รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : **อารักขาพืช**

2. โครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนาการใช้ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช**

กิจกรรม : **การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development Powder Formulation of *Bacillus subtilis* DOA-WB4 for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Potato Bacterial Wilt Disease

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	บูรณี พั่ววงษ์แพทย์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ทิพวรรณ กันหาญาติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	รุ่งนภา ทองเครั่ง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 (BS DOA-WB4) มาพัฒนาเป็นสูตรผงสำเร็จอย่างง่าย เพื่อใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของมันฝรั่ง โดยใช้ผงแป้งทัลคัม (Talcum) เป็นสารพาในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่มีปริมาณเชื้อ *B. subtilis* 4.3×10^{10} หน่วยโคโลนี/กรัม ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงนี้ เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ15 เดือนที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในเรือนทดลองได้ 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองที่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการทดสอบอัตราที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยว พบว่าการรด BS DOA-WB4 อัตรา 30, 40, 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และการใส่ BS DOA-WB4 อัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 และการรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด และทำการทดสอบวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยว พบว่าการแช่หัวพันธุ์ การรองก้นหลุม และการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูก และรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 เมื่อนำ

ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงไปทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่าแปลงที่แช่หัวพันธุ์ และรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ และแปลงเปรียบเทียบ (control) เป็นโรคเหี่ยว 83.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในอัตรานี้ไม่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสภาพแปลงเกษตรกรได้

The development of powder formulation of *Bacillus subtilis* strain DOA-WB4 (BS DOA-WB4) was carried out for the control of potato wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Talcum was used at 1:4 (V/W) and the concentration of *B. subtilis* strain DOA-WB4 at 4.3×10^{10} CFU/g was obtained. The powder formulation of *Bacillus subtilis* strain DOA-WB4 could be stored at room temperature for 12 months and at 4-6 °C for 15 months respectively. The efficacy to control potato wilt disease in the greenhouse by the powder formulation was 60%. The powder formulation of BS DOA-WB4 was further evaluated in the field trial at Fang district, Chiangmai province. In trial to determine the effective application rate, application of the powder formulation of BS DOA-WB4 at 30, 40, 50 g/20L of water as soil drench or top dressing at 1 g/plant every 7 days reduced the disease significantly compare with the untreated control. Soil drenching at 50 g/20L gave the best result. For the trial to determine effective application method, seed soaking, subsoil application, seed treatment and soil drenching at 50 g/20L of water every 7 days could reduce the disease effectively. However, in the farmer's field trial, the percentage of diseased plants in the plots applied with powder formulation of *Bacillus subtilis* strain DOA-WB4 at 50 g/20L of water as soil drench every 7 days was 76.5% which was not significantly different from the untreated control plots where the percentage of diseased plants was 83.5%. Therefore, the application of the powder formulation of *Bacillus subtilis* strain DOA-WB4 at this rate could not control the disease in the farmer's field trial.

6. **คำนำ**

แบคทีเรีย *R. solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ *Solanaceae* (Hayward, 1964) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่แบคทีเรียเข้าทำลาย สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทาง

การเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรียจนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ มีอยู่มากมายทั้งในดิน ตามผิวพืชและแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและสามารถแยกได้ง่าย และเจริญได้รวดเร็วที่บริเวณรากพืช นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Baker and Cook, 1974) มีรายงานการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ Celino and Gotllieb (1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* B_3 A ใส่ลงในดินที่มีแบคทีเรียสาเหตุโรค สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้และลดการเกิดโรคจาก 70 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ Aspiras and de la Cruz (1985) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* FU 6 และ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และมันฝรั่ง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญที่บริเวณรากของต้นกล้าได้ดี และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ Karuna *et al.* (1997) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธี ได้แก่ *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าแบคทีเรีย *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *B. subtilis* เมื่อนำไปใช้ในเรือนทดลอง พบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศที่เจริญเติบโตในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดี Sanaina *et al.* (1997) ศึกษาแบคทีเรียจากบริเวณรากของต้นมันฝรั่งโดยแยกแบคทีเรียจากรากของต้นปกติและรากของต้นที่เป็นโรค นำมาคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus, B. subtilis* และ *Enterobacter cloaceae* ที่แยกได้จากรากมันฝรั่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการศึกษากับดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* 3 แห่งของประเทศอินเดีย คือ เมือง Bhowali Palampur และ Bhubaneswar สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83 เปอร์เซ็นต์, 27-70 เปอร์เซ็นต์ และ 24-71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าที่เมือง Bhowali และ Bhubaneswar มีผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 160 เปอร์เซ็นต์ Guo *et al.* (2002) รายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* สายพันธุ์ J3, แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ BB11 และ FH17 ที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้ต้นพริก (Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยของวงศ์ และคณะ (2548) ซึ่งได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค และพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สามารถป้องกันและควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงที่ใช้ง่ายและสะดวกในการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่งในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ โดยมุ่งเน้นการศึกษา สูตรอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากนั้นนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว ในแปลงปลูกมันฝรั่ง รวมทั้งติดตามตรวจสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียและอายุของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาพต่างๆ และพัฒนาสูตรสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สำหรับนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกในระดับแปลงปลูก

7. **วิธีดำเนินการ** :

- อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกแบคทีเรีย

2.อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้แช่แข็ง (Freezer) –20 องศาเซลเซียส

3.เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter, Shaker, Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi model 2001

4.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

5.วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางดินเผา ปุ๋ย สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช และหัวพันธุ์มันฝรั่ง

- วิธีการ

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 (BS DOA-WB4) สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง

1.1 การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4

การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่าย เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ carboxymethylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่ผลิตได้ นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง จำนวน 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

2.1 การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum*

เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.1156 บนอาหารแข็ง PSA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลแบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายแบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายแบคทีเรียไปผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อดิน 8 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำดินที่บ่มเชื้อไว้มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัมต่อกระถาง จำนวน 120 กระถาง

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในโรงเรือนทดลอง

นำหัวพันธุ์มันฝรั่งมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ก่อนนำมาคลุกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 1×10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่ได้คลุกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 7 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินที่ใช้ปลูกมันฝรั่งทุก 7 วัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยอบดินด้วยยูเรียผสมกับปูนขาวอัตรา 80 ต่อ 800 กิโลกรัม ต่อพื้นที่ 1 ไร่ เพื่อฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่ในดิน หลังจากอบดิน 3 สัปดาห์ จึงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ 1 เดือน เมื่อต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยว จึงสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในดิน จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 3.2x4 เมตร จำนวน 20 แปลง โดยใช้หัวพันธุ์จำนวน 80 หัวต่อ 1 แปลงย่อย

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 5 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาวิธีการใช้ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่หัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รองก้นหลุมก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1% โดยน้ำหนัก (10 กรัม/มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30 วัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร

ทำการทดสอบในแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ขนาด 2 งาน โดยการเลือกแปลงปลูกมันฝรั่งที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ทำการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง

ทำการทดลอง โดยแบ่งแปลงทดลองเป็น 2 แปลง ขนาดแปลงละ 1 งาน คือ

แปลงที่ 1 ทำการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง โดยแช่หัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หลังปลูกรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน

แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ ปลูกด้วยหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่ได้แช่ด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงก่อนปลูก และใช้น้ำเปล่ารดต้นมันฝรั่งแทนการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล นำค่าการประเมินระดับความรุนแรงของโรคที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

- **เวลาและสถานที่**

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2558 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แปลงปลูกมันฝรั่งที่ศูนย์วิจัยการเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ และแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง

1.1 การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4

ทำการเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหารแข็ง TSA ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1M carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5% และสารพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่ผลิตได้ โดยนำส่วนผสมผงสำเร็จแบคทีเรีย 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่เตรียมจากอาหารแข็ง TSA คือ 4.3×10^{10} หน่วยโคโลนี/กรัม

1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มี

ชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 3 โดยลดลงจาก $2.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือ $3.5x10^{9}$ หน่วยโคโลนี/กรัม และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 จาก $2.6x10^{8}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือเพียง $1.1x10^{2}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่เก็บไว้ในตู้เย็นยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือน โดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย จากปริมาณเริ่มต้น $4.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ลดลงเหลือ $7.8x10^{7}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ในเดือนที่ 15 (Table 1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ $4.6x10^{6}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม พบว่าประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง ควบคุมโรคได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* $3.5x10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง $5.6x10^{3}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรคเหี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* $7.7x10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 2)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยปลูกมันฝรั่งตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลองไว้ และตรวจสอบจำนวนต้นมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยวทุก 30 วัน พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ดีที่สุด มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 16.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 และ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้นทุก 7 วัน ที่เป็นโรคเหี่ยว 26.3, 44.1 และ 47.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคเหี่ยวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง ซึ่งเป็นโรคเหี่ยว 75.9 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.4x10^{2}$, $4.2x10^{3}$ และ $7.3x10^{3}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $3.2x10^{2}$, $5.3x10^{3}$ และ $3.7x10^{4}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ

$4.6x10^3$, $5.4x10^5$ และ $8.4x10^5$ ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.2x10^2$, $4.2x10^3$ และ $6.6x10^3$ ตามลำดับ (Table 4)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.9x10^5$, $4.3x10^3$ และ $2.1x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $4.6x10^5$, $6.2x10^3$ และ $1.7x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.7x10^5$, $2.8x10^3$ และ $4.4x10^2$ ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.4x10^5$, $3.5x10^4$ และ $3.4x10^3$ ตามลำดับ ส่วนกรรมกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $4.5x10^5$, $6.2x10^5$ และ $5.5x10^5$ ตามลำดับ (Table 5)

จากการตรวจปริมาณ BS DOA-WB4 และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง ทั้ง 4 กรรมวิธี มีปริมาณ BS DOA-WB4 แตกต่างกัน คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 ใกล้เคียงกับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ซึ่งทั้งสองกรรมวิธีก็มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวใกล้เคียงกันด้วย และทั้ง 4 กรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลดลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของทั้ง 4 กรรมวิธีต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* คงที่ไม่ลดลง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาวิธีการใช้ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยปลูกมันฝรั่งตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลองไว้ และทำการตรวจสอบจำนวนต้นมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยวทุก 30 วัน พบว่ากรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง และกรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่งด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มีการเกิดโรคเหี่ยว 37.5, 38.0 และ 36.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 6)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่ากรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.4x10^3$, $4.2x10^4$ และ $1.2x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $3.2x10^3$, $5.3x10^4$ และ $4.1x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.2x10^3$, $1.3x10^4$ และ $2.3x10^4$ ตามลำดับ (Table 7)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.8x10^4$, $2.3x10^3$ และ $1.1x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.6 x10^4$, $3.2x10^4$ และ $1.7x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.2x10^4$, $3.4x10^3$ และ $2.2x10^3$ ตามลำดับ ส่วนกรรมกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.5x10^5$, $4.1x10^5$ และ $3.1x10^5$ ตามลำดับ (Table 8)

จากการตรวจปริมาณ BS DOA-WB4 และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ทั้ง 3 กรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวไม่แตกต่างกันทางสถิติ และทั้ง 3 กรรมวิธีมีปริมาณ BS DOA-WB4 ใกล้เคียงกัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวไม่แตกต่างกัน และทั้ง 3 กรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลดลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของทั้ง 3 กรรมวิธีต่ำกว่า และแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* คงที่ไม่ลดลง

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่าแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ และแปลงเปรียบเทียบ (control) เป็นโรคเหี่ยว 83.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคไม่แตกต่างจากแปลงเปรียบเทียบที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง (Table 9)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า แปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $1.5x10^4$, $3.2x10^5$ และ $5.4x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 10)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า แปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.6x10^5$, $2.3x10^5$ และ $1.1x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนแปลงเปรียบเทียบ (control) มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.2x10^5$, $3.5x10^5$ และ $6.5x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 11)

9. **สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ**

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยเพิ่มปริมาณบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ผสมกับสารละลาย magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1M carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5% และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม

(talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาณแบคทีเรีย 4.3×10^{10} หน่วยโคโลนี/กรัม โดยสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ได้นาน 12 เดือน และเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ได้นาน 15 เดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง พบว่าสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณของ BS DOA-WB4 3.5×10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม

3. การทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในสภาพแปลงทดลอง พบว่าการรด BS DOA-WB4 อัตรา 30, 40, 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และการใส่ BS DOA-WB4 อัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 และการรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด จากนั้นทำการทดสอบวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยว พบว่าการแช่หัวพันธุ์ การรองก้นหลุม และการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูก และรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 สรุปได้ว่าทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบสามารถทำให้มันฝรั่งในแปลงทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่าแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ และแปลงเปรียบเทียบ (control) เป็นโรคเหี่ยว 83.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคไม่แตกต่างจากแปลงเปรียบเทียบที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง แสดงว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในอัตราที่ทดสอบนี้ไม่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีการระบาดของโรคเหี่ยวค่อนข้างรุนแรง และควรนำวิธีการเขตกรรม เช่นการไถดินตากแดด และการอบดินด้วยยูเรียปูนขาวมาใช้ก่อนการปลูกมันฝรั่งเพื่อฆ่าเชื้อในดินก่อนปลูกด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลงานวิจัยไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งที่มีการระบาดของโรค โดยใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ร่วมกับวิธีการอื่น เช่น วิธีการเขตกรรม วิธีการปรับปรุงดิน เป็นต้น

11. เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

Aspiras, R.B. and A.R. de la Cruz. 1985. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*, pp. 89-92. *In* G.J.

Persley. Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Bannos, Philippines

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Celino, M.S. and D. Gotllieb. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. 42: 4. (Abstract).

Guo, J., H. Qi and S. Li. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial Wilt Newsletter. 17: 3.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. App. Bacteriol. 27: 265-277.

Karuna, K., A.N.A. Khan and M. R. Ravikumar. 1997. Potential of biocontrol agent in the management of bacterial wilt of Tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Xu, G.W. and D.C. Gross. 1986. Field evaluation of the interaction among *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* and potato yield. Phytophathology 76: 423-430.

Table 1 Population of BS DOA-WB4 that survive in bioproduct powder stored at various temperatures and period of observation.

Month	Populations *of* BS DOA-WB4 (CFU/talcum 1 g.)	
	Room temperature (27 - 30 °C)	Refrigerator (4 - 6 °C)
0[1/]	4.3×10^{10}	4.3×10^{10}
1	3.7×10^{10}	5.3×10^{10}
2	2.3×10^{10}	4.1×10^{10}
3	3.5×10^{9}	5.1×10^{10}
4	1.9×10^{9}	4.9×10^{10}
5	2.1×10^{9}	2.7×10^{10}
6	2.5×10^{8}	2.3×10^{10}
7	2.6×10^{8}	3.1×10^{10}
8	1.8×10^{7}	5.4×10^{9}
9	3.3×10^{5}	4.4×10^{9}
10	3.6×10^{4}	3.6×10^{9}
11	2.4×10^{3}	3.7×10^{9}
12	1.1×10^{2}	8.5×10^{8}
13	-	4.8×10^{8}
14	-	3.9×10^{8}
15	-	7.8×10^{7}

0[1/] Initial bacterial population

Table 2 Efficiency of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato under screenhouse condition.

week	bioproduct powder			Sterilized distilled water	
	Disease controlling (%)	Bacterial Population (CFU/soil 1 g)		Disease controlling (%)	Bacterial Population (CFU/soil 1 g)
		Ralstonia solanacearum	*Bacillus subtislis*		*Ralstonia solanacearum*
1	100[1/]	4.6×10^6	3.9×10^4	100	3.2×10^6
2	100	3.2×10^5	3.7×10^4	100	4.6×10^6
3	90	1.4×10^5	2.6×10^4	80	2.2×10^7
4	80	5.9×10^4	5.7×10^4	40	5.2×10^7
5	70	3.6×10^4	2.5×10^5	0	6.6×10^6
6	60	2.3×10^4	2.9×10^5	0	8.6×10^5
7	60	5.6×10^3	3.5×10^5	0	7.7×10^5

[1/] Disease controlling (%) $= \frac{\text{number of survival potato}}{\text{total number of potato}} \times 100$

Table 3 The efficiency of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Disease incident %
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	44.1c[1/]
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	26.3b
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	16.9a
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	47.8c
5. control	75.9d
CV (%)	19.50

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Table 4 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	2.4×10^2	4.2×10^3	7.3×10^3
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	3.2×10^2	5.3×10^3	3.7×10^4
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	4.6×10^3	5.4×10^5	8.4×10^5
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	2.2×10^2	4.2×10^3	6.6×10^3
5. control	-	-	-

Table 5 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	1.9×10^5	4.3×10^3	2.1×10^3
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	4.6×10^5	6.2×10^3	1.7×10^3
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	2.7×10^5	2.8×10^3	4.4×10^2
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	2.4×10^5	3.5×10^4	3.4×10^3
5. control	4.5×10^5	6.2×10^5	5.5×10^5

Table 6 Efficacy of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Disease incident (%)
1. tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	37.5a[1/]
2. support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	38.0a
4. tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L 5. of water every 7 days	36.5a
4. control	76.5b
CV (%)	13.5

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Table 7 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	2.4×10^3	4.2×10^4	1.2×10^4
treatment 2	3.2×10^3	5.3×10^4	4.1×10^4
treatment 3	2.2×10^3	1.3×10^4	2.3×10^4
treatment 4	-	-	-

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 3 tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 4 control

Table 8 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. treatment 1	1.8×10^4	2.3×10^3	1.1×10^3
2. treatment 2	3.6×10^4	3.2×10^4	1.7×10^3
3. treatment 3	2.2×10^4	3.4×10^3	2.2×10^3
4. treatment 4	3.5×10^5	4.1×10^5	3.1×10^5

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 3 tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 4 control

Table 9 Efficacy of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Disease incident (%)
1. tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	76.5
2. control	83.5

Table 10 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	1.5×10^4	3.2×10^5	5.4×10^5
treatment 2	-	-	-

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 control

Table 11 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	1.6×10^5	2.3×10^5	1.1×10^5
treatment 2	2.2×10^5	3.5×10^5	6.5×10^5

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 control