สีเหลือง (Xanthomonadin) รูปร่างกลมรี ขอบเรียบ และมีเมือกเยิ้ม เชื้อสามารถเข้าสู่พืชทางช่องเปิดธรรมชาติ และทางบาดแผล ลักษณะอาการเป็นแผลสะเก็ดน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน พบมากบริเวณใบ ผล และกิ่ง หากเกิดโรครุนแรงจะทำให้ใบร่วง ต้นทรุดโทรม กิ่งแห้ง ชะงักการเจริญเติบโต และยืนต้นตาย (Sudyoung *et al.*, 2020)

แนวทางการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ เช่น คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (Copper hydroxide) และ คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ (Copper oxychloride) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี นอกจากนี้สารปฏิชีวนะ เช่น เตตราไซคลิน (Tetracycline) เพนนิซิลลิน (Penicillin) และแอมพิซิลลิน (Ampicillin) มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงปลูกได้เป็นอย่างดี (Preecha *et al.*, 2018; Rabbee *et al.*, 2019) โดยที่การฉีดเข้าลำต้นจะช่วยให้การนำสารปฏิชีวนะควบคุมเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ และไม่กระทบต่อจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อม อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะเป็นประจำทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความต้านทานต่อสารเคมีและสารปฏิชีวนะมากขึ้น (Rabbee *et al.*, 2023) จึงต้องเพิ่มปริมาณและความถี่ของการใช้ ส่งผลให้มีสารพิษตกค้างในผลผลิตและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยการผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารบางชนิดออกมา เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (Defense-related gene) ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรค (Rabbee *et al.*, 2023) การใช้แบคทีเรียเอนโดไฟท์จีส *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis*, *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* และ *B. methylotrophicus* สามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคพืชได้ (Bolivar-Anillo *et al.*, 2021; De Almeida Lopes *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2021; Rabbee *et al.*, 2019) ทั้งนี้การใช้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และผ่านการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในห้องปฏิบัติการ มาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จพร้อมใช้ที่ผสมกับสารพาและสารเสริมที่มีประสิทธิภาพ ในรูปแบบผงละลายน้ำ ซึ่งเหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตสปอร์ เช่น *Bacillus* spp. จะช่วยเพิ่มศักยภาพของแบคทีเรียในการควบคุมเชื้อก่อโรคได้มากยิ่งขึ้น

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ต่อการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามที่เกิดจากเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในสภาพแปลงปลูก การพัฒนาสูตรสำเร็จ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณภาพดี จะช่วยเสริมประสิทธิภาพให้สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น เป็นอีกทางเลือกในการทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ เป็นการทำเกษตรแบบยั่งยืน ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *B. subtilis* S1-4 ที่แยกได้จากรากส้มโอทับทิมสยาม และผ่านการยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลแล้วว่าเป็น *B. subtilis* มีคุณสมบัติเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อสาเหตุ *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในหองปฏิบัติการ นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient glucose broth (NGB) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปรับความขุ่น มีค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.9 (ความเข้มข้นประมาณ 10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร) นำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ผสมกับสารพาในกระบวนการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชนิดผง ตามกรรมวิธีของ Preecha *et al.* (2018)

2. การเตรียมส่วนผสมสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชนิดผง

เตรียมสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพสำหรับผลิตสูตรสำเร็จ ประกอบด้วย ดินขาว (Kaolin) และทัลคัม (Talcum) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ผสมกับน้ำตาลทราย (ป่นละเอียด) ซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO_2) คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (CMC) แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) และเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่กระจายในระหว่างการละลายในน้ำ (Dehscofix) ในสูตรและอัตราส่วนต่างๆ กัน 12 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ทัลคัม 100 กรัม กรรมวิธีที่ 2 ดินขาว 100 กรัม กรรมวิธีที่ 3 ทัลคัม และน้ำตาลทราย อัตราส่วน 70 : 30 กรัม กรรมวิธีที่ 4 ดินขาว และน้ำตาลทราย อัตราส่วน 75 : 25 กรัม กรรมวิธีที่ 5 ทัลคัม น้ำตาลทราย และคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส อัตราส่วน 70 : 15 : 15 กรัม กรรมวิธีที่ 6 ดินขาว น้ำตาลทราย และคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส อัตราส่วน 75 : 15 : 10 กรัม กรรมวิธีที่ 7 ทัลคัม น้ำตาลทราย คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส และแคลเซียมคาร์บอเนต อัตราส่วน 70 : 15 : 10 : 5 กรัม กรรมวิธีที่ 8 ดินขาว น้ำตาลทราย คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส และแคลเซียมคาร์บอเนต อัตราส่วน 75 : 10 : 10 : 5 กรัม กรรมวิธีที่ 9 ทัลคัม น้ำตาลทราย คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 70 : 15 : 5 : 5 : 5 กรัม กรรมวิธีที่ 10 ดินขาว น้ำตาลทราย คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 5 กรัม กรรมวิธีที่ 11 ทัลคัม น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 70 : 10 : 5 : 5 : 5 : 5 กรัม และกรรมวิธีที่ 12 ดินขาว น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 กรัม ตามลำดับ

ตรวจสอบการละลายน้ำของสูตรสำเร็จแต่ละสูตร โดยแบ่งเกณฑ์การละลายน้ำเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ระดับ 1 สารพากระจายตัวในน้ำสม่ำเสมอและไม่ตกตะกอนทันทีภายใน 1-5 นาที ระดับ 2 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำสม่ำเสมอภายใน 5-10 นาที ไม่ตกตะกอน ระดับ 3 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำสม่ำเสมอภายใน 11-30 นาที และ ไม่ตกตะกอน และระดับ 4 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำได้สม่ำเสมอใน 31-60 นาที ไม่ตกตะกอน (Preecha *et al.*, 2018) และตรวจความมีชีวิตรอดของเชื้อในสูตรสำเร็จเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 3 และ 9 เดือน ด้วยวิธี dilution plate count โดยชั่งสูตรสำเร็จ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{-15} ดูดสารแขวนลอยปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NA แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวอาหาร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนอาหารในแต่ละความเจือจาง (30-300 โคโลนี) คำนวณโคโลนีเชื้อในอาหารแต่ละสูตร ตามกรรมวิธีของ Nikaji (2016) ดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (cfu ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

3. ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม

ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ด้วยวิธี Paper disc diffusion โดยเลี้ยงเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการดูดกลืนแสง (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Preecha *et al.*, 2018) นำเชื้อที่เตรียมได้ ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NB เขย่าให้เข้ากัน เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำสูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผ่านการทดสอบดีที่สุดจากข้อ 2 มาละลายน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออัตรา 1 กรัมต่อน้ำ 99 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนประชากรของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Dilution plate count เท่ากับ 10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองกลมเบอร์ 1 (Paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (Qian *et al.*, 2021) วางกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Nutrient agar (NA) ที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ จานละ 4 จาน ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 5 จาน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทดสอบ 7 วัน

4. ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามในสภาพแปลงปลูก

ทำการทดลอง ณ แปลงส้มโอทับทิมสยาม บริษัทผาทอง แอชเช็ท จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช เลือกต้นส้มโอที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ที่มีความรุนแรงในระดับเดียวกัน แบ่งการทดลองเป็น 2 วิธี คือ การฉีดเข้า ลำต้น และการพ่นทางใบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ (ต้น) ประกอบด้วย *B. subtilis* S1-4 ในสูตรสำเร็จที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในห้องปฏิบัติการ อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์การค้า *B. subtilis* ที่จำหน่ายในตลาด อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร แอมพิซิลลิน ขนาด 500 มิลลิกรัม จำนวน 20 แคปซูลต่อน้ำ 15 ลิตร คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เฮกซะโคนาโซล (Hexaconazole) อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และกรรมวิธีควบคุม (ไม่พ่นสาร) ซึ่งเป็นกรรมวิธีของบริษัท ใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะบางชนิด วิธีฉีดเข้าลำต้น ใช้ส่วนไฟฟ้าเจาะที่ลำต้นส้มโอทับทิมสยาม สูงจากพื้นดินประมาณ 30 เซนติเมตร ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยดูดอากาศเข้าไปในกระบอกก่อน จึงทำการปักเข้าไปในรูที่เจาะเพื่อให้เกิดแรงดัน ปักกระบอกฉีดยาเข้าลำต้น กดให้แน่น ไขยางรัดไม่ให้ก้านกระบอกหลุด ปล่อยให้สารค่อย ๆ ซึมเข้าไปในลำต้น และปิดบาดแผลด้วยปูนแดง เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา ส่วนวิธีการพ่นทางใบ ทำการเตรียมตัวอย่างสารเช่นเดียวกับวิธีการฉีดเข้าลำต้น ก่อนพ่นผสมสารจับใบพ่นให้ทั่วทรงพุ่ม อัตรา 2 ลิตรต่อต้น บันทึกการเกิดโรค จำนวนแผลและความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลโดยวัดส่วนที่กว้างที่สุด ทดสอบโรคซ้ำทุก ๆ 10 วัน จำนวน 5 ครั้ง ทำการบันทึกข้อมูลการเกิดโรคซ้ำจากใบเดิมที่สุ่มเลือกไว้ทั้งหมด 10 ใบต่อต้น นำข้อมูลมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากสูตร จำนวนใบที่พบโรค/จำนวนใบทั้งหมด $\times 100$ (Pimpanuwat, 2021) วิเคราะห์หาความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัย

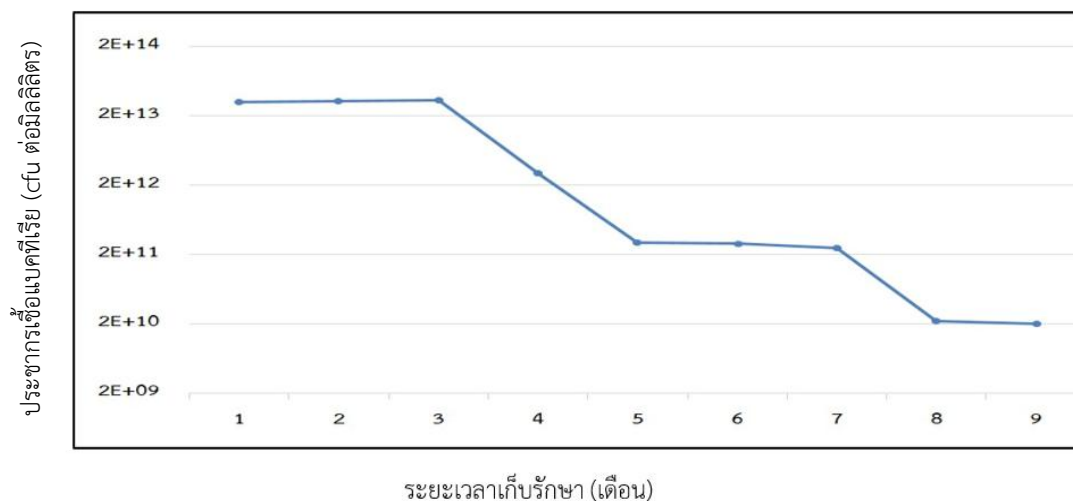
1. ส่วนผสมสูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ชนิดผง

สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ในสูตรสำเร็จกรรมวิธีที่ 12 ซึ่งประกอบด้วย สารพาหะดินขาวที่มีส่วนผสมของสารเสริมประสิทธิภาพ ได้แก่ น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 มีประสิทธิภาพในการละลายน้ำดีที่สุด เท่ากับ 1 (สารพาหะกระจายตัวในน้ำสม่ำเสมอและไม่ตกตะกอนทันทีภายใน 1-5 นาที) ในขณะที่ผลการตรวจสอบความมีชีวิตรอด (Viability) ของเชื้อ *B. subtilis* S1-4 ที่เก็บรักษาระยะเวลา 3 เดือน พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยที่จำนวนประชากรเชื้อ *B. subtilis* S1-4 ในสูตรสำเร็จกรรมวิธีที่ 12 ความมีชีวิตรอดเฉลี่ย 3.4×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 11 ความมีชีวิตรอดของเชื้อ *B. subtilis* S1-4 เฉลี่ย 2.7×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) โดยอัตราความมีชีวิตรอดของเชื้อ *B. subtilis* S1-4 ในกรรมวิธีที่ 12 ที่เก็บรักษาระยะเวลา 9 เดือน เฉลี่ยคงเหลือ 2.0×10^{10} cfu ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสูตรสำเร็จที่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 หลังจากเก็บรักษาระยะเวลา 3 เดือน

กรรมวิธี	ส่วนประกอบสูตรสำเร็จ	อัตราส่วน (กรัม)	ความมีชีวิตรอด (cfu ต่อมิลลิลิตร) ^{1/}	การละลายน้ำ
1	ทัลคัม	100	$3.0 \times 10^{11}c$	3
2	ดินขาว	100	$3.2 \times 10^{11}c$	3
3	ทัลคัม + น้ำตาลทราย	70:30	$2.0 \times 10^{10}d$	4
4	ดินขาว + น้ำตาลทราย	75:25	$2.2 \times 10^{10}d$	4
5	ทัลคัม + น้ำตาลทราย + CMC	70:15:15	$2.3 \times 10^{10}d$	3
6	ดินขาว + น้ำตาลทราย + CMC	75:15:10	$3.1 \times 10^{12}b$	3
7	ทัลคัม + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	70:15:10:5	$3.1 \times 10^{11}c$	3
8	ดินขาว + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	75:10:10:5	$3.3 \times 10^{11}c$	3
9	ทัลคัม + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	70:15:5:5:5	$2.8 \times 10^{12}b$	2
10	ดินขาว + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	75:10:5:5:5	$2.7 \times 10^{12}b$	3
11	ทัลคัม + น้ำตาลทราย + SiO ₂ + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	70:10:5:5:5:5	$2.7 \times 10^{13}a$	2
12	ดินขาว + น้ำตาลทราย + SiO ₂ + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	75:10:5:5:3:2	$3.4 \times 10^{13}a$	1
C.V. (%)			14.32	
Significant difference			*	

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 1 อัตราการมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* S1-4 ในสูตรสำเร็จกรรมวิธีที่ 12 ประกอบด้วยดินขาว น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตรา 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 เมื่อเก็บสภาพอุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 9 เดือน

2. ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในห้องปฏิบัติการ

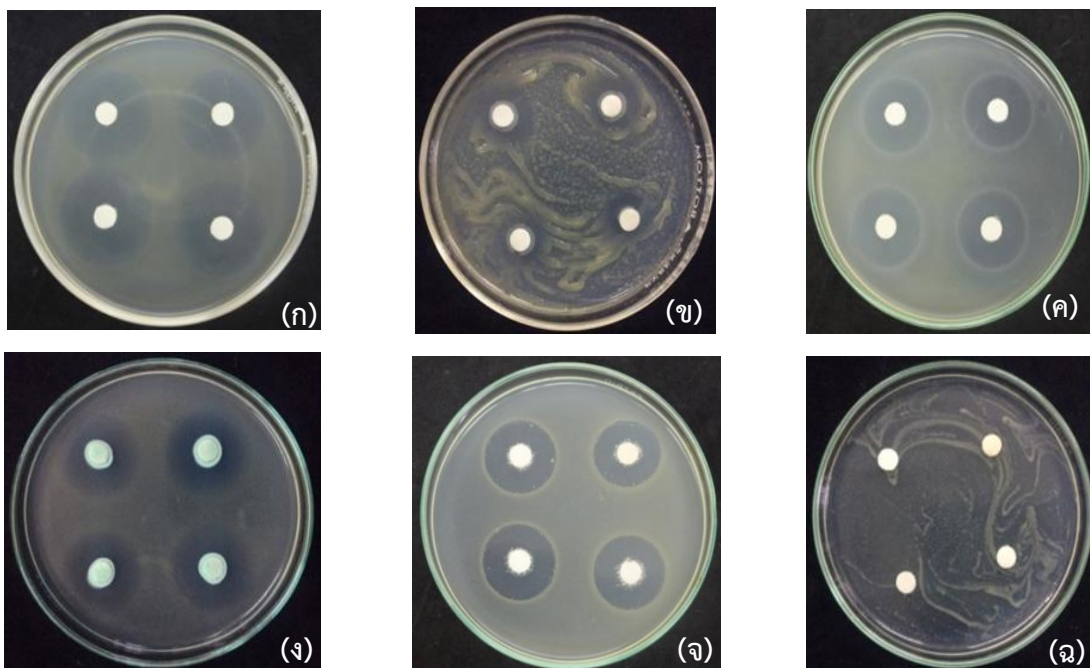
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ด้วยวิธี Paper disc diffusion พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยที่สูตรสำเร็จ *B. subtilis* S1-4 ในสูตรดินขาว น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งมากที่สุด เท่ากับ

1.62 เซนติเมตร รองลงมาคือ เชื้อ *B. subtilis* S1-4 (เชื้อสด) แอมพิซิลลิน และคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง เท่ากับ 1.41 1.33 และ 1.14 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ชีวภัณฑ์การค้ำ *B. subtilis* มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งน้อยที่สุด เท่ากับ 0.13 เซนติเมตร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) การเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper disc diffusion ที่ระยะเวลา 7 วัน หลังทดสอบ

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) ^{1/}
1. สูตรสำเร็จ <i>B. subtilis</i> S1-4	1.62 ± 0.01 ^a
2. ชีวภัณฑ์การค้ำ <i>B. subtilis</i>	0.13 ± 0.01 ^d
3. เชื้อ <i>B. subtilis</i> S1-4 (เชื้อสด)	1.41 ± 0.01 ^b
4. คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	1.14 ± 0.01 ^c
5. แอมพิซิลลิน	1.33 ± 0.01 ^b
6. ชุดควบคุม (น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ)	0.00 ± 0.00 ^e
C.V. (%)	0.34
Significance difference	*

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง จากการทดลอง 4 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ด้วยวิธี paper disc diffusion สูตรสำเร็จ *B. subtilis* S1-4 (ก) ชีวภัณฑ์การค้ำ *B. subtilis* (ข) เชื้อ *B. subtilis* S1-4 เชื้อสด (ค) คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (ง) แอมพิซิลลิน (จ) และชุดควบคุม (ฉ)

3. ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ในสภาพแปลงปลูก ผลของการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 เพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม พบว่า ประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์เมื่อน้ำฉีดเข้าลำต้น เท่ากับ 60.20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผล 5.46 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.38 เซนติเมตร ในขณะที่การพ่นทางใบสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้



69.20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผล 5.14 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.49 เซนติเมตร ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ โดยที่การใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบเท่ากับ 67.70 และ 71.82 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลเท่ากับ 4.29 และ 3.99 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.42 และ 0.52 เซนติเมตร ตามลำดับ การใช้คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบเท่ากับ 62.98 และ 61.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลเท่ากับ 4.36 และ 4.66 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.44 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ การใช้เฮกซะโคนาโซล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบ เท่ากับ 63.60 และ 55.67 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลเท่ากับ 4.54 และ 4.94 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.41 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ การใช้ชีวภัณฑ์การค้า *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบเท่ากับ 62.37 และ 67.71 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลเท่ากับ 4.47 และ 4.67 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.46 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่พ่นสาร) ซึ่งเป็นกรรมวิธีของบริษัทที่ใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะบางชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เมื่อฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบเท่ากับ 65.03 และ 54.52 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแผลเท่ากับ 4.29 และ 5.44 แผลต่อใบ และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลขนาด 0.48 และ 0.46 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การยับยั้งการเกิดโรค จำนวนแผล และความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผลโรคแคงเกอร์ หลังจากใช้ยาปฏิชีวนะ สารเคมี และชีวภัณฑ์แบคทีเรีย ฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบของต้นส้มโอทับทิมสยาม ในสภาพแปลงปลูก

กรรมวิธี	วิธีการฉีดเข้าลำต้น			วิธีการพ่นทางใบ		
	การยับยั้ง การเกิดโรค (%)	จำนวน แผล	ความกว้าง บริเวณสี เหลืองที่ ล้อมรอบแผล (ซม.)	การยับยั้ง การเกิดโรค (%)	จำนวน แผล	ความกว้าง บริเวณสี เหลืองที่ ล้อมรอบแผล (ซม.)
1. แอมพิซิลลิน	67.70±0.03	4.29±0.01	0.42±0.01	71.82±0.03	3.99±0.01	0.52±0.01
2. คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	62.98±0.03	4.36±0.01	0.44±0.01	61.00±0.05	4.66±0.01	0.50±0.01
3. เฮกซะโคนาโซล	63.60±0.05	4.54±0.01	0.41±0.01	55.67±0.06	4.94±0.01	0.50±0.01
4. สูตรสำเร็จ <i>B. subtilis</i> S1-4	60.20±0.04	5.46±0.01	0.38±0.01	69.20±0.06	5.41±0.01	0.49±0.01
5. ชีวภัณฑ์การค้า <i>B. subtilis</i>	62.37±0.08	4.47±0.01	0.46±0.01	67.71±0.05	4.67±0.01	0.50±0.01
6. ชุดควบคุม (ไม่พ่นสาร)	65.03±0.02	4.29±0.01	0.48±0.01	54.52±0.05	5.44±0.01	0.46±0.01
C.V. (%)	5.29	9.03	7.93	10.78	10.65	3.80
Significance difference	ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ : ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

อภิปรายผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียเอนโดไฟท์สำหรับใช้ควบคุมโรคพืชที่ดี นอกจากต้องมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มากและสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สูงแล้ว อัตราส่วนของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพก็มีส่วนสำคัญในการควบคุมเชื้อก่อโรค และช่วยให้สามารถแข่งขันหรือครอบครองพื้นที่ใบหรือส่วนของพืชได้ ในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ให้มีคุณภาพ สารพาที่ดีจะต้องคงความมีชีวิตของเชื้อได้ดี เป็นที่ยึดเกาะและลดความเสี่ยงจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม และลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรค ส่วนสารเสริมประสิทธิภาพที่ดีจะต้องออกฤทธิ์ดี เมื่อนำสูตรดังกล่าวละลายในน้ำและใช้กับส่วนของพืช จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ดินขาวและทาลคัมมีประสิทธิภาพในการนำมาผลิตเป็นสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* S1-4 ทั้งนี้สูตรสำเร็จที่ประกอบด้วยสารพาดินขาว น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส



แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเพอร์รอสัลเฟต ในส่วนประกอบอัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 ความมีชีวิตรอดของเชื้อ *B. subtilis* S1-4 เท่ากับ 3.4×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จที่ใช้ผงทัลคัมผสมสารเสริมประสิทธิภาพอัตรา 70 : 10 : 5 : 5 : 5 : 5 พบความมีชีวิตรอดเท่ากับ 2.7×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าการละลายน้ำพบว่า สูตรสำเร็จดินขาวละลายน้ำได้ดีกว่าทัลคัม ทั้งนี้เนื่องจากดินขาวมีน้ำหนักโมเลกุลเบา ช่วยให้การกระจายตัวในน้ำได้เร็ว ในขณะที่ผงทัลคัมจะจับกลุ่มบนน้ำ ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถละลายออกจากสารพาได้ อาจส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียมีปริมาณไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ด้วยวิธี Paper disc diffusion ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้งเชื้อเป้าหมายมากที่สุดขนาด 1.62 เซนติเมตรมากกว่าการใช้สารเคมี ยาปฏิชีวนะ และชีวภัณฑ์การค้า *B. subtilis* อย่างไรก็ตาม Cho and Kasem (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* S20A1 โดยใช้ดินขาวและทัลคัมเป็นสารพาในสูตรชีวภัณฑ์ เพื่อควบคุมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าการผสมกันระหว่างดินขาวและทัลคัมทำให้การเกิดโรคน้อยที่สุด 22.62 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลดโรคได้ 65.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Prathuangwong *et al.* (2013) กล่าวว่า ทัลคัมและดินขาวเป็นสารตั้งต้นอย่างดีในการผลิตชีวภัณฑ์ *Pseudomonas fluorescens* อย่างไรก็ตามนอกจากสูตรชีวภัณฑ์ที่ดีแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญที่จะช่วยส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรีย สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารทุติยภูมิที่ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคได้เช่นกัน

สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียที่ดีต้องทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ให้รอดชีวิตได้ดี และส่งเสริมให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ แผลงออกได้เต็มที่ โดยกระบวนการที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีปฏิสัมพันธ์กับพืชอาศัยนั้น อาจเกิดได้ทั้งทางตรงหรือทางอ้อม (Preecha *et al.*, 2018) การเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อโดยตรง คือการที่แบคทีเรียผลิตสารปฏิชีวนะและ/หรือ สารทุติยภูมิทำลายเชื้อสาเหตุโรคได้โดยตรง *Bacillus* หลายชนิด ได้แก่ *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. subtilis* และ *B. velezensis* สามารถผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เช่น Cyclic lipopeptides และ Polyketides ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในส้มโอและพืชหลายชนิด (Rabbee *et al.*, 2019) สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับพืชทางอ้อมนั้น คือ ชีวภัณฑ์สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการสะสมสารประกอบทุติยภูมิในพืช ซึ่งเป็นพืชกับเซลล์ของเชื้อโรคได้ดี และสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ Poralokanon & Athinuwat (2018) ศึกษาและพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืช TU-Orga13 และ TU-Orga14 จำนวน 6 สูตร ในรูปแบบผงผสมน้ำจากผงถ่านชีวภาพที่ประกอบด้วยสารพา สารเสริมประสิทธิภาพ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าชีวภัณฑ์ชนิดน้ำจากผงถ่านชีวภาพที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย ผงถ่านชีวภาพ แป้งทัลคัม โดโลไมต์ แคลเซียมคาร์บอเนต คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส และน้ำสกัดถั่วเหลือง มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแผลโรคแคงเกอร์บนใบมะนาว และลดประชากรเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีที่สุด และสูตรสำเร็จดินขาวผสมสารเสริม เมื่อนำไปใช้โดยการฉีดเข้าลำต้นและพ่นทางใบ พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของส้มโอทับทิมสยามและมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้แบบเชื้อสด

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า เชื้อมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรค จำนวนแผล และขนาดแผล ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีของบริษัท ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะบางชนิดในการป้องกันกำจัดโรค รวมถึงกรรมวิธีการใช้แอมพิซิลลิน คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ เฮกซะโคนาโซล และชีวภัณฑ์การค้า *B. subtilis* สอดคล้องกับการศึกษาของ Qian *et al.* (2021) รายงานว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. amyloliquefaciens* QC-Y มีประสิทธิภาพในการลดโรค 77.50 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แผลแคงเกอร์มีขนาดลดลง โดย Sudyoung *et al.* (2020) รายงานว่านอกจาก *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* แล้วแบคทีเรีย *B. velezensis* SWUA 08 และ *P. aeruginosa* SWUC02 ก็มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความต้านทานและลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้เป็นอย่างดี จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ที่ผลิตขึ้น มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยามเทียบเท่าสารเคมี สารปฏิชีวนะ และชีวภัณฑ์ที่จำหน่ายในตลาด และหากพิจารณาในรูปแบบการนำไปใช้จะเห็นได้ว่าวิธีการพ่นชีวภัณฑ์ทางใบ (ยับยั้งโรค 69.20 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้มากกว่าการฉีดเข้าลำต้น (ยับยั้งโรค 60.20 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้เนื่องจาก *B. subtilis* S1-4 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์จึงสามารถครอบครองพื้นที่ผิวใบได้ดี ทำให้ควบคุมการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถพัฒนา *B. subtilis* S1-4 เป็นชีวภัณฑ์ เพื่อใช้ป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ได้ในอนาคต เป็นอีกทางเลือกในการผลิตส้มโอทับทิมสยามให้ปลอดภัย ยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ในสูตรสำเร็จดินขาว น้ำตาลทราย ซิลิกอนไดออกไซด์ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส แคลเซียมคาร์บอเนต และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต อัตราส่วน 75 : 10 : 5 : 5 : 3 : 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอทับทิมสยาม เมื่อพ่นทางใบและฉีดเข้าลำต้นสามารถยับยั้งโรคได้ 69.20 และ 60.20 เปอร์เซ็นต์ ลดจำนวนแผล และความรุนแรงของโรคเมื่อวัดความกว้างบริเวณสีเหลืองที่ล้อมรอบแผล ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

การใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของส้มโอเป็นนวัตกรรมใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สูตรสำเร็จแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* S1-4 ที่ผลิตขึ้นมาสามารถลดการเกิดโรคได้ ทั้งนี้เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันกำจัดโรคและสามารถควบคุมโรคได้อย่างต่อเนื่อง ควรใช้วิธีการพ่นทางใบร่วมกับการฉีดเข้าลำต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ประจำปีงบประมาณ 2565 ขอขอบคุณบริษัทผาทอง แอชเช็ท จำกัด สำหรับการอนุเคราะห์สวนส้มโอทับทิมสยาม เพื่อทดลองในสภาพแปลงปลูก

เอกสารอ้างอิง

- Bolivar-Anillo, H. J., Gonzalez-Rodriguez, V. E., Almeida, G. R., Izquierdo-Bueno, I., Moraga, J., Carbu, M., et al. (2021). Endophyte microorganisms as an alternative for the biocontrol of *Phytophthora* spp. In *Agro-Economic Risks of Phytophthora and a Effective Biocontrol Approach*. [Online]. Retrieved March 1, 2023, from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen99696>.
- Cho, A. T., & Kasem, S. (2018). Modified growth media of *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1 and biocontrol of bacterial leaf blight of rice. *Thai Journal of Agricultural Science*, 51(4), 195-207.
- De Almeida Lopes, K. B., Pipolo, V. C., Fira, D., Balatti, P. A., Lopez, S. M. Y., Oro, T. H., Pagliosa, E. S. & Degrassi, G. (2018). Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean disease. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 1466-1481.
- Nikaji, J. (2016). *Development of formulation and application of Bacillus subtilis for controlling soft rot disease of chinese mustard*. Master's Thesis. Suranaree University of Technology. (in Thai)
- Pimpanuwat, P. (2021). *Investigating the potential of actinobacteria to prevent disease and promoting the growth of citrus*. Master's Thesis. Naresuan University. (in Thai)
- Poralokanon, P., & Athinuwat, D. (2018). Pilot scale product of novel biopesticide wettable powder formulation to control canker disease of lime in large field application. *Thai Journal of Science and Technology*, 7(5), 491-515. (in Thai)
- Prathuangwong, S., Athinuwat, D., Chuaboon, W., Chatnaparat, T., & Buensanteai, N. (2013). Bioformulation *Pseudomonas fluorescens* SP007s against dirty panicle disease of rice. *African Journal Microbiology Research*, 7(47), 5274-5283.
- Preecha, C., Wisutthiphaet, W., & Seephueak, P. (2018). Occurrence of canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) cultivar. Tabtim Siam in Nakhon Si Thammarat province, Thailand and screening fungicides, antibiotics and antagonistic bacteria against *X. a. pv. citri* in vitro. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 6(3), 1-7.
- Qian, J., Zhang, T., Tang, S., Zhou, L., Li, K., Fu, X., & Yu, S. (2021). Biocontrol of citrus canker with endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* QC-Y. *Plant Protection Science*, 57(1), 1-13.



- Rabbee, M. F., Ali, M. S., & Baek, K. H. (2019). Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *Citrus* spp. control streptomycin resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*, 9(8), 470. [Online]. Retrieved March 1, 2023, from: <http://doi.org/10.3390/agronomy9080470>.
- Rabbee, M. F., Hwang, B. S., & Baek, K. H. (2023). *Bacillus velezensis*: a beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture. *Agronomy*, 13(3), 840. [Online]. Retrieved May 2, 2023, from: <https://doi.org/10.3390/agronomy13030840>.
- Sudyoung, N., Tokuyama, S., Krajangsang, S., Pringsulaka, O., & Sarawaneeyaruk, S. (2020). Bacterial antagonists and their cell-free culture efficient suppress canker disease in citrus lime. *Journal of Plant Disease and Protection*, 127(2), 173-181.