

การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า Bio-Formulation Development from *Bacillus subtilis* TU-Orga1 for Controlling the Important Diseases of Chinese Kale

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธิณูวัฒน์*

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

ชีวภัณฑ์ชนิดใหม่จากเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 ได้พัฒนาขึ้นด้วยการนำสารพา kaolin : potassium humate : glucose : FeSO_4 สัดส่วน 72:8:1:19 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก มาผสมกับเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (10^{13} cfu/ml) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/สารพา 1 กิโลกรัม โดยเมื่อเก็บรักษาชีวภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้อง ($28-33^\circ\text{C}$) นาน 12 และ 24 เดือน พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มีปริมาณคงเหลือประมาณ 10^{12} และ 10^{10} cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งชีวภัณฑ์ดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้า โดยกระตุ้นให้สะสม indole-3-acetic acid สูงสุดเท่ากับ 15.21 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม น้ำหนักสด และชักนำภูมิต้านทานโรค โดยกระตุ้นให้สังเคราะห์ salicylic acid และ superoxide dismutase สูงสุดเท่ากับ 0.79-0.91 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด และ 13.43-16.78 ไมโครกรัมแคทที่คอล/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม เพื่อดำเนินการโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ โรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียที่เกิดจาก *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, และ *Alternaria* sp. ตามลำดับ เมื่อทดสอบชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร จังหวัดนนทบุรี ด้วยการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ จำนวน 6 ครั้ง (เมื่อผักคะน้ามีอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน) เพื่อควบคุมโรคของผักคะน้าที่จะเกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติ ผลการทดสอบพบว่าชีวภัณฑ์ชนิดใหม่มีประสิทธิภาพในการลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ โรคเน่าเปียก รวมทั้งเพิ่มปริมาณผลผลิตผักคะน้าได้แตกต่างทางสถิติกับการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ จำนวน 6 ครั้ง ด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ผสมแมนโคเซ็บและกรรมวิธีควบคุม ดังนั้นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ซึ่งมีสมบัติต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้อาจนำไปสู่กรอบการทำงานที่มีคุณค่าสำหรับการเกษตรที่ยั่งยืนในอนาคต

คำสำคัญ : เกษตรอินทรีย์; แบคทีเรียปฏิปักษ์; โรคขอบใบทอง; โรคเน่าและ; โรคใบจุด; ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

Abstract

A new bio-formulation of the biological control agent, *Bacillus subtilis* TU-Orga1 was developed with supporter ratio of kaolin : potassium humate : glucose : $\text{FeSO}_4 = 72:8:1:19$ w/w then mixed with 20 ml (10^{13} cfu/ml TU-Orga1)/kg supporter. TU-Orga1 viability in the formulation stored at room temperature (28-33 °C) slowly declined to approximately 10^{12} and 10^{10} cfu/ml after 12 and 24 months shelf life, respectively. The bio-formulation enhanced plant growth by significantly increased indole-3-acetic acid accumulation with 15.21 µg/mg fresh weight and induced resistance by significantly increased salicylic acid and superoxide dismutase accumulations with 0.79-0.91 mg/g fresh weight and 13.43-16.78 µg catechol mg^{-1} protein against black rot, soft rot, and *Alternaria* leaf spot diseases caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and *Alternaria* sp., respectively. Field experiment with seed treatment and 6-foliar spray intervals (7, 14, 21, 28, 35 and 42-day-old plants) of the new bio-formulation was conducted against naturally diseases occurred at Nonthaburi. The new bio-formulation significantly reduced black rot, soft rot, and *Choaneohora* wet rot pathogens colonization on Chinese kale and exhibited the greatest yield compared to seed treatment and 6-bactericide mixed fungicide spray intervals and nontreated control. The bio-formulation developed and antimicrobial activities may contribute to a valuable framework for a future sustainable agricultural production.

Keywords: organic farming; antagonistic bacteria; black rot; soft rot; leaf spot; microbial product

1. บทนำ

คะน้าเป็นพืชผักที่สามารถปลูกได้ตลอดปีแต่ผลผลิตที่ได้จะแตกต่างกันทั้งปริมาณและคุณภาพเดือนที่เหมาะสมต่อการปลูกคะน้าและให้ผลผลิตสูงสุดคือ มิถุนายน รongลงมา คือ พฤศจิกายน ตุลาคม และกรกฎาคม ส่วนเดือนที่ให้ผลผลิตต่ำสุด คือ มีนาคมและที่สำคัญการปลูกคะน้ามักประสบปัญหาการระบาดของโรคพืชและแมลงศัตรูพืช ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตคะน้าได้ตลอดทั้งปี โดยแมลงศัตรูคะน้าที่สำคัญ ได้แก่ หนอนใยผัก (diamondback moth, *Plutella xylostella*) เพลี้ยอ่อน (aphid, *Lipaphis erysimi*) ตัวมดผัก (flea

beetle, *Phyllotreta sinuata*) หนอนกระทุ้หอม (*Spodoptera exigua*) และหนอนกระทุ้ผัก (*Spodoptera litura*) เป็นต้น โรคพืชที่สำคัญ ได้แก่ โรคเน่าคอดิน (damping-off) ที่เกิดจากรา *Pythium* sp. โรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (*Alternaria* leaf spot, *Alternaria* spp.) โรคราน้ำค้าง (downy mildew, *Pseudoperonospora* sp. และ *Peronospora parasitica*) โรคขอบใบทอง (black rot, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) โรคเน่าและ (soft rot, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) และรากปม (root knot nematode, *Meloidogyne incognita*) [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรค

ขอบใบทองที่ส่งผลให้คะน้ามีอาการใบแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือเหลืองคล้ายสีทอง และโรคเน่าและที่ส่งผลให้คะน้ามีอาการเน่าและ เมือกเยิ้ม กลิ่นเหม็น ฉุนจัด ซึ่งทั้ง 2 โรค นี้ มักระบาดในฤดูฝนหรือฤดูที่มีความชื้นสูง หากพบอาการโรครุนแรงจะสร้างความเสียหายต่อผลผลิตของผักคะน้าได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ [2] อีกทั้งโรคเน่าและยังเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญและเชื้อสาเหตุโรคดำรงชีวิตอยู่ในดินได้นานอีกด้วย [3] นอกจากนี้ยังมีโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียที่ทำให้คะน้ามีอาการใบจุดหรือวงซ้อนกันสีน้ำตาลเข้มถึงดำ คล้ายเป้ายิงปืน หากระบาดรุนแรงจะส่งผลให้ผลผลิตเสียหายถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในฤดูฝนหรือฤดูที่มีความชื้นสูง และเชื้อสาเหตุโรคนี้สามารถอยู่ข้ามฤดูในเศษซากพืชในรูปของเส้นใยได้เป็นระยะ [1] เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีเป็นหลักในการควบคุมโรคต่าง ๆ เหล่านี้ ขณะเดียวกันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงปัญหาสุขภาพและสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น การควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางเลือกอย่างการใช้ชีววิธีจึงเป็นหนึ่งทางเลือกที่ตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คือ การนำเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ซึ่งมีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติในบริเวณผิวพืชส่วนเหนือดิน บริเวณรากและดินรอบรากที่มีความสามารถในการแข่งขัน (competition) ทางด้านแหล่งแร่ธาตุอาหาร และแหล่งที่อยู่อาศัย การเป็นปรสิต (parasite) รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนหรือควบคู่ไปกับการใช้สารเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับรากพืช (rhizobacteria) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่เรียกว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) [4] ที่ถูกนำมาใช้ร่วมในระบบการปลูกพืชหลากหลาย

ชนิดทั้งในรูปแบบเชื้อสดและชีวภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และ WS 18 ที่มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักคะน้าได้ได้อย่างแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม [5] การใช้เชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* No.33 ความเข้มข้น 1.6×10^8 cfu/ml พ่นต้นข้าวร่วมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช carbendazim + epoxiconazole 25 % SC หรือ propiconazole 25 % E.C หรือ propiconazole + difenoconazole 30 % E.C ในอัตราสารออกฤทธิ์ครึ่งหนึ่งของอัตราแนะนำ หรือการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* No.33 (1.6×10^9 cfu/ml) เพียงอย่างเดียว ในระยะข้าวตั้งท้องไถ่ล้อมรวงและระยะรวงข้าวโผล่ได้ 5 % มีประสิทธิภาพควบคุมโรคเมล็ดต่างและเพิ่มผลผลิตข้าวได้ดีทัดเทียมกับการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช carbendazim + epoxiconazole 25 % SC หรือ propiconazole 25 % E.C หรือ propiconazole + difenoconazole 30 % E.C. ในอัตราสารออกฤทธิ์อัตราแนะนำ และดีกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างแตกต่างทางสถิติ [6] การพ่นชีวภัณฑ์ *B. subtilis* 20W1 อัตรา 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักคะน้าได้ดีทัดเทียมกับการใช้ mancozeb 80 % WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ขณะที่การพ่นชีวภัณฑ์ *B. subtilis* 20W1 อัตรา 40-50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร จะควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียได้ดีกว่า mancozeb 80 % WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร [7] และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. subtilis* TU-Orga1 ซึ่งแยกมาจากดินรอบรากข้าวจากงานวิจัยก่อนหน้า ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นสูตรน้ำเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ในการควบคุมโรคใบขีดโปร่งแสงขอบใบแห้ง และโรคเมล็ดต่างของข้าว รวมทั้งเพิ่มผลผลิตข้าวได้ 30 % [8-11] จึงได้ศึกษาวิจัยผลของการใช้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 เข้าร่วมในระบบการปลูกพืช

อย่างหลากหลาย ๆ ได้แก่ ข้าวโพด พืชผักตระกูลกะหล่ำ ถั่วฝักยาว เป็นต้น และได้ผลดีกับพืชชนิดต่าง ๆ ที่กล่าวมา [12,13] ทั้งนี้สูตรน้ำเพิ่มปริมาณที่พัฒนามาก่อนหน้า ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง ตลอดจนมีอายุการเก็บรักษาสั้น

ขณะที่ความสำเร็จของการใช้เชื้อปฏิปักษ์หรือชีวภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ ร่วมในระบบการผลิตพืช ทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโต การควบคุมโรค และการชักนำให้พืชมีภูมิต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะนำโรคพืชนั้น มีปัจจัยที่สำคัญ คือ การพัฒนา รูปแบบ (formulation) และวิธีการใช้ (application) ชีวภัณฑ์ที่ง่ายและสะดวกต่อการใช้งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดผงจากเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สำหรับควบคุมโรคที่สำคัญของคะน้า ได้แก่ โรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตคะน้าที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1

เลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* TU-Orga1 ซึ่งมีรายงานประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่สำคัญในระบบการปลูกพืชผัก ข้าว และข้าวโพด [11,12] ในอาหารเหลว nutrient glucose broth (NGB) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เชยา 120 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 5 °C) นาน 48-96 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 12,000 รอบ/นาที่ นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาเตรียมเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 10^{13} cfu/ml เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคพืชที่สำคัญของผักคะน้า

2.2.1 การคัดเลือกชนิดของสารพา

ประเมินสมบัติสารพาชนิดต่าง ๆ ได้แก่

(1) talcum 100 % (2) kaolin 100 % (3) dolomite 100 % (4) talcum : potassium humate สัดส่วน 90:10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (5) kaolin : potassium humate สัดส่วน 90:10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ (6) dolomite : potassium humate สัดส่วน 90:10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อคัดเลือกสารพาสำหรับนำไปผลิตชีวภัณฑ์ต้นแบบชนิดผง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี ดังรายละเอียดสารพาชนิดต่าง ๆ ข้างต้น กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซึ่งจะประเมินสมบัติการเป็นสารพา 4 ด้าน ดังรายงานของนลินา [14] และ Volgas และคณะ [15] ดังนี้

(1) ความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ร่วมกับสารพา โดยนำสารพาที่ผสมเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* TU-Orga1 สัดส่วน สารพา : เซลล์แขวนลอย เท่ากับ 1 กิโลกรัม : 20 มิลลิลิตร มาทดสอบความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ร่วมกับสารพา โดยเก็บรักษาสารพาในซองอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน ประเมินผลโดยตรวจนับจำนวนเชื้อปฏิปักษ์ด้วยตาเปล่า โดยทำ 10-fold dilution ใช้ไมโครไปเตดปลอดเชื้อดูด suspension เชื้อที่ 4 ระดับการเจือจางคือ 10^8 , 10^{10} , 10^{12} และ 10^{14} ปริมาตรระดับละ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) แล้วกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารและนำมาคำนวณเป็นหน่วย cfu/ml

(2) ลักษณะการละลายน้ำของสารพาผสมเชื้อปฏิปักษ์ โดยประเมินความสามารถในการละลายน้ำของสารพาผสมเชื้อปฏิปักษ์หลังผสมน้ำทันที

อัตรา สารพาสเมซ็อปปิกซ์ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร จัเวลาการละลายน้ำของสารพาสเมซ็อปปิกซ์ ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 1 ละลายน้ำภายใน 1-5 นาที ระดับ 2 ละลายน้ำภายใน 6-10 นาที ระดับ 3 ละลายน้ำภายใน 11-30 นาที ระดับ 4 ละลายน้ำภายใน 30-60 นาที และระดับ 5 ไม่ละลายน้ำ เกษตวัเป็นกลุ่มด้านบนผิวน้ำ

(3) ลักษณะการแขวนลอยในน้ำของ สารพาสเมซ็อปปิกซ์ โดยประเมินความสามารถการแขวนลอยในน้ำของสารพาสเมซ็อปปิกซ์หลังผสม น้ำทันที อัตราสารพาสเมซ็อปปิกซ์ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร จัเวลาการตกตะกอนของสารพาสเมซ็อปปิกซ์ ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 1 ตกตะกอนหมดภายในเวลา 12 ชั่วโมง ระดับ 2 ตกตะกอนหมดภายในเวลา 30-60 นาที ระดับ 3 ตกตะกอนหมดภายในเวลา 11-30 นาที ระดับ 4 ตกตะกอนหมดภายในเวลา 5-10 นาที และระดับ 5 ตกตะกอนหมดภายในเวลา 1-5 นาที

(4) ลักษณะการจับใบของสารพาสเมซ็อปปิกซ์ โดยนำสารพาสเมซ็อปปิกซ์จากแต่ละกรรมวิธี 20 กรัม ละลายน้ำ 20 ลิตร พ่นใบผักคะน้าที่มีขนาดความกว้างใบ 6 เซนติเมตร และความยาวใบ 12 เซนติเมตร ผึ่งลมให้แห้ง 6 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างใบด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ตรวจสอบปริมาณเชื้อปฏิกษ TU-Orga1 ด้วยการทำ 10-fold dilution และกระจายบนผิวน้ำอาหาร ดังรายละเอียดข้อ 2.2.1 (1)

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

2.2.2 การพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบ

(1) ทดสอบอายุเก็บรักษา โดยนำเซลล์แขวนลอยของ TU-Orga1 (10^{13} cfu/ml) ปริมาตร 20

มิลลิลิตร ผสมลงในส่วนประกอบของชีวภัณฑ์ซึ่งประกอบด้วยสารพาสตามกรรมวิธีต่าง ๆ ในข้อ 2.2.1 และสารเสริมประสิทธิภาพ ได้แก่ FeSO_4 และน้ำตาลกลูโคส สัดส่วน สารพาส : FeSO_4 : น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 80:1:19 เปรอร์เซนต์โดยน้ำหนัก เก็บรักษาชีวภัณฑ์ในช่องอุณหภูมิเย็นพอยล์ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 เดือน ประเมินสมบัติ 4 ด้าน ดังรายละเอียดข้อ 2.2.1

(2) ทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า โดยประเมินประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ต้นแบบอายุ 24 เดือน ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้าและการควบคุมโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ในเรือนปลูกพืชทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 6×3 factorial กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A มี 6 กรรมวิธี ได้แก่ (1) เชื้อสด TU-Orga1 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml (2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิกษ TU-Orga1 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (3) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิกษสายพันธุ์ทางการค้า 20 กรัม/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) น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปัจจัย B มี 3 เชื้อโรคเป้าหมาย ได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ตามลำดับ ทุกกรรมวิธีคลุกเมล็ดด้วยสิ่งทดลองต่าง ๆ ตามกรรมวิธี 1-6 ตามความเข้มข้นที่แสดงไว้ข้างต้น อัตรา เมล็ดพันธุ์ : สิ่งทดลองต่าง ๆ ที่ใช้คลุกเมล็ด เท่ากับ 1 กิโลกรัม : 50 มิลลิลิตร ผึ่งไว้ให้หมาด จึงนำไปปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว บรรจุดิน 2 กิโลกรัม กระถางละ

5 เมล็ด ทุกกระถางหลังหว่านเมล็ดผักคะน้าจะคลุมด้วยฟางข้าวเพื่อป้องกันนกจิกกินเมล็ดพืชและรักษาความชุ่มชื้นของดิน รดน้ำวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น รวมทั้งมีการกำจัดวัชพืชด้วยการถอน เมื่อผักคะน้าอายุ 14 และ 28 วัน วิเคราะห์การเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด/ต้น และน้ำหนักแห้ง/ต้น และเมื่อผักคะน้าอายุ 29 วัน แบ่งต้นคะน้าออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 60 ต้น แต่ละชุดพ่นต้นพืชด้วยสิ่งทดลองต่าง ๆ ตามกรรมวิธี 1-6 ตามความเข้มข้นที่แสดงไว้ข้างต้น อัตราต้นละ 20 มิลลิลิตร และเมื่อผักคะน้าอายุ 30 วัน ชุดที่ 1 ปลูกลงเชื้อ Xcc (1×10^8 cfu/ml) ชุดที่ 2 ปลูกลงเชื้อ Ecc (1×10^8 cfu/ml) และชุดที่ 3 ปลูกลงเชื้อ *Alternaria* spp. (1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) ด้วยวิธีการพ่นใบ อัตราต้นละ 20 มิลลิลิตร และคลุมถุงเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความรุนแรงโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (disease severity) โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ใบทั้งหมด หลังปลูกลงเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน [3] ส่วนโรคเน่าและวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การพบโรค (disease incidence) หลังปลูกลงเชื้อเป็นเวลา 1-5 วัน [17] นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

2.3 การศึกษาสมบัติของชีวภัณฑ์ต้นแบบในการชักนำภูมิคุ้มกันพืช

2.3.1 วิเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA)

เก็บใบผักคะน้า 0.1 กรัม จากแต่ละซ้ำในแต่ละกรรมวิธีในข้อ 2.2.2 (2) ทั้ง 3 ชุดการทดลอง อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 9 วัน เริ่มตั้งแต่อายุ 27-35 วัน มาบดใน homogenization buffer (tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7, KCl ความเข้มข้น 0.1 M, PMSF

ความเข้มข้น 1 mM, leupeptin ความเข้มข้น 1 μ g/ml, Triton X-100 ความเข้มข้น 1 %, PVPP ความเข้มข้น 3 %) ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำ homogenate ที่สกัดได้จากผักคะน้า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 535 nm (Specphotometer รุ่น EC1011) โดยใช้หลักการความเข้มของสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร IAA กับกรด sulfuric (colorimeter) คำนวณปริมาณสาร IAA เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [9] วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

2.3.2 วิเคราะห์ superoxide dismutase (SOD)

เก็บใบผักคะน้า 3 กรัม จากแต่ละซ้ำในแต่ละกรรมวิธีในข้อ 2.2.2 (2) ทั้ง 3 ชุดการทดลอง อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 9 วัน เริ่มตั้งแต่อายุ 27-35 วัน มาบดใน homogenization buffer ที่เย็นจัด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนใสปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ และดูด suspension 200 ไมโครลิตร มาผสมกับ riboflavin solution 800 ไมโครลิตร นำไปวางใต้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ 15 วัดได้นาน 10 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าโดยใช้สมการ standard curve ตามวิธีการดัดแปลงของ [19] วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

2.3.3 วิเคราะห์ salicylic acid (SA)

นำ homogenate ที่สกัดได้ในแต่ละกรรมวิธีในข้อ 2.3.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสาร 0.02 M ferric ammonium sulfate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มไว้สภาพอุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยแสดงค่าเป็น มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด [20] เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามสมการ คือ $Y = 0.114X + 0.049$ โดย Y = ปริมาณการสะสมของ SA และ X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ต้นแบบของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการใช้ร่วมกับการปลูกผักคะน้าของเกษตรกร

ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 อายุ 24 เดือน ในแปลงปลูกผักคะน้าของเกษตรกร อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2558 ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี คือ (1) การคลุมเมล็ดและพ่นใบด้วยเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 มิลลิกรัม/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน (2) การคลุมเมล็ดและพ่นใบด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน (3) การคลุมเมล็ดและพ่นใบด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์การค้า (อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน (4) การคลุมเมล็ดและพ่นใบด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) ร่วมกับแมนโคเซ็บ (อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน (5) กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร คือ

การพ่นน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองจากมะละกอสุกและเศษผัก (อัตรา 20 มิลลิกรัม/น้ำ 20 ลิตร) 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน และ (6) กรรมวิธีควบคุม ไม่คลุมเมล็ดและไม่พ่นใบ ทุกกรรมวิธีถูกวางแผนการทดลองแบบ RCB แบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 4 x 6 เมตร กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จำนวน 24 แปลง โดยเกลี่ยดินให้ทุกแปลงย่อยมีความสม่ำเสมอ กัน ภายใต้ปัจจัยควบคุมคือ ทุกแปลงหลังหว่านเมล็ดผักคะน้าจะคลุมแปลงปลูกด้วยฟางข้าวเพื่อป้องกันนกจิกกินเมล็ดพืชและรักษาความชุ่มชื้นของแปลงปลูก รดน้ำวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น รวมทั้งมีการกำจัดวัชพืชด้วยการถอน และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 15 กิโลกรัม/แปลงย่อย แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กิโลกรัม เมื่อพืชอายุ 15, 20 และ 28 วัน เก็บข้อมูลด้านการเจริญเติบโตจากผักคะน้า 20 ต้น/แปลงย่อย ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้น ปริมาณผลผลิตก่อนตัดแต่งและหลังตัดแต่ง รวมทั้งสำรวจปริมาณการเกิดโรคพืชและความรุนแรงโรคในสภาพธรรมชาติ ทุก 7 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว โดยการนับด้วยตาเปล่า ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแต่ละชนิดที่สำรวจพบ จะคำนวณจากสมการ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%) = (จำนวนต้นที่พบโรคระบาด ÷ จำนวนต้นที่สำรวจทั้งหมด) x 100

สำหรับความรุนแรงโรค คำนวณจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ใบทั้งหมด [17] ของผักคะน้า วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป [16]

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการคัดเลือกชนิดของสารพา

ผลการคัดเลือกสารพาชนิดต่างๆ เพื่อนำมา

ผสมกับเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 และเก็บรักษาไว้นาน 12 เดือน พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สามารถอยู่ร่วมกับสารพาทุกชนิดได้อย่างไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาสมบัติอื่น ๆ อีก 3 ด้าน พบว่า kaolin + potassium humate จัดเป็นสารพาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดไม่แตกต่างทางสถิติกับ kaolin เพียงอย่างเดียว แต่แตกต่างทางสถิติกับสารพาชนิดอื่น ๆ โดยพบว่า kaolin ละลายน้ำภายใน 6-10 นาที ตกตะกอนหมดภายในเวลา 30-60 นาที และทำให้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 จับไปได้ 2.3×10^9 cfu/ml และ

kaolin + potassium humate ละลายน้ำภายใน 6-10 นาที ตกตะกอนหมดภายในเวลา 30-60 นาที และทำให้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 จับไปได้ 2.1×10^9 cfu/ml ขณะที่ talcum, dolomite, talcum + potassium humate และ dolomite + potassium humate เป็นสารพาที่ไม่ละลายน้ำ และมีสมบัติในการแขวนลอยอยู่ในน้ำตั้งแต่ระดับ 3 ถึง 5 กล่าวคือ ตกตะกอนหมดภายในเวลา 11-30 นาที ถึงตกตะกอนหมดภายในเวลา 1-5 นาที (ตารางที่ 1) จึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นสารพา

ตารางที่ 1 ผลการคัดเลือกสารพาชนิดต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ของเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1

ชนิดของสารพา	สมบัติของสารพาชนิดต่าง ๆ			
	ความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ในสารพา (cfu/ml)	ลักษณะการละลายน้ำ	ลักษณะการแขวนลอยในน้ำ	ลักษณะการจับใบ (cfu/ml)
Talcum	2.5×10^{12}	5	3	2.2×10^8 b
Kaolin	2.5×10^{12}	2	2	2.3×10^9 a
Dolomite	2.5×10^{12}	5	5	2.4×10^7 c
Talcum + Potassium humate	2.5×10^{12}	5	4	2.5×10^8 b
Kaolin + Potassium humate	2.5×10^{12}	2	2	2.1×10^9 a
Dolomite + Potassium humate	2.4×10^{12}	5	5	2.1×10^8 b

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test

3.2 ผลการพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบ

ผลของการพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบชนิดผงจำนวน 6 สูตร จากการผสมสารพาแต่ละชนิดเข้ากับสารเสริมประสิทธิภาพ สัดส่วนสารพา : FeSO_4 : glucose เท่ากับ 80 : 1 : เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก และเก็บรักษาในช่องอุณหภูมิเย็นมพอยล์ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 เดือน โดยสูตรที่ 1 ประกอบด้วย talcum + FeSO_4 + glucose สูตรที่ 2 ประกอบด้วย

kaolin + FeSO_4 + glucose สูตรที่ 3 ประกอบด้วย dolomite + FeSO_4 + glucose สูตรที่ 4 ประกอบด้วย talcum + potassium humate + FeSO_4 + glucose สูตรที่ 5 ประกอบด้วย kaolin + potassium humate + FeSO_4 + glucose และสูตรที่ 6 ประกอบด้วย dolomite + potassium humate + FeSO_4 + glucose พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สามารถอยู่ร่วมกับชีวภัณฑ์ต้นแบบชนิดผงทุกสูตรได้

อย่างไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยคงความมีชีวิตรอด 10^{10} cfu/ml จากปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ตั้งต้น 10^{13} cfu/ml เมื่อพิจารณาสมบัติอื่น ๆ อีก 3 ด้านพบว่าสูตรที่ 2 มีประสิทธิภาพดีที่สุดไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรที่ 5 แต่แตกต่างทางสถิติกับสูตรอื่น ๆ โดยพบว่าทั้งสูตรที่ 2 และ 5 ละลายน้ำภายใน 6-10 นาที ตกตะกอนหมดภายในเวลา 30-60 นาที และทำให้เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 จับไปได้ 2×10^8 cfu/ml ในขณะที่สูตรอื่น ๆ ไม่ละลายน้ำ และมีสมบัติ

ในการแขวนลอยอยู่ในน้ำตั้งแต่ระดับ 3-5 กล่าวคือ ตกตะกอนหมดภายในเวลา 11-30 นาที ตกตะกอนหมดภายในเวลา 5-10 นาที และตกตะกอนหมดภายในเวลา 1-5 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จึงเลือกชีวภัณฑ์ต้นแบบสูตรที่ 5 เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ควบคุมโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผักคะน้าต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบสมบัติด้านต่าง ๆ ของชีวภัณฑ์ต้นแบบชนิดผงสูตรต่าง ๆ ของเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 ซึ่งมีอายุการเก็บรักษานาน 24 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง

องค์ประกอบของชีวภัณฑ์สูตรต่าง ๆ	สมบัติของสารพหุชนิดต่าง ๆ			
	ความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการอยู่ในสารพา (cfu/ml)	ลักษณะการละลายน้ำ	ลักษณะการแขวนลอยในน้ำ	ลักษณะการจับใบ (cfu/ml)
1. Talcum + FeSO ₄ + Glucose	1.9×10^{10}	5	3	2×10^7 b
2. Kaolin + FeSO ₄ + Glucose	2×10^{10}	2	2	2×10^8 a
3. Dolomite + FeSO ₄ + Glucose	1.8×10^{10}	5	5	1×10^6 c
4. Talcum + Potassium humate + FeSO ₄ + Glucose	1.8×10^{10}	5	4	2×10^7 b
5. Kaolin+ Potassium humate + FeSO ₄ + Glucose	2.1×10^{10}	2	2	2×10^8 a
6. Dolomite + Potassium humate + FeSO ₄ + Glucose	2×10^{10}	5	5	2×10^7 b

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test

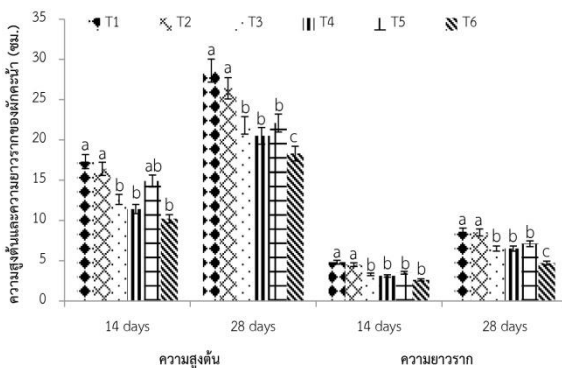
3.3 ผลของชีวภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ควบคุมโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านทานของคะน้าในเรือนปลูกพืชทดลอง

3.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผง สูตร 5 kaolin + potassium humate + FeSO₄ + glucose (T2) ซึ่ง

คัดเลือกมาจากผลการศึกษาข้อ 3.2 เนื่องจากมีสมบัติที่ดีตรงตามลักษณะของชีวภัณฑ์ที่ควรมี [11] ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้า เปรียบเทียบกับเชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) พบว่า T2 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้าได้ดีทัดเทียมกับ T1 ในทุก

ตัวชี้วัด และดีกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างแตกต่างทางสถิติ ตลอดระยะเวลาทดลอง โดย T2 และ T1 ส่งเสริมให้ค่น้ำอายุ 14 วัน มีความสูงต้น 16.4 และ 17.3 เซนติเมตร ความยาวราก 4.5 และ 4.8 เซนติเมตร น้ำหนักสด 11.1 และ 11.3 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้ง 3.2 และ 3.1 กรัม/ต้น ตามลำดับ ขณะที่ T3 และ T4 ส่งผลให้ค่น้ำอายุ 14 วัน มีความสูงต้น 12.6 และ 11.4 เซนติเมตร ความยาวราก 3.3 และ 3.1 เซนติ เมตร น้ำหนักสด 7.9 และ 7.2 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้ง 2.0 และ 1.9 กรัม/ต้น ตามลำดับ

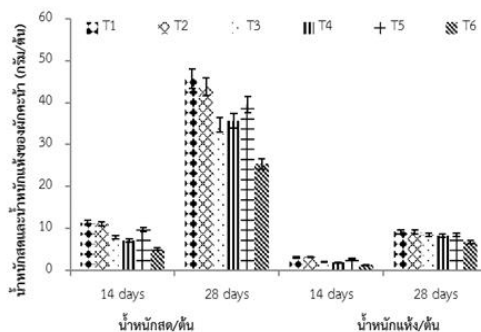


รูปที่ 1 ผลของการคลุกเมล็ดผักค่น้ำด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อความสูงต้นและความยาวรากของผักค่น้ำในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

3.3.2 ผลการควบคุมโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ โรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (kaolin + potassium humate + FeSO_4 + glucose) ในการควบคุมโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย

และเมื่อผักค่น้ำอายุ 28 วัน T2 และ T1 ส่งผลให้ผักค่น้ำมีความสูงต้น 26.4 และ 28.6 เซนติเมตร ความยาวราก 8.5 และ 8.6 เซนติเมตร น้ำหนักสด 43.7 และ 45.6 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้ง 9.1 และ 9.2 กรัม/ต้น ตามลำดับ ในขณะที่ T3 และ T4 ส่งผลให้ค่น้ำอายุ 28 วัน มีความสูงต้น 21.8 และ 20.5 เซนติเมตร ความยาวราก 6.5 และ 6.5 เซนติ เมตร น้ำหนักสด 34.8 และ 35.7 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้ง 8.5 และ 8.3 กรัม/ต้น ตามลำดับ (รูปที่ 1 และ 2)

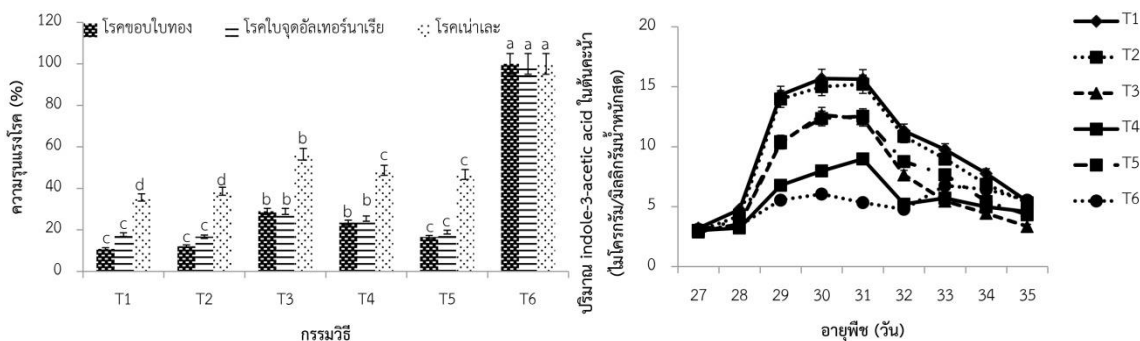


รูปที่ 2 ผลของการคลุกเมล็ดผักค่น้ำด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้นของผักค่น้ำในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ของผักค่น้ำ พบว่าเชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) และชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบทองและโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียได้ดีที่สุดทัดเทียมกับการใช้สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) แต่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมี

ป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) และกรรมวิธีควบคุม (T6) (รูปที่ 3) ยิ่งไปกว่านั้น เชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) และชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและได้ดีที่สุด

แตกต่างทางสถิติกับการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4 และ T5) และกรรมวิธีควบคุม (T6) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการควบคุมโรคขอบใบทอง โรคใบจุดอัลเทอร์เนเรีย และโรคเน่าและของผักคะน้าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

รูปที่ 4 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม indole-3-acetic acid ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

3.4 ผลการชักนำภูมิต้านทานต่อโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์เนเรีย

3.4.1 ผลการวิเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) ภายในผักคะน้า

ผลการวิเคราะห์ IAA ในผักคะน้าหลังการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ เมื่อคะน้าอายุ 29 วันหลังปลูก ด้วยเชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) และชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ สำหรับควบคุมโรคขอบใบทอง

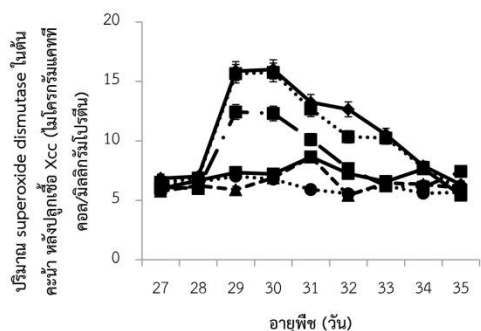
และโรคเน่าและ หรือแมนโคเซ็บ สำหรับควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์เนเรีย (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) พบว่า T1 และ T2 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักคะน้าสะสม IAA ได้ดีที่สุทธอย่างแตกต่างทางสถิติ ได้ตั้งแต่วันแรกที่พ่นใบผักคะน้า (อายุ 29 วันหลังปลูก) จนกระทั่งผักคะน้าอายุ 33 วัน รวมเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งพบว่าผักคะน้าใน T1 และ T2 มีปริมาณ IAA ในวันที่ 29-33 เท่ากับ 14.32 และ 13.98, 15.68 และ 15.01, 15.64 และ 15.21, 11.32 และ 10.87 และ 9.76 และ 8.97

ไมโครกรัม/มิลลิกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตดังกล่าวไว้ในผลการทดลองข้อ 3.3.1 และ รูปที่ 1 และ 2

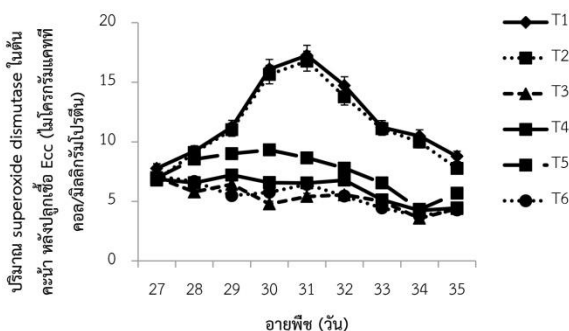
3.4.2 ผลการวิเคราะห์ superoxide dismutase (SOD)

ผลการวิเคราะห์ SOD ในผักคะน้า หลังการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ เมื่อคะน้าอายุ 29 วันหลังปลูก ด้วยเชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) และชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ Xcc สาเหตุโรคขอบใบทอง เชื้อ Ecc สาเหตุโรคเน่าและ และเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์สำหรับควบคุมโรคขอบใบทองและโรคเน่า

และ หรือแมนโคเซ็บสำหรับควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (T6) พบว่า T1 และ T2 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักคะน้าสะสม SOD ซึ่งเป็นสารตัวกลางในระบบภูมิคุ้มกันพืช เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ Xcc สาเหตุโรคขอบใบทองได้ดีที่สุดอย่างแตกต่างทางสถิติ ได้ตั้งแต่วินแรกที่พ่นใบผักคะน้า (อายุ 29 วันหลังปลูก) จนกระทั่งผักคะน้ามีอายุ 33 วันหลังปลูก รวมเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งพบว่าผักคะน้าใน T1 และ T2 มีปริมาณ SOD ในวันที่ 29-33 เท่ากับ 15.87 และ 15.65, 16.01 และ 15.76, 13.24 และ 12.67, 12.65 และ 10.34, และ 10.54 และ 10.24 ไมโครกรัมแคททีคอล/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่ก่อนการพ่นใบผักคะน้า พบว่า T1 และ T2 คะน้ามีการสะสม SOD



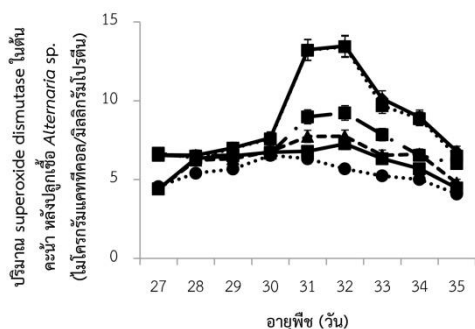
รูปที่ 5 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม superoxide dismutase ด้านทานเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทอง ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง



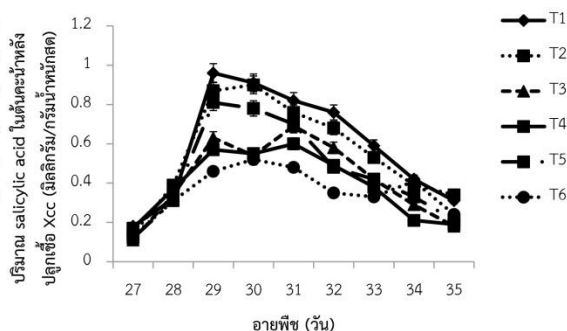
รูปที่ 6 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม superoxide dismutase ด้านทานเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) สาเหตุโรคเน่าและ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

เพียง 7.01 และ 6.87 ไมโครกรัมแคททีคอล/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 5) อีกทั้ง T1 และ T2 ยังส่งผลให้ผักคะน้ามีการสะสม SOD สูงอย่างแตกต่างทางสถิติ ในช่วงที่มีอายุ 29-35 วันหลังปลูก เพื่อดำเนินการเข้าทำลายของเชื้อ *Ecc* สาเหตุโรคเน่าและโดยวันที่คะน้ามีการสะสม SOD สูงสุดคือ วันที่ผักคะน้ามีอายุ 31 วันหลังปลูก โดย T1 และ T2 มีการสะสม SOD เท่ากับ 17.25 และ 16.78 ไมโครกรัมแคททีคอล/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 6) นอกจากนี้ T1 และ T2 ยังส่งผลให้ผักคะน้ามีการ

สะสม SOD สูงอย่างแตกต่างทางสถิติ ในช่วงที่มีอายุ 31-34 วันหลังปลูก เพื่อดำเนินการเข้าทำลายของเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย โดยวันที่คะน้ามีการสะสม SOD สูงสุดคือ วันที่มีอายุ 32 วันหลังปลูก โดย T1 และ T2 มีการสะสม SOD เท่ากับ 13.48 และ 13.43 ไมโครกรัมแคททีคอล/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 7) ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการควบคุมโรคทั้ง 3 ดังกล่าวไว้ในผลการทดลองข้อ 3.3.2 และ รูปที่ 3



รูปที่ 7 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม superoxide dismutase ด้านทานเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง



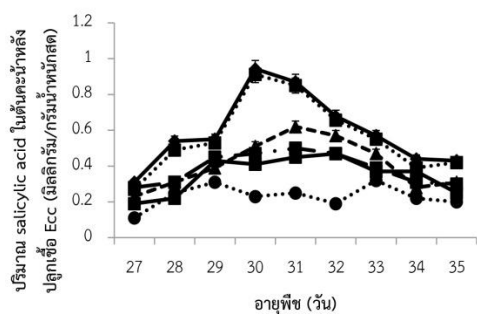
รูปที่ 8 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม salicylic acid ด้านทานเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคขอบใบทอง ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

3.4.3 ผลการวิเคราะห์ salicylic acid (SA) โดยผลการวิเคราะห์ SA ในผักคะน้า หลังการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ เมื่อคะน้าอายุ 29 วัน ด้วย

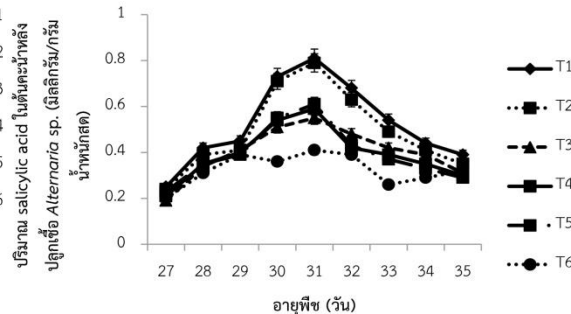
เชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) และชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ Xcc สาเหตุโรคขอบใบทอง เชื้อ *Ecc* สาเหตุโรคเน่า

และเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์สำหรับควบคุมโรคขอบใบทองและโรคเน่าและ หรือแมนโคเซ็บสำหรับควบคุมโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) พบว่า T1 และ T2 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักคะน้าสะสม SA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในระบบภูมิคุ้มกันพืชอีกสารหนึ่ง เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *Xcc* สาเหตุโรคขอบใบทองได้ดีที่สุดอย่างแตกต่างทางสถิติ ได้ภายใน 1 วัน (วันที่คะน้าอายุ 29 วัน) ที่พ่นใบผักคะน้า ซึ่งพบว่า T1 และ T2 คะน้ามีปริมาณ SA เท่ากับ 0.96 และ 0.87 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 8) ขณะที่ก่อนการพ่นใบผักคะน้า T1 และ T2 มีการ

สะสม SA เพียง 0.32 และ 0.39 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 8) อีกทั้ง T1 และ T2 ยังส่งผลให้ผักคะน้ามีการสะสม SA สูงสุดอย่างแตกต่างทางสถิติ ภายใน 2 วัน หลังพ่นใบผักคะน้า เพื่อดำเนินงานการเข้าทำลายของเชื้อ *Ecc* สาเหตุโรคเน่าและ ซึ่งพบว่า T1 และ T2 มีการสะสม SA เท่ากับ 0.94 และ 0.91 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด (รูปที่ 9) ขณะที่ก่อนการพ่นใบผักคะน้า T1 และ T2 มีการสะสม SA เพียง 0.55 และ 0.53 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 9) นอกจากนี้ T1 และ T2 ยังส่งผลให้ผักคะน้ามีการสะสม SA สูงสุดอย่างแตกต่างทางสถิติ ภายใน 3 วัน หลังพ่นใบผักคะน้า เพื่อดำเนินงานการเข้าทำลายของเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ซึ่งพบว่า T1 และ T2 มีการสะสม SA



รูปที่ 9 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม salicylic acid ด้านทานเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) สาเหตุโรคเน่าและ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง



รูปที่ 10 ผลของการคลุกเมล็ดและพ่นใบที่อายุ 29 วัน หลังปลูกด้วยเชื้อสดของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ทางการค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) สารสังเคราะห์ salicylic acid (T5) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (T6) ต่อการชักนำให้ผักคะน้าสะสม salicylic acid ด้านทานเชื้อ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

เท่ากับ 0.81 และ 0.87 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 10) ขณะที่ก่อนการพ่นใบผักคะน้า T1 และ T2 พบว่าคะน้ามีการสะสม SA เพียง 0.42 และ 0.39 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่ 10) ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการควบคุมโรคทั้ง 3 โรค ดังกล่าวไว้ในผลการทดลอง ข้อ 3.2 และ รูปที่ 3

3.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ต้นแบบเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการใช้ร่วมกับการปลูกผักคะน้าของเกษตรกร

ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 (T2) เข้าร่วมในการปลูกผักคะน้าเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์การค้า (T3) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (T4) กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (T5) และกรรมวิธีควบคุม ไม่คลุมเมล็ดและพ่นใบพืช (T6) พบว่าการคลุมเมล็ดผักคะน้าและพ่นใบด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร จำนวน 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน (T2) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณผลผลิตผักคะน้า ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เชื้อสดของ TU-Orga1 (T1) แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ โดย T2 และ T1 ทำให้ผักคะน้ามีความสูงต้น เท่ากับ 34.6 และ 35.7 เซนติเมตร ความยาวราก เท่ากับ 10.2 และ 10.5 เซนติเมตร น้ำหนักสด 52.4 และ 54.3 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้ง 13.2 และ 13.4 กรัม/ต้น ผลผลิตผักก่อนตัดแต่ง 915.6 และ 925.4 กิโลกรัม/ไร่ และผลผลิตหลังตัดแต่ง 735.2 และ 754.1 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ ขณะที่ T6 คะน้ามีความสูงต้น 24.6 เซนติเมตร ความยาวราก 7.2 เซนติเมตร น้ำหนักสด 37.9 กรัม/ต้น น้ำหนักแห้ง 7.9 กรัม/ต้น ผลผลิตก่อนตัดแต่ง และผลผลิตหลังตัดแต่ง 434.6 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ T2

และ T1 ยังสามารถลดการเกิดโรคและลดความรุนแรงของโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคเน่าเปื่อยที่เกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติได้ดีที่สุดอย่างแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ โดย T2 และ T1 พบการเกิดโรคขอบใบทอง 8.8 และ 7.7 % โรคเน่าและ 14.4 และ 12.1 % และโรคเน่าเปื่อย 13.3 และ 10.2 % ตามลำดับ (รูปที่ 11ก) และมีความรุนแรงโรคขอบใบทอง 9.9 และ 8.8 % โรคเน่าและ 12.1 และ 10.3 % และโรคเน่าเปื่อย 6.9 และ 5.8 % ตามลำดับ (รูปที่ 11ข) ขณะที่ T4 (การใช้คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ร่วมกับแมนโคเซ็บ) พบการเกิดโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคเน่าเปื่อย 15.7, 34.5 และ 28.9 % (รูปที่ 11ก) และมีความรุนแรงโรค 15.4, 18.8 และ 44.5 % (รูปที่ 11ข) และ T5 (กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร) พบการเกิดโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ และโรคเน่าเปื่อย 36.8, 25.7 และ 35.7 % (รูปที่ 11ก) และมีความรุนแรงโรค 32.6, 39.9 และ 45.7 % (รูปที่ 11ข)

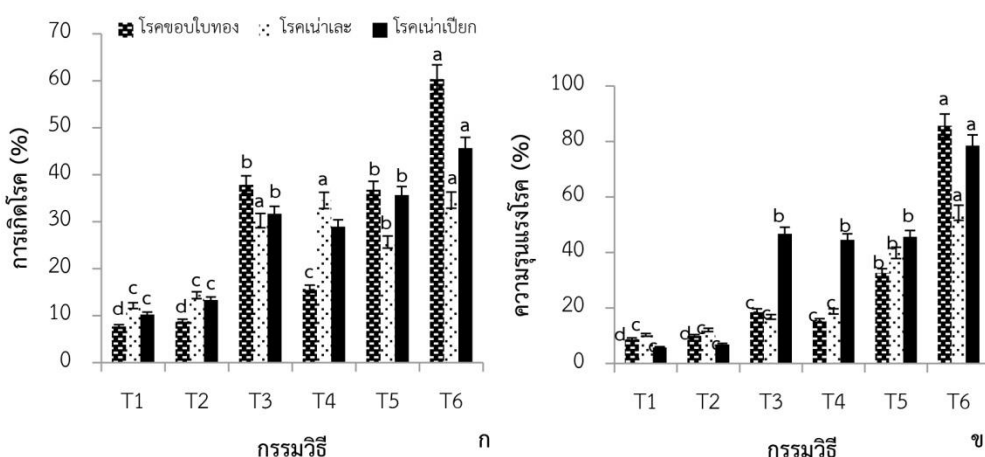
4. วิจารณ์

การควบคุมโรคพืชโดยใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างประสบความสำเร็จนั้น มีปัจจัยเกี่ยวข้องของหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาสูตรสำเร็จที่เชื้อปฏิปักษ์สามารถคงความมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ตลอดจนความสามารถในการครอบครองและการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัย โดยผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งรายงานประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคที่สำคัญของข้าว ได้แก่ โรคขอบใบแห้ง โรคใบขีดโปรงแสง โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบขีดสีน้ำตาล และโรคไหม้ [8-11] ตลอดจนการนำเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพชนิดน้ำร่วมกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Azotobacter* sp., *Saccharomyces*

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เข้าร่วมในการปลูกผักคะน้าในสภาพไร่

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักสด (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น)	ผลผลิตก่อนตัดแต่ง (กก./ไร่)	ผลผลิตหลังตัดแต่ง (กก./ไร่)
T1	35.67±0.057a	10.46±2.431a	54.30±2.222a	13.40±1.116a	925.43±2.334a	754.11±2.335a
T2	34.56±0.054a	10.21±1.234a	52.40±2.124a	13.20±1.231a	915.55±2.221a	735.23±2.876a
T3	27.54±0.081b	7.86±2.121b	44.70±1.897b	8.50±1.236b	854.78±3.115b	634.56±2.654b
T4	26.98±0.076b	7.81±3.236b	45.20±2.112b	8.40±2.110b	754.22±2.223bc	487.98±3.333c
T5	28.47±0.087b	8.54±1.118b	48.80±1.321b	11.60±2.054b	866.87±1.876b	653.47±2.341b
T6	24.58±0.342b	7.21±2.344b	37.90±1.118c	7.90±1.115b	654.12±1.985c	434.56±0.982c
C.V. (%)	15.67	23.54	32.32	25.41	36.71	34.34

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test



รูปที่ 11 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ต่อการเกิดโรค (ก) และความรุนแรง (ข) ของโรคขอบใบทอง โรคเน่าเละ และโรคเน่าเปื่อยของผักคะน้าในสภาพแปลงปลูกเกษตรกร

cerevisiae, *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. ทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟางข้าว โดยมีความเฉลี่ยค่าคงที่อัตราการย่อยสลายสูงและมีความถี่ชีวิตสั้นกว่ากรรมวิธีที่ฝังกลบฟางข้าวเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพดังกล่าวยังมีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในดินและเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุจากการย่อยสลายฟางข้าว เพื่อส่งเสริมการ

เจริญเติบโตต้นข้าวและเพิ่มผลผลิตข้าวอย่างยั่งยืน โดยส่งเสริมให้ต้นข้าวมีความสูงต้น จำนวนรากแขนง น้ำหนักสดต่อต้น น้ำหนักแห้งต่อต้น จำนวนต้นตอกต่อไร่ จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม [8] แสดงให้เห็นถึงแนวทางการพัฒนาชีวภัณฑ์จากเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุม

โรคของพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้ ซึ่งผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า การคลุกเมล็ดและการพ่นใบพืชด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผง มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้า และสามารถควบคุมโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ โรคเน่าเปียก และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรียของผักคะน้าได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ภายในชีวภัณฑ์ชนิดผงมีปริมาณลดลงระหว่างเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 เดือน จากปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ตั้งต้น 10^{13} เหลือ 10^{10} cfu/ml ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณการสร้างสปอร์และองค์ประกอบของชีวภัณฑ์ อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา ซึ่ง kaolin หรือ kaolin ผสม potassium humate จัดเป็นสารพาหะที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องมาจากลักษณะและสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของ kaolin และ potassium humate มีความคล้ายคลึงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของ *Bacillus subtilis* ในสภาพธรรมชาติของเชื้อปฏิปักษ์ [21]

ซึ่งสารพาหะและสารเสริมประสิทธิภาพจะทำหน้าที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งพลังงาน เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และสารอาหารรองต่าง ๆ รวมทั้งทำหน้าที่ในการดูดซับน้ำหรือความชื้น [22] โดยน้ำหรือความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญต่อการใช้อาหารและพลังงานของเชื้อปฏิปักษ์ การมีน้ำหรือความชื้นมากเกินไป จะส่งผลให้ชีวภัณฑ์เกิดความเหนียวเหนียวหนืด จำกัดการได้รับออกซิเจน และเพิ่มโอกาสให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น ๆ ขณะเดียวกันในสภาพออกซิเจนต่ำ จะจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อปฏิปักษ์ [23] เมื่อประเมินลักษณะการจับใบของชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผง หลังการพ่นใบผักคะน้าด้วยเชื้อปฏิปักษ์นาน 6 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สามารถยึดติดแน่นกับผิวใบผักคะน้าได้ โดยสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ TU-

Orga1 หลังล้างออกจากผิวใบผักคะน้าสูงถึง $10^6 - 10^8$ cfu/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่มากพอสำหรับการป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงกล่าวได้ว่าการพ่นใบพืช 6 ครั้ง ด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผง เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดต่าง ๆ ที่จะเข้าทำลายผักคะน้า นอกจากนี้ ช่วงเวลาที่ใช้ชีวภัณฑ์ จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการควบคุมโรค โดยเฉพาะในระยะที่พืชอ่อนแอและ/หรือสภาพแวดล้อมเหมาะสม ทั้งนี้ นอกจากเชื้อปฏิปักษ์จะเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดแล้ว TU-Orga1 ยังมีสมบัติเป็น plant growth promoting rhizosphere (PGPR) ที่สามารถกระตุ้นให้ผักคะน้าผลิต indole-3-acetic acid เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชให้พ้นระยะอ่อนแอและรอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช การคลุกเมล็ดด้วยชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผง จึงมีความจำเป็นในขั้นตอนแรกของการควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า ยิ่งไปกว่านั้นมียารายงานกลไกเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ในการกระตุ้นให้พืชผลิตสารต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ salicylic acid, β -1,3-glucanase, peroxidase, phenolic, guaiacol และ peroxidase รวมทั้งมีกลไกการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ [9-11] โดยเอนไซม์บางชนิดที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ phytoalexin และ pathogenesis-related protein ซึ่งมีความเป็นพิษสูงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช [24,25] และผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 สามารถชักนำให้ผักคะน้าสะสม SOD ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันโรคและแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย [14] ดังนั้นชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ TU-Orga1 ชนิดผงที่ได้จากการพัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้า รวมทั้งกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคขอบใบทอง โรคเน่าและ โรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย

และโรคเน่าเปียก และที่สำคัญ คือ ไม่มีองค์ประกอบของสารเคมี ง่ายต่อการใช้ และมีอายุการเก็บรักษายาวนานตรงตามสมบัติที่ดีที่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควรมี [15] อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสูตรสำเร็จจุลินทรีย์หรือคัดสรรองค์ประกอบของชีวภัณฑ์จำพวกสารเสริมประสิทธิภาพและสารจับใบที่ช่วยส่งเสริมการมีชีวิตรอดบนผิวใบพืช อีกทั้งสูตรอาหารเหลวเพิ่มปริมาณเชื้อปฏิปักษ์และ/หรือสูตรอาหารเพิ่มสปอร์ก่อนนำมาผสมกับสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพ ยังมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

- [1] Rimmer, R.S., Shattuck, V.I. and Buchwaldt, L., 2006, Compendium of brassica disease, The American Phytopathological Society Press, Minnesota, 117 p.
- [2] ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2527, โรคของผักและการป้องกันกำจัด, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [3] วิลาวรรณ เชื้อบุญ, 2551, การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคเน่าและของกะหล่ำดอกและการประเมินความเสี่ยง, ว.โรคพืช 21(1-2): 63-78.
- [4] Campbell, R., 1989, Biological control of microbial plant pathogens, Cambridge University Press, Cambridge, 232 p.
- [5] วรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง และวราภรณ์ สุทธิสา, 2548, การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์, น. 123-130, ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [6] พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิช และรัศมี รุติเกียรติพงศ์, 2551, การใช้ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ร่วมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการควบคุมโรคเมล็ดด่างของข้าว, น. 324-335, ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2551, โรงแรม ชลจันทร์ รีสอร์ท, ชลบุรี.
- [7] บุษราคัม อุดมศักดิ์, ญัญจิรา ไชยจิตเจริญกุล, บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และวรางคณา แซ่อึ้ง, 2556, การทดสอบประสิทธิภาพ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*, น. 470-478, ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.
- [8] จตุพร บุญณตากุล, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิณวัฒน์, 2555, เชื้อผสมหลายสายพันธุ์เพิ่มประสิทธิภาพการใช้ธาตุอาหารในดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวหอมมะลิอินทรีย์, น. 104-115, ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 10, 31 สิงหาคม 2555, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.
- [9] นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธิณวัฒน์, 2558, แบคทีเรียที่มีประโยชน์ชักนำการสะสมกาบาในเมล็ดข้าวกล้องงอกอินทรีย์, Thai J. Sci. Technol. 4(2): 123-132.
- [10] นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ลาวลย์ กลัดสุวรรณ, มะลิดา ชูรินทร์ และดุสิต อธิณวัฒน์,

- 2556, Yutl เป็นยีนใหม่ของ *Bacillus subtilis* TU-Orga1 ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ในโตรเจนอย่างเหมาะสมเพื่อยับยั้งโรคใบขีดโปร่งแสงในระบบการผลิตข้าวอินทรีย์, น. 116-126, ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51, 5-7 กุมภาพันธ์ 2556, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [11] ปาริชาติ สติธรรมพนา, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ ดุสิต อธิวัฒน์, 2555, ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ใหม่ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 180-188.
- [12] Athinuwat, D., Chuaboon, W., buensantei, N. and Prathuangwong, S., 2014, Efficiency of new plant growth promoting rhizobacteria on corn disease control, Afr. J. Microbiol. Res. 8: 710-717.
- [13] ประทุมพร ปลอดภัย, พงศธร ปรโลกานนท์ และ ดุสิต อธิวัฒน์, 2558, ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuate*) และหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ในระบบการผลิตคะน้า, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 914-923.
- [14] นลินา เหมสนิท, 2554, การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้คะน้าเกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 131 น.
- [15] Volgas, G.C., Downer, R.A. and Lopez, H.B., 2003, Pesticides formulations and application system, 23rd Volume, International Standards Worldwide, Pennsylvania, 261 p.
- [16] ชุศักดิ์ จอมพุก, 2551, สถิติการวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชไร่, ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม, 319 น.
- [17] ศศิธร วุฒิวิชัย, 2545, โรคของผักและการควบคุมโรค, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 174 น.
- [18] 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.
- [19] Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. and Kuc. J., 1982, Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, Physiol. Plant Pathol. 20: 73-82.
- [20] 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.
- [21] ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล และสุภาพร ไตรลักษณ์, 2554, ผลของตำรับชีวภัณฑ์ที่ผสมเชื้อ *Bacillus subtilis* BCB3-19 ต่อการเจริญระยะแรกของกวางตุ้งฮ่องเต้, ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 42(2): 293-296.
- [22] Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. and Samiyappan, R., 2004, Rhizobacteria-based bio-formula-

- tions for the management of fruit rot infection in chillies, Crop Protect. 23: 835-843.
- [23] Preecha, C. and Prathuangwong, S., 2009, Development of *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 formulation for control of soybean disease, In Proceedings of the ISSAAS International Conference, February, 23- 27, Bangkok.
- [24] Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E. and Fluhr, R., 1994, β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*, Plant Physiol. 104: 59-66.
- [25] Ramputh, A.I. and Bown, A.W., 1996, Rapid [gamma]-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae, J. Plant Physiol. 111: 1349-1352.