การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

Development Powder Formulation of *Bacillus subtilis* DOA-WB4 for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Potato Bacterial Wilt Disease

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ
รุ่งนภา ทองเครื่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง โดยการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 มาพัฒนาเป็นสูตรผงสำเร็จอย่างง่าย จากนั้นจึงนำไปทดสอบในสภาพแปลงทดลอง ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงต่างกัน คือ กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน กรรมวิธีที่ 2 รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน กรรมวิธีที่ 3 รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน กรรมวิธีที่ 4 ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน โดยคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 % โดยน้ำหนักในทุกกรรมวิธี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 5 ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง พบว่ากรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 มีการเกิดโรคเหี่ยว 44.1, 26.3, 16.9 และ 47.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผงที่มีการเกิดโรคเหี่ยวเท่ากับ 75.9 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าทุกกรรมวิธีสามารถทำให้มันฝรั่งในแปลงทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งไม่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง และกรรมวิธีที่สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด คือกรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-01-54

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 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรีย จนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ มีอยู่มากมายทั้งในดินตามผิวพืชและแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและสามารถแยกได้ง่าย 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 นำมาคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus, B. subtilis* และ *Enterobacter cloaceae* ที่แยกได้จากรากมันฝรั่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการศึกษากับดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* 3 แห่งของประเทศอินเดีย คือ เมือง Bhowali Palampur และ Bhubaneswar สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83%, 27-70% และ 24-71% ตามลำดับ และพบว่าที่เมือง Bhowali และ Bhubaneswar มีผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 160% Guo *et*

al. (2002) รายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* สายพันธุ์ J3, แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ BB11 และ FH17 ที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้ต้นพริก (Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ 30% ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 % ตามลำดับ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100% ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 % ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50% แต่เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 % และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200%

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

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 การเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง

การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่าย เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้น

นำไปผสมกับ carboxymethylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1 : 4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติก ก่อนนำไปใช้ทดสอบในแปลงต่อไป (Xu and Gross, 1986)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงที่ผลิตได้ นำผลิตภัณฑ์แบบผง จำนวน 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

2. ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ 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 3.2 x 4 เมตร จำนวน 20 แปลงย่อยๆ ละ 80 หัว เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองต่อไป

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 % โดยน้ำหนัก (10 กรัม : มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) จากนั้นรดด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 % โดยน้ำหนัก (10 กรัม : มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) จากนั้นรดด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 % โดยน้ำหนัก (10 กรัม : มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) จากนั้นรดด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 % โดยน้ำหนัก (10 กรัม : มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) จากนั้นใส่ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจเช็คปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ในแปลงปลูกโดยทำการ

เก็บตัวอย่างดินทุกเดือน

2. ตรวจเช็คปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในแปลงปลูก โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทุกเดือน
3. ตรวจนับต้นที่แสดงอาการของโรคทุกเดือน

ระยะเวลา

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงปลูกมันฝรั่งที่ศูนย์วิจัยการเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1 : 4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่ผลิตได้ โดยนำส่วนผสมผงสำเร็จแบคทีเรีย 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่เตรียมจากอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) คือ 2.5×10^{10} หน่วยโคโลนี/กรัม

2. ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เริ่มปลูกมันฝรั่งในวันที่ 26 พฤศจิกายน 2556 ตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลองไว้ และทำการตรวจสอบจำนวนต้นมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยวทุก 2 สัปดาห์ พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ดีที่สุด มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 16.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ที่เป็นโรคเหี่ยว 26.3, 44.1 และ 47.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคเหี่ยวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง ซึ่งเป็นโรคเหี่ยว 75.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มี

ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เท่ากับ 2.4×10^2, 4.2×10^3 และ 7.3×10^3 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เท่ากับ 3.2×10^2, 5.3×10^3 และ 3.7×10^4 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เท่ากับ 4.6×10^3, 5.4×10^5 และ 8.4×10^5 ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เท่ากับ 2.2×10^2, 4.2×10^3 และ 6.6×10^3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 1.9×10^5, 4.3×10^3 และ 2.1×10^3 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 4.6×10^5, 6.2×10^3 และ 1.7×10^3 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 2.7×10^5, 2.8×10^3 และ 4.4×10^2 ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 2.4×10^5, 3.5×10^4 และ 3.4×10^3 ตามลำดับ ส่วนกรรมกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 4.5×10^5, 6.2×10^5 และ 5.5×10^5 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผงทั้ง 4 กรรมวิธี มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แตกต่างกัน คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ใกล้เคียงกับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ซึ่งทั้งสองกรรมวิธีก็มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวใกล้เคียงกันด้วย และทั้ง 4 กรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลดลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของทั้ง 4 กรรมวิธีต่ำกว่า และแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ที่มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* คงที่ไม่ลดลง

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	**การเกิดโรคเหี่ยว (เปอร์เซ็นต์)**
1. คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน	44.1c[1/]
2. คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน	26.3b
3. คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน	16.9a
4. คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+ใส่ผงเชื้อ 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน	47.8c
5. ไม่ใช้ผงเชื้อ (control)	75.9d
CV (%)	19.50

[1/] ตัวเลขในแต่ละคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยการวิเคราะห์แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	**ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	30 วัน	**60 วัน**	**90 วัน**
1. กรรมวิธีที่ 1	2.4×10^{2}	4.2×10^{3}	7.3×10^{3}
2. กรรมวิธีที่ 2	3.2×10^{2}	5.3×10^{3}	3.7×10^{4}
3. กรรมวิธีที่ 3	4.6×10^{3}	5.4×10^{5}	8.4×10^{5}
4. กรรมวิธีที่ 4	2.2×10^{2}	4.2×10^{3}	6.6×10^{3}

กรรมวิธีที่ 1 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 2 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 4 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+ใส่ผงเชื้อ 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน

ตารางที่ 3 ประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	**ปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	30 วัน	**60 วัน**	**90 วัน**
1. กรรมวิธีที่ 1	1.9×10^{5}	4.3×10^{3}	2.1×10^{3}
2. กรรมวิธีที่ 2	4.6×10^{5}	6.2×10^{3}	1.7×10^{3}
3. กรรมวิธีที่ 3	2.7×10^{5}	2.8×10^{3}	4.4×10^{2}
4. กรรมวิธีที่ 4	2.4×10^{5}	3.5×10^{4}	3.4×10^{3}
5. กรรมวิธีที่ 5	4.5×10^{5}	6.2×10^{5}	5.5×10^{5}

กรรมวิธีที่ 1 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 2 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+รดผงเชื้อ 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 4 คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก+ใส่ผงเชื้อ 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน
กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใช้ผงเชื้อ (control)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงในสภาพแปลงทดลอง พบว่ากรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกและรดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 44.1 เปอร์เซ็นต์ กรรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกและรดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 26.3 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกและรดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 16.9 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกและใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ทุก 7 วัน มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 47.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 4 กรรมวิธีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงที่มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคเหี่ยวเท่ากับ 75.9 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าทุกกรรมวิธีสามารถทำให้มันฝรั่งในแปลงทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผง

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.