



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)

ปริญญา

วิจัยและพัฒนาการเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

Efficacy of Antagonistic Bacteria for Control of Pummelo Canker

นามผู้วิจัย นายณพพล สัตยาสัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ปริญญา จันทศรี, วท.ค.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

Efficacy of Antagonistic Bacteria for Control of Pummelo Canker

โดย

นายณพล สัตยาสัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนากการเกษตร)

พ.ศ. 2551

นพพล สัทธาสัย 2551: ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของ
ส้มโอ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) สาขาวิจัยและพัฒนาการ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ค. 88 หน้า

การทดสอบเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ C₄ และเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* สายพันธุ์ C₂
ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) สายพันธุ์ Xci112-1 (จากใบมะนาว) และ
สายพันธุ์ Xci133-1 (จากใบส้มโอ) โดยวิธี paper-disc diffusion พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. (สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄)
ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xci112-1 และ Xci133-1 เมื่อทดสอบเชื้อ C₁ C₃ และ C₄ ในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกิดจาก
เชื้อ Xci112-1 และ Xci133-1 บนใบส้มโอ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธี prick inoculation ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการ
ปลูกเชื้อ Xac ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งก่อนหรือหลังการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ
ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 0 1 และ 2 วัน โดยใช้ใบที่ตัดมาจากต้น การทดสอบในสภาพโรงเรือน โดยการ
ปลูกเชื้อ Xac ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งก่อนหรือหลังการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ
ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 และ 6 วัน ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ และในสภาพโรงเรือน พบว่า การใช้
เชื้อสายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ Xci112-1 และ Xci133-1 ลดการเกิดโรคได้
แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเกิดโรคลดลงได้มากที่สุด เมื่อหยดเชื้อสายพันธุ์ C₄ ก่อนการปลูกเชื้อ
สาเหตุโรคเป็นเวลา 6 วัน เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ (C₄ ที่ต้านทาน tetracycline และ copper
oxychloride) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน โดยใช้เมล็ดที่ปราศจาก
เชื้อจิมบนใบส้มโอ จากนั้นฉีดพ่นใบที่ทำแผลด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสายพันธุ์ mC₄ (10⁸ cfu/ml) แล้วฉีดพ่นเซลล์
แขวนลอยเชื้อ Xci133-1 (10⁸ CFU/ml) พบว่า เชื้อสายพันธุ์ mC₄ ลดการเกิดโรคบนใบส้มโอได้อย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ ในสองการทดลองที่ทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อสายพันธุ์ mC₄ จำนวน 1 และ 4 ครั้ง (แต่ละครั้งห่างกัน
5 วัน) โดยลดการเกิดโรคลง 75.9 และ 84.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์ mC₄ มี
ประสิทธิภาพลดการเกิดโรคได้น้อยกว่า copper oxychloride ซึ่งเป็นสารเคมีฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาการอยู่รอด
ของเชื้อสายพันธุ์ mC₄ บนใบส้มโอในสภาพโรงเรือนที่ระยะเวลา 1 3 5 7 10 15 และ 30 วัน หลังการฉีดพ่น พบว่า
ประชากรเชื้อสายพันธุ์ mC₄ เท่ากับ 10⁶-10⁷ หน่วยโคโลนีต่อใบ 1 กรัม ที่ระยะเวลา 15 วัน และค่อยๆลดลง โดยมี
ประชากรเชื้อเท่ากับ 10⁵ หน่วยโคโลนีต่อใบ 1 กรัม ที่ระยะเวลา 30 วัน ส่วนประชากรเชื้อ Xac ลดลงอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 5 และ 10 วัน ในกรรมวิธีที่ใช้ copper oxychloride (copper oxychloride+Xac) และ
กรรมวิธีที่ใช้เชื้อสายพันธุ์ mC₄ (mC₄+Xac) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การจัดจำแนกเชื้อ C₄ ด้วยลักษณะ
ทางสัณฐานของเซลล์ สมบัติทางกายภาพและชีวเคมี แสดงว่าเชื้อ C₄ คือ เชื้อ *Bacillus subtilis*

Noppon Suthayasai 2008: Efficacy of Antagonistic Bacteria for Control of Pummelo Canker.
 Master of Science (Agricultural Research and Development), Major Field: Agricultural Research and
 Development, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Chalida
 Leksomboon, Ph.D. 88 pages.

Bacillus sp. Strain C₁ C₃ C₄ and *Pseudomonas fluorescence* strain C₂ were tested for their ability to inhibit growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) Xci112-1 (a lime strain) and Xci133-1 (a pummelo strain) using paper-disc diffusion method. The *Bacillus* sp. (strain C₁ C₃ and C₄) inhibited growth of Xci112-1 and Xci133-1. Disease suppression of the C₁ C₃ and C₄ strains was evaluated by testing these bacteria against Xci112-1 and Xci133-1 using a prick inoculation method on pummelo leaves. In the laboratory test, leaves of pummelo cultivar Kao Num Peung were inoculated with 0.01 ml of the cell suspension of Xac either before or after inoculating the leaves with 0.01 ml of the tested antagonistic bacteria at 0 1 and 2 days on detached leaves. In the greenhouse test, leaves of pummelo cultivar Kao Num Peung were inoculated with 0.01 ml of the cell suspension of Xac either before or after inoculating the leaves with 0.01 ml of the tested antagonistic bacteria at 4 and 6 days. The results in laboratory and greenhouse tests showed that the application of C₁ C₃ and C₄ strains at 1 2 4 and 6 days before inoculating with Xci112-1 and Xci133-1 significantly reduced disease incidence. The highest reduction in disease incidence was observed when C₄ strain was applied 6 days before inoculating with the pathogen. *Bacillus* sp. strain mC₄ (a spontaneous tetracycline and copper oxychloride-resistant strain of C₄) was also evaluated in the greenhouse setting to determine its control efficacy against pummelo canker. Pummelo leaves were pricked by a sterilized needle and the wounded leaves were sprayed with mC₄ (10⁸ cfu/ml), followed by spraying with Xci133-1 (10⁸ cfu/ml). The application of mC₄ strain significantly reduced disease on pummelo by 75.9 and 84.8 % in two trials, in which the mC₄ strain was sprayed 1 and 4 time (at 5 day interval) respectively. The mC₄ strain, however, was less effective than copper oxychloride, a chemical bactericide. Survival of the mC₄ strain on pummelo leaves under greenhouse condition was determined at 1 3 7 10 15 and 30 days after application. The population of the mC₄ strain was at 10⁶-10⁷ cfu/g leaf after 15 days of application, but gradually declined to 10⁵ cfu/g leaf after 30 days of application. The copper oxychloride treatment (copper oxychloride+Xac) and mC₄ treatment (mC₄+Xac) significantly reduced populations of Xac on the leaves at 5 and 10 day after application, when compared to the control treatment. The C₄ strain was identified as *Bacillus subtilis*, based upon both morphological, physical and biochemical characteristics.

 Student's signature

 Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิดา เล็กสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ดร.ปริญญ์ จันทศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รศ. มานะ
กาญจนมณีเสถียร ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้
สมบูรณ์มากยิ่งขึ้นรวมถึงคำอบรมสั่งสอนระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานและ
แก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา
ประจำปี 2550 และทุนวิจัยสนับสนุนโครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการจัดการโรคพืชเพื่อ
ผลผลิตทางการเกษตรที่ปลอดภัย ประจำปี 2550

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อวีระ คุณแม่มะนาว สัตยาสัย และครอบครัวที่ให้การเลี้ยงดู
สั่งสอน สนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษา พร้อมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช
รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนสามารถทำงานวิจัยนี้
สำเร็จได้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบคุณประโยชน์และความดีของวิทยานิพนธ์นี้ แก่ครอบครัวของข้าพเจ้า
ผู้มีพระคุณ และครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้เคยอบรมสั่งสอนข้าพเจ้า ข้อผิดพลาดใดๆที่เกิดขึ้นใน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้เพียงผู้เดียว

นพพล สัตยาสัย

สิงหาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	26
ผล	26
วิจารณ์	64
สรุป	69
เอกสารอ้างอิงและสิ่งอ้างอิง	71
ภาพผนวก	79
ประวัติการศึกษา	88

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความกว้างบริเวณใสที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของ ส้มโอ และสายพันธุ์ Xci112-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว โดยการทดสอบด้วย วิธี paper disc diffusion บนอาหาร NGA หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศา เซลเซียส เป็น เวลา 1 2 3 5 และ 6 วัน	28
2 เพอร์เซ็นต์การเกิดโรคดำนบนใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. (Ab) สายพันธุ์ C ₁ C ₃ และ C ₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1	35
3 เพอร์เซ็นต์การเกิดโรคดำนใต้ใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. (Ab) สายพันธุ์ C ₁ C ₃ และ C ₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1	37
4 เพอร์เซ็นต์การเกิดโรคดำนบนใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. (Ab) สายพันธุ์ C ₁ C ₃ และ C ₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci112-1	39
5 เพอร์เซ็นต์การเกิดโรคดำนใต้ใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. (Ab) สายพันธุ์ C ₁ C ₃ และ C ₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci112-1	41
6 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ โดยเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ C ₄ ด้านบน ใบและใต้ใบส้มโอ เมื่อทำการทดสอบโดยหยดเซลล์แขวนลอย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ C ₄ ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 ด้านบนใบและใต้ใบที่ระยะเวลาต่างๆ	43
7 ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ และ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 step บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ และใบที่ไม่ได้ ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ที่ ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
8 ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ และ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 strep ^r บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ครั้ง บนใบที่ฉีดพ่น copper oxychloride และบนใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน	52
9 ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน เมื่อฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค	55
10 ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ และ copper oxychloride ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน เมื่อฉีดพ่นเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ครั้ง ทุก 5 วัน และสารเคมี copper oxychloride 1 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค	56
11 ความกว้างบริเวณใสที่เกิดจาก culture filtrate จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 10 20 30 40 ไมโครลิตร ต่อ paper disc ซึ่งเกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ บนอาหารNGA เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	60
12 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ C ₄	63

ตารางผนวกที่

1 อุณหภูมิ และความชื้น ระหว่างการทดลองในสภาพโรงเรือน	85
--	----

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและลักษณะของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่แยกได้จากพืชที่เป็นโรค	27
2 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 โดยเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ C ₁ C ₃ C ₄ <i>P. fluorescence</i> สายพันธุ์ C ₂ และ กรรมวิธีควบคุม (control) ที่ระยะเวลา 6 วัน บนอาหาร NGA	29
3 ระดับความรุนแรงโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอที่ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มและหยดเชื้อสาเหตุโรค เป็นเวลา 3 วัน	34
4 ระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอ ที่มีการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนแผลด้านบนใบก่อนการหยดเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 เป็นเวลา 0 1 2 4 และ 6 วัน	44
5 ระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอ ที่มีการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนแผลด้านบนใบและใต้ใบก่อนการหยดเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 เป็น เวลา 0 1 2 4 และ 6 วัน	45
6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ และ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 strep ^r (Xac C ₄ +Xac) บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (กรรมวิธีควบคุม) ในสภาพโรงเรือนที่ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ครั้ง	49
7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ (C ₄) และ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 strep ^r (Xac (Ab+Xac)) บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride (Xac (Cu+Xac)) และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (กรรมวิธีควบคุม) ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ 1 3 7 10 15 และ 30 วัน	53
8 การเกิดโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอ เมื่อมีการฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> sp สายพันธุ์ mC ₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 30 วัน	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 การเกิดโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอ เมื่อมีการฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ mC ₄ และเมื่อมีการฉีดพ่นสาร copper oxychloride ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 30 วัน	58
10 บริเวณใบที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> สายพันธุ์ Xci133-1 บนอาหาร NGA โดย culture filtrate จากเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ C ₁ C ₃ และ C ₄ ที่ปริมาตร 0 (control) 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร ต่อ paper disc	61

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

Efficacy of Antagonistic Bacteria for Control of Pummelo Canker

คำนำ

ส้มโอ จัดอยู่ในวงศ์ (family) Rutaceae ชื่อสามัญ pummelo ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus maxima* (Burm) Merr. ส้มโอจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจของประเทศ มีพื้นที่ปลูก 210,000 ไร่ ปริมาณการส่งออกในปี พ.ศ. 2550 เท่ากับ 10,071 ตัน มีมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 119.953 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ส้มโอเป็นไม้ผลได้รับความสนใจจากผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักในอเมริกาและฟิลิปปินส์ในชื่อ Bangkok pummelo มาเลเซีย ในชื่อ Siamese pummelo เพราะส้มโอของประเทศไทยมีลักษณะรสชาติดีกว่าส้มโอของประเทศผู้ส่งออกรายอื่น (ไพโรจน์, 2546) อีกทั้งส้มโอมีลักษณะที่ดี คือ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สามารถเก็บไว้ได้นาน เปลือกหนา ทนทานต่อการขนส่ง คุณภาพของส้มไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อถึงปลายทาง

โรคแคงเกอร์ของส้มโอเป็นโรคที่สำคัญที่ทำความเสียหายแก่ส้มโอ มีผลต่อการค้าระหว่างประเทศ เนื่องจากส้มโอเป็นพืชเศรษฐกิจจึงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย (อรพรรณ และจุมพล, 2548) สาเหตุโรคแคงเกอร์เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถติดไปกับกิ่งพันธุ์หรือเครื่องมือทางการเกษตรและแพร่กระจายได้ดีโดยน้ำ และลม นอกจากนี้ยังมีหนอนขนใบซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้โรคนี้อาการอย่างรวดเร็ว เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในการควบคุมโรคแคงเกอร์ เช่น copper hydroxide และ copper oxychloride เมื่อมีการใช้สารเคมีเป็นประจำ ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความต้านทานต่อสารเคมีมากขึ้น จึงต้องเพิ่มปริมาณและความถี่ของการใช้ เป็นผลทำให้มีสารพิษตกค้างในผลผลิต และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ดังนั้น เพื่อที่จะใช้เป็นกรรมวิธีทางเลือกในการทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมี การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอในสภาพห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอในสภาพเรือนทดลอง

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของส้มโอ

1.1 ประวัติของส้มโอ

ส้มโอเดิมเข้าใจว่าเป็นส้มโอชนิดเดียวกับส้มโอผลเล็กที่เรียกว่า Grapefruit เพราะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ต่อมาเมื่อปี ค.ศ. 1830 Macfadyen ได้แยกส้มโอออกจากส้มโอผลเล็ก (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus paradise* Mac.) ส้มโอมีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น pommelo, pompelmoes, forbidden fruit และ shaddock สำหรับ 3 ชื่อแรก มาจากภาษา Dutch ซึ่งเรียกส้มโอว่า pompelmoes หรือ pompelmoes ส่วนชื่อหลังเรียกตามชื่อกัปตันเรือชาวอังกฤษ ชื่อ Shaddock ซึ่งเป็นคนแรกที่ได้้นำพันธุ์ส้มโอจากหมู่เกาะมลายูไปปลูกในหมู่เกาะเวสต์อินดีส (สมชาย และ ทวีศักดิ์, 2531)

เชื่อกันว่าส้มโอมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ทางหมู่เกาะมลายู และหมู่เกาะโปลินีเซีย ต่อมาได้ขยายไปตามแหล่งต่างๆ ตามแถบมลายู หมู่เกาะเวสต์อินดีส อินเดีย จีน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ชวา เปอร์เซีย ปาเลสไตน์ และสหรัฐอเมริกา สำหรับส้มโอในประเทศไทยนั้น จากการพิจารณาตามธรรมชาติตามป่าบางภาคของประเทศไทยแสดงว่าส้มโอทั้งหลายไม่ใช่ของเดิมของประเทศไทย แต่ได้ถูกนำมาจากดินแดนใกล้เคียงแห่งใดแห่งหนึ่งเป็นระยะเวลาล่วงมานานแล้ว จนประชาชนเจ้าของประเทศคุ้นเคยและเข้าใจเอาว่าเป็นพืชพื้นเมือง การที่ส้มโอได้ถูกนำเข้ามาจากที่ใด และสมัยใดนั้นอาจสันนิษฐานได้ 3 ทาง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2535) คือ

1.1.1 โดยทางบกจากดินแดนจีนตอนใต้ โดยพวกไทยน้อยซึ่งเป็นบรรพบุรุษของเรา เมื่ออพยพลงมาทางใต้จนเข้ามาตั้งถิ่นฐานอยู่ในอาณาจักรไทยปัจจุบันนี้ (พ.ศ.1650-1850) คงจะได้นำพืชผลและสัตว์เลี้ยงต่างๆรวมทั้งส้มชนิดต่างๆติดขบวนมาด้วย เพราะมีหลักฐานว่า ขณะที่ชนชาติไทยยังมีถิ่นฐานอยู่ในประเทศจีนนั้น การปลูกส้มในจีนได้เจริญมากแล้ว

1.1.2 โดยทางทะเลจากหมู่เกาะมลายู ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นถิ่นฐานของส้มโอ และจากประวัติศาสตร์ เราทราบว่าดินแดนทางปีกซ้ายใต้ของประเทศไทยเคยเป็นเมืองขึ้นของชวา (อาณาจักรศรีวิชัย พ.ศ. 1214-1920) มาก่อน จึงอาจกล่าวได้ว่าส้มโอถูกนำมาปลูกในประเทศไทยในยุคนี้ ปัจจุบันพบว่าส้มโอปลูกอยู่ทางจังหวัดชายทะเลภาคใต้ไม่น้อยเช่นกัน เช่น นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และชุมพร ส้มโอบางพันธุ์ก็แสดงว่านำมาจากประเทศชวา เช่น ส้มโอพันธุ์ปัตตาเวีย

1.1.3 โดยทางทะเลจากประเทศจีนหรือแคว้นตังเกี๋ยในต้นสมัยกรุงธนบุรี หรือกรุงรัตนโกสินทร์นี้เอง เพราะในสมัยนั้นมีชาวจีนเข้ามาพึ่งพระบรมโพธิสมภารของพระมหากษัตริย์ไทยเป็นจำนวนมาก และได้ตั้งรกรากอยู่บริเวณกรุงเทพและธนบุรี ชาวจีนเหล่านี้มีทั้งพ่อค้าและชาวไร่ชาวนา เพราะส่วนมากมาจากจีนได้ จึงอาจนำเอาส้มมาปลูกในประเทศไทยด้วย ต่อมาเมื่อส้มเหล่านี้ถูกปลูกนานๆ เข้าก็คงได้พันธุ์ที่เหมาะสมกับดินฟ้าอากาศของประเทศไทย ชาวสวนที่ปลูกส้มโอมีวิธีการที่คล้ายคลึงกับชาวสวนในเมืองจีนมากและเป็นที่น่าสังเกตว่าชาวสวนเก่าที่มีชื่อหลายรายมีเชื้อสายสืบมาจากจีน

1.2 พฤกษศาสตร์ของส้มโอ

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) *Citrus maxima* (Burm) Merr. หรือ *Citrus grandis* (L.) Osbeck (ไพโรจน์, 2546)

Family	Rutaceae
Subfamily	Aurantioideae
Tribe	Citreae
Subtribe	Citrinae
Genus	Citrus
Specie	maxima

ลักษณะของส้มโอ

ลำต้น ส้มโอเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 6 - 8 เมตร แต่ถ้าปลูกในที่เหมาะสมและมีอายุมากๆ อาจสูงถึง 15 เมตร (จุฑามาศ, 2547) ส้มโอกิ่งตอนส่วนมากจะสูง 5 - 8 เมตร (ไพโรจน์, 2545) ทรงต้นโปร่ง ลำต้นใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งก้านสาขาที่แตกจะแผ่เป็นพุ่มเงี้ยวประมาณ 3 - 4 เมตร บางครั้งมีหนามตามลำต้น ยิ่งถ้าปลูกด้วยเมล็ดจะมีหนามแข็ง ยาวถึง 1 นิ้ว

ใบ ส้มโอมีใบใหญ่เป็นมันหนามีรูปร่างเป็นโล่หรือรูปไข่ยาว (ovate - oblong) (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2541) หรือคล้ายผลสมอ (elliptic) ยาวประมาณ 13.5 - 17 เซนติเมตร กว้างประมาณ 7.5 - 9 เซนติเมตร แบ่งออกเป็น 2 ตอนๆแรกเรียกตัวใบ ตอนที่สอง เรียกว่าหูใบ ซึ่งเป็นส่วนของก้านใบ ปลายใบมนและช้อนขึ้นเล็กน้อย สีของใบด้านบนเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างเป็นสี

เขียวอ่อนมีขนอ่อนนุ่มปกคลุมอยู่ด้วย ริมใบเรียบหรือหยักเล็กน้อยและมีหยักใหญ่ 1 หยัก เส้นใบ
นูนเด่นชัด

ก้านใบ ใบประกอบด้วยส่วนของหูใบซึ่งมีลักษณะเป็นปีกขนาดใหญ่ เป็นรูปทรง
คล้ายรูปหัวใจกลับหรือรูปไข่หัวกลับ ก่อนข้างยาว โดยส่วนปลายปีกเป็นรูปหัวใจ ปีกจะแคบลง
บริเวณฐานก้านใบ ส่วนของก้านใบบริเวณที่กว้างที่สุด เท่ากับ 0.3 - 0.7 เซนติเมตร (สถาบันวิจัย
พืชสวน, 2541)

ดอก ดอกของส้มโอออกตอนปลายกิ่งบริเวณซอกใบเป็นช่อแบบ axillary raceme
จำนวน 10 - 20 ดอก มีทั้งชนิดช่อหรือบางที่ออกดอกเดี่ยวๆ ก็มี ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect
flower) ดอกค่อนข้างใหญ่ ก้านดอกยาว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 - 7 เซนติเมตร ส่วนประกอบ
ของดอก มีกลีบรองสีเขียวอ่อน เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 - 5 กลีบ ถัดเข้าไปเป็นชั้นกลีบดอกสีขาวมี 4 - 5 กลีบ กว้าง
ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ยาว 3.5 เซนติเมตรมีต่อมน้ำมันที่กลีบดอก ถัดจากกลีบดอกเป็นเกสรตัวผู้
มี 16 - 24 อัน ล้อมรอบรังไข่ รูปกลม สีเขียวอ่อน ก้านเกสรตัวเมียยาวใหญ่ ปลายกลม (จุฑามาศ,
2547) เมื่อดอกบานมีกลิ่นหอม ในฤดูที่ออกดอกมากที่สุดอยู่ระหว่างกลางเดือนธันวาคมถึงเดือน
กุมภาพันธ์ (ภาคกลาง) และอีกครั้งหนึ่งระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน ระยะจากผลิดอกถึง
ดอกบานใช้เวลา 25 - 30 วัน และดอกบานถึงผลแก่ประมาณ 180 - 210 วัน (ไพโรจน์, 2545)

ผล ผลมีขนาดปานกลางถึงใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 - 18 เซนติเมตร สูง 14 - 16
เซนติเมตร จัดอยู่ในประเภท berry จำพวก hesperidia ทรงผลมีหลายแบบ เช่น กลมมน กลมแป้น
กลมสูง บางพันธุ์มีจุกคล้ายผลสาหร่ายหรือผลฝรั่ง ผิวของผลมีสีเขียวอ่อนถึงเหลืองอ่อน มีต่อมน้ำมัน
ตามผิว เปลือกหนา 2 - 2.5 เซนติเมตร มีลักษณะนุ่ม จัดเป็น pericarp ของผล เนื้อที่ใช้บริโภคเกิด
จากส่วนเจริญของ endocarp มีลักษณะเป็นเส้นอวบน้ำอัดรวมตัวกันอยู่ เรียกว่า กุ้ง (juice sac)
(จุฑามาศ, 2547) ซึ่งภายในประกอบด้วยน้ำ (juice) มีรสหวานอมเปรี้ยวถึงเปรี้ยว ภายในผลแบ่ง
ออกเป็นช่องหรือกลีบ 12 - 14 กลีบ ตรงกลางมีแกน (core) แข็ง แต่บางผลไม่มี เป็นโพรงกลวง
กลางผล ปริมาณผลในต้นหนึ่งมีตั้งแต่ 40 - 100 ผล เฉลี่ยประมาณ 40 - 50 ผลต่อต้น สีเปลือกทั้งสี
ขาวและสีชมพู

เมล็ด ส้มโอมีเมล็ดสีขาวอมเหลืองขนาดค่อนข้างใหญ่ แบน เปลือกย่น ความกว้าง
0.6 - 1.2 เซนติเมตร ยาว 1.2 - 2 เซนติเมตร อยู่รวมกันตรงกลางผลรอบๆแกน บางผลไม่มีเมล็ดหรือ
เมล็ดลีบ เมล็ดส้มโอหนึ่งเมล็ดสามารถเพาะได้เป็นกล้าเพียงต้นเดียวเท่านั้น (จุฑามาศ, 2547)

จำนวนเมล็ดในแต่ละผลจะแตกต่างกันตามพันธุ์และตามฤดูที่ดอกบาน (ไพโรจน์, 2545) ส้มโอที่ไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบมีสาเหตุมาจากไม่ได้รับการผสม เป็นหมันเมื่อผสมตัวเอง หรือบางฤดูเกษตรกรผู้มีส่วนร่วมนำ ส่วนส้มโอที่มีเมล็ดนั้นอันเนื่องมาจาก ผสมข้ามพันธุ์ (varietals cross) และผสมข้ามต้นในพันธุ์เดียวกัน (clonal cross) (สมชาย และ ทวีศักดิ์, 2531)

ราก รากปฐมภูมิ (primary root) เจริญออกมาเมื่อเมล็ดเริ่มงอก ส่วนนี้จะเจริญไปเป็นรากแก้ว (tap root) ส่วนรากทุติยภูมิ (secondary root) มีอยู่ 2 แบบคือ pioneer root กับ fibrous root ซึ่ง pioneer root เจริญมาจาก tap root การเจริญเป็นแบบ epitropic growth รากส้มโอส่วนใหญ่อยู่ต่ำกว่าระดับดิน 2 ฟุต การเจริญเติบโตของรากส้มโอสัมพันธ์ถึงการเจริญเติบโตของทรงพุ่มเหนือพื้นดิน เช่น ถ้าทรงต้นชะลุดันส้มโอจะมี tap root แทงดิ่งลงในแนวลึก ถ้าแตกพุ่มแผ่กว้าง fibrous root ในแนวลึกมีน้อยในสภาพปกติไม่พบรากขนอ่อน (root hair) ในรากพืชวงศ์ส้มเลย (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2541)

1.3 พันธุ์ส้มโอ

ส้มโอที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ พันธุ์ที่นิยมปลูกโดยทั่วไป มีลักษณะดังนี้

พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ผลมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ทรงผลกลมสูง แต่ไม่มีจุดเด่นชัดเหมือนพันธุ์ขาวพวง ด้านกันผลเรียบ ค่อนข้างมนที่ผิวเปลือกมีขนาดใหญ่อยู่กันห่างๆ ผิวเปลือกมีสีเขียวเข้ม เปลือกค่อนข้างหนา ผลหนึ่งมีกิโลกรัมประมาณ 11 - 12 กิโลกรัม แยกออกจากกันง่าย กุ้งมีสีขาวอมเหลือง ขนาดกุ้งค่อนข้างใหญ่ เบียดกันแน่น มีน้ำมากแต่ไม่แฉะ รสหวานอมเปรี้ยว สามารถ แกะเนื้อออกมาได้ง่าย เมล็ดมีขนาดใหญ่ แต่มีเมล็ดไม่มากนัก เป็นที่นิยมบริโภคโดยทั่วไป (ทวีศักดิ์, 2549)

พันธุ์ขาวแป้น ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลมแป้น หัวไม่มีจุดแต่มีจิบเล็กน้อย ด้านกันผลเรียบ ผิวเรียบมีสีเขียวอมเหลือง มีขนอ่อนนุ่มเล็กน้อย ค่อนข้างมนค่อนข้างใหญ่อยู่ห่างๆ กัน เปลือกสีขาวหนาประมาณ 2 เซนติเมตร เปลือกติดกับเนื้อผลแน่น แฉะยาก ผลหนึ่งมีกิโลกรัมประมาณ 12 - 13 กิโลกรัม เนื้อหุ้มกิโลกรัมสีขาวหนาและเหนียว กุ้งสีขาวเบียดกันแน่นปานกลาง รสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดมีขนาดเล็ก และส่วนมากเมล็ดลีบ นิยมบริโภคโดยทั่วไปภายในประเทศ (จุฑามาศ, 2547)

พันธุ์ขาวทองดี หรือทองดี ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลมแป้น ไม่มีจุก ดันขั้วผล มีจีบเล็กน้อย ก้นผลเรียบถึง เว้าเล็กน้อย ผิวเรียบมีสีเขียวเข้ม ต่อม้ำมันละเอียดอยู่ชิดกัน เปลือกค่อนข้างบาง ด้านในของเปลือกมีสีชมพูเรื่อๆ ผลหนึ่ง มีกลีบผลประมาณ 14 - 16 กลีบ ผนังกลีบมีสีชมพูอ่อน กิ่งมีสีชมพูเบียดกันแน่น นุ่ม น้ำน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดมีขนาดเล็ก เป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภคโดยทั่วไปและส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ

พันธุ์ขาวพวง ผลมีขนาดโตปานกลาง ทรงผลกลม ทรงสูงเล็กน้อย มีจุกสูง มีกลีบที่จุกด้านก้นผลเว้าเล็กน้อย ผิวเรียบ มีสีเขียวอมเหลือง ต่อม้ำมันที่ผิวเปลือกค่อนข้างใหญ่ อยู่ห่างกันพอสมควร เปลือกหนาปานกลาง ผลหนึ่งมีกลีบผลประมาณ 12 - 14 กลีบ แยกออกจากกันได้ง่าย กิ่ง (เนื้อ) มีสีขาวอมเหลือง ค่อนข้างแข็งเบียดกันอยู่อย่างหลวม มีน้ำมากแต่ไม่และน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว มีเมล็ดไม่มาก เป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ในเทศกาลไหว้พระจันทร์ เนื่องจากมีรูปทรงผลสวย (ทรงผลมีสกุล) จึงสามารถส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ ในช่วงเทศกาลไหว้พระจันทร์ได้ปีละเป็นจำนวนมาก (พยัพ, 2544)

2. โรคแคงเกอร์ส้มโอ

โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มทั้ง ส้มโอ มะนาว มะกรูด และส้มอื่นๆ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Vauterin et al., 1995) [Syn. *X. campestris* pv. *citri* (Dye et al., 1980) และ *X. smithii* subsp. *citri* (Schaad et al., 2005)] พบการระบาดอยู่ในประเทศต่างๆ มากกว่า 30 ประเทศ ส่วนมากพบในประเทศแถบซีกโลกตะวันออกทั้งในทวีปเอเชีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรอินเดีย รวมถึงอเมริกาใต้ และประเทศสหรัฐอเมริกา (Das, 2003) เชื่อกันว่าที่ญี่ปุ่นรู้จักโรคนี้นี้มาตั้งแต่ศตวรรษที่ 18 และเมื่อปี ค.ศ. 1912 มีรายงานว่าได้พบโรคที่ฟิลิปปินส์ ต่อมาระบาดถึงอเมริกาในปี ค.ศ. 1913 Berger รายงานว่า โรคนี้ถูกนำเข้ามาในอเมริกาโดยติดมากับส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) ที่ส่งมาจากประเทศญี่ปุ่น ทำให้ส้มที่ปลูกมาเป็นการค้าแทบทุกพันธุ์เป็นโรครบาดหนักอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งรัฐบาลสหรัฐฯต้องออกบัญญัติควบคุมโรคตั้งแต่ ค.ศ. 1914 - 1931 เป็นเวลา 20 ปี จึงกำจัดโรคแคงเกอร์ได้หมด (Sinclair, 1968)

Fawcett and Jenkins (1933) เชื่อว่าแหล่งกำเนิดของโรคอยู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในประเทศอินเดีย และ เจวา (อินโดนีเซีย) เพราะพบแผลของโรคแคงเกอร์ บนใบส้ม herbarium ที่เก็บไว้ที่ Herbaria of the Royal Botanic Gardens ในประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็นตัวอย่างของส้ม (*Citrus*

medica) ที่เก็บมาจากประเทศอินเดียในปี 1827 - 1831 และส้ม (*C. aurantifolia*) จากประเทศอินโดนีเซียในปี 1842 - 1844

ในปี ค.ศ. 1915 Hasse ได้ตั้งชื่อว่า *Pseudomonas citri* ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อมาเป็น *Phytophthora citri* ภายหลังการประชุม The Committee on Nomenclature of the Society of American Bacteriologist หลังจากนั้น Dowson ได้จัดหมวดหมู่ของเชื้อใหม่และเปลี่ยนชื่อเป็น *X. citri* (Hasse) ในปี ค.ศ. 1980 Dye *et al.* (1980) อาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาได้จัดหมวดหมู่ของเชื้อใหม่และเปลี่ยนชื่อว่า *X. campestris* pv. *citri* Vauterin *et al.* (1995) ได้ใช้ข้อมูลพื้นฐานจาก DNA - DNA hybridization และใช้ BIOLOG microplates เสนอชื่อ species ใหม่ใน genus *Xanthomonas* ว่า *X. axonopodis* pv. *citri*

Stall (1988) และ Goto (1992) แบ่งกลุ่มของเชื้อสาเหตุของโรคตามความสามารถในการทำโรคที่แตกต่างกันบนพืชอาศัย และ ตำแหน่งที่พบการแพร่ระบาด (geographical distribution) โดยแบ่งเชื้อออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ

1. A strain (Cancrosis A, Canker A, True canker) เชื้อสาเหตุ คือ *X. axonopodis* pv. *citri* (Hasse) สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลส้มได้ทุกสายพันธุ์ (*Citrus* spp.) แหล่งกำเนิดอยู่ในเอเชียซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงพบการแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน แอชมหาสมุทรอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และญี่ปุ่น (Gottwald and Graham, 2000)

2. B strain (Cancrosis B, False canker) เชื้อสาเหตุ คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* เข้าทำลายเลมอน [*C. limon* (L.) Burm f.] เม็กซิกันไลม์ [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle] เซาออเรน (*C. aurantium*) และส้มโอ (*C. maxima*) พันธุ์อ่อนแอ (Annouymous, 2005) แหล่งกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ซึ่งจะพบการแพร่ระบาดเฉพาะในประเทศอาร์เจนตินา อุรุกวัย และปารากวัย ลักษณะอาการของแผลที่เกิดขึ้นบนผล ใบ และกิ่งเหมือนกับ A strain แต่มีขนาดเล็กกว่า และเจริญบนอาหารได้ช้ากว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง B และ A strain ด้วยเทคนิค เซรัมวิทยา แต่ไม่สามารถแยก C strain ได้ (Gottwald and Graham, 2000)

3. C strain (Cancrosis C) คือ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จะเข้าทำลาย เม็กซิกันไลม์ พบการแพร่ระบาดที่ Sao Paulo state ในประเทศบราซิล (Gottwald, 2000)

ปี 1984 พบโรคใหม่ คือ citrus bacterial spot ที่ฟลอริดา เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas* ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* จึงตั้งชื่อว่า *X. axonopodis* pv. *citrumelo* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม E (canker E) (Gottwald and Graham, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับ canker D (citrus bacteriosis) ที่พบที่ Colima ในประเทศเม็กซิโก (Rodriguez *et al.*, 1985)

Norman *et al.* (2005) ได้จัดจำแนกเชื้อสาเหตุของโรคแคงเกอร์ทั่วโลกไว้ 5 กลุ่ม โดยใช้วิธี DNA-DNA relatedness เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S - 23S intergenic spacer regions และวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) คือ กลุ่ม A จัดอยู่ใน pathovar *citri* กลุ่ม B C และ D จัดอยู่ใน pathovar *aurantifolii* กลุ่ม E จัดอยู่ใน pathovar *citrumelo* ซึ่งอยู่ใน species เดียวกันคือ *X. campestris* หรือ *X. axonopodis*

2.1 เชื้อสาเหตุโรค

สาเหตุโรคแคงเกอร์เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อนสั้นขนาด $0.5 - 0.75 \times 1.5 - 2.0$ ไมครอน จีโนมมีขนาด 5 Mbp เคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลา 1 เส้น (monotrichous flagella) และไม่สร้างสปอร์ จัดเป็น obligately aerobic เพราะต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตมาก (strictly aerobe) เพิ่มปริมาณโดยการแบ่งเซลล์ทุกๆ 20 - 30 นาที เชื้อผลิต xanthomonadin โคโลนีมีสีเหลือง กลม นูน ผิวเรียบเป็นมันเยิ้ม และขอบเรียบ สามารถสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสและแคตาเลส และย่อย (hydrolyse) แป้ง ออสทูลิน เคซีนและ จลาตินได้ดี ทำให้สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ไม่เกิดสารอินโดล ไม่เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ทำให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้เล็กน้อย (Goto, 1992) สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลอราบินอส กลูโคส แซคคาไรส แมนโนส กาแลคโตส และเทรฮาโรส (Anonymous, 2005) เกิดตะกอนในนมไม่ทำให้เกิด เอทิลเมทิลคาร์บิโนล สามารถใช้ซีเตรตใน Koser's citrate broth ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้ออยู่ในช่วง 27 - 30 องศาเซลเซียส

2.2 ลักษณะอาการ

อาการของโรคพบได้ทั้งบนใบ กิ่งและผล โดยเชื้อโรคจะเข้าทำลายในระยะที่เนื้อเยื่อยังอ่อนอยู่ เช่น ใบอ่อน กิ่งอ่อน ผลอ่อน จนถึงระยะกิ่งแก่กิ่งอ่อน (ระยะเพสลาด) โดยในระยะแรกจะเกิดเป็นจุดกลมใส น้ำน้ำ (water - soak) ขนาดเท่าหัวเข็มหมุด (pin - point spots) สีเหลืองอ่อน

(กณีนันท์, 2527) ต่อมาแผลจะขยายใหญ่มีลักษณะฟูล้ายฟองน้ำ แผลอาจจะนูนขึ้นทั้งสองด้านของใบ หรือด้านใดด้านหนึ่ง ต่อมาแผลจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะนูนฟูจะยุบตัวแล้วแตกออกเป็นสะเก็ด ตรงกลางบวม ขอบแผลบนใบจะมีสีเหลืองคล้ายวงแหวน (halo) ล้อมรอบ ขนาดแผลของส้มโอมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 - 12 มิลลิเมตร ขนาดของแผลที่พัฒนาเต็มที่แล้วในส้มโอจะมีขนาดใหญ่กว่าในพืชตระกูลส้มชนิดอื่นๆ และความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ส้ม และสภาพแวดล้อม เช่น ในกรณีที่มีฝนตกติดต่อกันหลายวัน โรคจะระบาดรุนแรง ทำให้ใบแก่ร่วงหมด ต่อมากิ่งจะแห้ง ทำให้ต้นส้มตายได้ อาการบนกิ่ง จะพบมากบนกิ่งอ่อน ลักษณะแผลจะนูนฟู เป็นสะเก็ดสีน้ำตาลคล้ายที่ใบขยายไปตามความยาวของกิ่ง แต่ไม่มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ รูปร่างแผลไม่แน่นอน ถ้าเป็นโรครุนแรงทำให้กิ่งแห้งตาย อาการที่ผล จะคล้ายกับอาการที่ใบ แผลจะนูนและปรูปรุคล้ายฟองน้ำ มีสีเหลือง แล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะวงแหวนสีเหลืองรอบแผลไม่ชัดเจนเท่าบนใบ ขนาดแผลรูปร่างไม่แน่นอน ถ้าเป็นมากอาจพบว่ามียางไหลออกมาจากบริเวณแผลได้ บางครั้งอาจทำให้เกิดผลแตกได้ด้วย ต้นพืชที่เป็นโรคมักจะทรุดโทรม แคร่แกร็น ใบร่วง กิ่งแห้งตาย ผลผลิตลดลง และอาจตายได้ในที่สุด (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2541)

2.3 การแพร่ระบาดของโรค

การแพร่ระบาดของเชื้อเข้าสู่พืชได้ดีทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปากใบ และทางบาดแผล ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการเสียดสีของกิ่งหรือใบที่ลมพัดแรงๆ หรือแผลที่เกิดจากการทำลายของแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนอนซอนใบส้ม (Citri leaf minor : *Phyllocnistis citrella*) เป็นตัวทำแผลและพาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าสู่พืช เชื้อจะเข้าสู่เนื้อเยื่อของพืช โดยทางช่องเปิดทางธรรมชาติได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อจะพัฒนาให้เกิดแผล คือ 10^4 - 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 10^2 - 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตรทางบาดแผล (Zubrzycki and Diamante, 1987) ถ้าอุณหภูมิระหว่าง 20 - 30 องศาเซลเซียส และมีความชื้นที่เหมาะสมอาการเริ่มแรกที่จะปรากฏเป็นแผลที่ใบใช้เวลาประมาณ 4 - 7 วัน (Koizumi, 1985) ถ้าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การแสดงอาการของโรคจะใช้เวลามากกว่า 60 วัน (Goto, 1992) ช่วงที่พืชอ่อนแอต่อการเข้าทำลาย คือ ช่วงใบอายุประมาณ 20 - 30 วัน หลังจากการขึ้นน้ำ ผลอ่อนอายุประมาณ 90 - 120 วัน และส้มโอที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี (เปรมปรี, 2544) (Graham *et al.*, 1992)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคและแพร่กระจายได้ดี คือ ในช่วงฤดูฝน เนื่องจากสภาพอุณหภูมิและความชื้นสูง เหมาะแก่การเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2541) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อจะเพิ่มปริมาณเป็นเท่าตัว แล้วปล่อย

extracellular polysaccharide matrix ออกมา และแพร่กระจายโดยอาศัยฝน (Pruvost *et al.*, 2002) ลมฝน (Timmer *et al.*, 1991) เข้าทำลาย กิ่ง ใบ ต้นที่ปกติได้ การแพร่ระบาดในแปลง เชื้อสาเหตุโรคจะแพร่กระจายได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเร็วลมอยู่ในช่วง 8 เมตรต่อวินาที (Kuhara, 1978) ความชื้นที่อยู่บนผิวพืชเป็นเวลา 20 นาที จะทำให้เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้มากขึ้น (Ramakrishnan, 1954) ส่วนการแพร่ระบาดของเชื้อโรคนี้อาศัยพื้นที่ต่างๆทั่วโลก เกิดจากการที่มนุษย์นำกิ่งพันธุ์ที่มีเชื้อโรคติดมาไปสู่พื้นที่ต่างๆ เชื้อสามารถแพร่กระจายเป็นระยะทางไกลไม่ต่ำกว่า 7 ไมล์โดยอาศัยพายุเฮอริเคนและเทอร์นาโด (Gottwald *et al.*, 2001) สำหรับการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ โดยปกติแล้วเชื้อสาเหตุโรคนี้อาจมีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่แห้งตายได้ไม่นานนักจะอยู่ได้เพียง 1 - 2 วันในดิน และ 1 - 2 เดือนในเศษซากพืชที่เป็นโรคนี้ที่ตกลงดินแล้วก็จะถูกย่อยสลายไป เชื้อสาเหตุโรคสามารถอยู่บนกิ่งแห้งของพืชเป็นโรคที่ไม่ได้ตกลงบนผิวดินได้นานหลายปี ในสภาพ saprophyte (Timmer *et al.*, 2000) ooze ของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวพืช ถ้าถูกแสงแดดโดยตรงจะแห้งตายภายในไม่กี่ชั่วโมง (Graham *et al.*, 2000) Rao and Hingorani (1963) พบว่าเชื้อสาเหตุสามารถรอดชีวิตได้นานถึง 6 เดือน บนใบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย และ 76 เดือน บนกิ่งที่ถูกเข้าทำลาย (Chakravarti *et al.*, 1966) แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดอยู่บนผิวพืชได้แต่มีปริมาณต่ำ หรืออาจอยู่ร่วมกับหญ้า และดิน (Leite and Mohan, 1984) เชื้อสาเหตุจะตายภายใน 24 - 72 ชั่วโมง เมื่ออยู่บนผิวโลหะ พลาสติก ฝ้าย และไม้ ทั้งกลางแดดและในที่ร่ม (Graham *et al.*, 2000)

2.4 การควบคุมโรค

แนะนำให้มีการจัดการในเรื่องด้านกักกันพืชอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันการนำเข้าซึ่งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช กิ่งพันธุ์ก่อนที่จะนำเข้ามาภายในพื้นที่ต้องแน่ใจว่าปลอดโรค หรือควรสั่งซื้อผลจากแหล่งที่พบว่าการระบาดของโรคอย่างรุนแรง วิธีนี้ประสบความสำเร็จอย่างมากในประเทศที่สามารถปฏิบัติได้อย่างเข้มงวด เช่น นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย ฟิจิ โมซัมบิก และบางประเทศบริเวณอ่าวเม็กซิโก แต่วิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยกฎหมายที่รัดกุมและเงินสนับสนุนค่อนข้างมาก (ภาควิชาโรคพืช, 2544) การใช้พันธุ์ต้านทานโรคที่พบว่าการต้านทานโรคคือ ส้มพันธุ์ ส้มมือ (*C. medica*) Kamquat (*Fortunella japonica*) และส้มแมนดารินพันธุ์ Szinkum ส่วนส้มที่อ่อนแอต่อโรคคือ ส้มโอ (*C. grandis*) ส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) และส้มเขียวหวาน (*C. nobilis*) มีการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ เช่น RHR-L-49 (Sai Sarbati) (Desai *et al.*, 1999) ALH-77 (lime x lemon hybrid) (Prasad *et al.*, 1997) หมั่นสำรวจโรคในแปลง ตัดแต่งส่วนที่เป็นโรคออก รวมทั้งเก็บเศษพืชและผลที่ร่วงหล่นในแปลงใส่ถุงพลาสติกนำไปเผาทำลาย หลังการตัดแต่งถ้าเป็นกิ่งขนาดใหญ่อาจหาผลด้วยปูนแดง หรือฉีดพ่นสารเคมีที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ

เช่น copper hydroxide copper oxychloride 500 ppm (Parts Per million) หรือ Bordeaux mixture (จุนสี : ปูนขาว : น้ำ อัตรา 4 : 4 : 50) เพื่อป้องกันโรค หรือลดการแพร่ระบาดของโรค (Kishun and Chand, 1987) โดยหลีกเลี่ยงการฉีดพ่นในขณะที่อากาศร้อนอบอ้าว และในระยะที่กำลังแตกใบอ่อน เพราะอาจทำให้พืชแสดงอาการใบไหม้ได้ ใช้ปฏิชีวนะพวก streptomycin เข้มข้น 300 ppm ฉีด ป้องกันโรคทุก 14 วัน หรือใช้ chloromycetin ผสมกับสารประกอบทองแดง และสารประกอบ อินทรีย์ของปรอททำให้ผลดี ในกรณีที่เป็นโรคระบาดแล้ว อาจใช้ streptomycin sulphate เข้มข้น 500 - 1,000 ppm ผสม glycerine 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ยาดูดซึมและเกาะส่วนของใบพืชได้ดี ฉีดพ่น ทุก 2 อาทิตย์ จะระงับการระบาดของโรคได้อย่างดี ควรฉีดสารเคมีป้องกันการระบาดของแมลง โดยเฉพาะหนอนชอนใบ เพื่อลดโอกาสของเชื้อที่จะเข้าทำลายพืชหลังจากการเข้าทำลายของแมลง และควรปลูกพืชเป็นแนวต้านลม เพื่อป้องกันไม่ให้พืชหักล้ม หรือเกิดการเสียดสีกันของใบมาก เกินไปจนทำให้เกิดแผลขึ้น (Timmer *et al.*, 2000) ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคมามาก่อนไม่ควร นำพืชที่อ่อนแอต่อโรคมาปลูก และควรบำรุงต้นให้แข็งแรงสมบูรณ์ โดยการให้น้ำและธาตุอาหาร อย่างเหมาะสม นอกจากจะทำให้ได้ผลผลิตดีทั้งด้านปริมาณและด้านคุณภาพ ยังช่วยให้พืชต้านทาน โรคได้ด้วย (ภาควิชาโรคพืช, 2544)

สารประกอบทองแดง สามารถลดจำนวนเชื้อสาเหตุที่อยู่บนผิวใบและสามารถ นำมาใช้ควบคุมโรคกับพันธุ์ส้มที่อ่อนแอได้ (Stall *et al.*, 1980) ควรฉีดพ่นสารประกอบทองแดง ในช่วงที่ผลมีขนาด 2.0 - 6.0 มิลลิเมตร คือในช่วง 90 - 120 วัน หลังกลีบดอกร่วง ขึ้นอยู่กับสาย พันธุ์ (Graham *et al.*, 1992) แต่การใช้สารประกอบทองแดงเป็นเวลานานติดต่อกันทำให้เชื้อสาเหตุ ด้านทานต่อสารประกอบทองแดง (Rinaldi and Leite, 2000) และมีการสะสมในดินเป็นพิษต่อพืช และสิ่งแวดลอม (Alva *et al.*, 1995)

3. การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลด กิจกรรมของเชื้อโรคอื่นจะก่อให้เกิดจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืช โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต (organism) ซึ่งรวมพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลิตภัณฑ์ทางพันธุกรรม (genes or gene products) แต่ยกเว้น ผลจากการกระทำต่อเชื้อโดยโรคตรงจากมนุษย์

3.1 หลักการหรือแนวคิดของการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธีประกอบด้วย

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตขึ้นโดยตรง (introduced antagonist) หรือการส่งเสริมให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ตามธรรมชาติในดินหรือบนผิวราก (resident antagonist) ทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช การปรับปรุงหรือพัฒนาวิธีเขตกรรมที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือศัตรูเชื้อโรค

การใช้พืชอาศัย (host plant) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรคพืชมาถ่ายทอดพันธุกรรมของพืชที่ต้านทานโรคสู่ genome ของพืชอาศัย

การใช้เชื้อโรคต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืช (cross protection) การใช้สายพันธุ์เชื้อชนิดอ่อน หรือการใช้สายพันธุ์เชื้อโรคที่สูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืช ปลูกลงในดินพืชเพื่อให้ต้นพืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (จิระเดช, 2546)

3.2 กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีของแบคทีเรีย

ในธรรมชาติแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มักนิยมเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) หรือเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) เชื้อปฏิปักษ์นี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช 4 ลักษณะ (นิพนธ์, 2538) คือ การแข่งขัน (competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืช คือ การใช้ธาตุอาหารอากาศ และการครอบครองพื้นที่ การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารที่มีปฏิชีวนะ คุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสาร (antibiotic) การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อที่เป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นให้ตายอย่างช้าๆและการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) นำเชื้อสาเหตุโรคมารักษาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้วปลูกเชื้อเข้าไปในดินพืช พืชจะต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ (Arwiyonto *et al.*, 1994)

3.3 การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มที่เกิดจากแบคทีเรีย

Kalita *et al.* (1996) รายงานการใช้วิธี biological control โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากบนผิวใบ (phylloplane) ส้ม Assam lemon คือ เชื้อ *Bacillus subtilis* B. polymyxa และ

P. fluorescence ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในบนอาหาร sucrose peptone agar (SPA) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อสาเหตุโรคมากที่สุด โดยมีบริเวณใส เท่ากับ 1.47 เซนติเมตร รองลงมาคือเชื้อ *P. fluorescence* และ เชื้อ *B. polymyxa* ตามลำดับ ซึ่งมีบริเวณใส เท่ากับ 1.39 และ 0.79 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อมาทดสอบบนใบส้ม Assam lemon ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยยับยั้งการเกิดโรคได้ 61.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วน เชื้อ *P. fluorescence* และ *B. polymyxa* ยับยั้งการเกิดโรค เท่ากับ 50.1 และ 38.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ลูบ
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย
4. แผ่นสไลด์แก้ว
5. ไมโครปิเปตและไมโครทิป
6. กล้องจุลทรรศน์
7. จานเลี้ยงเชื้อ
8. หลอดทดลอง
9. Millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
10. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
11. เครื่อง vortex mixer
12. Foggy
13. กระดาษกรอง
14. แท่งแก้วรูปตัว L
15. เครื่องเขย่า
16. ปากกีสบ
17. เครื่อง Spectrophotometer

วิธีการ

1. การแยกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

เก็บใบส้มโอและใบมะนาวที่เป็นโรคแคงเกอร์จากแปลงปลูกพืชทดลองของภาควิชาโรคพืช นำใบพืชมาล้างน้ำให้สะอาด เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ตัดใบตัวอย่างตรงบริเวณที่เป็นแผลให้มีส่วนที่เป็นโรคติดมาขนาด 3×3 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนใบตัวอย่างที่ตัดวางลงบนแผ่นสไลด์

ที่ลดไฟมาเชื้อแล้วหยดนํ้าหนึ่งมาเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนชิ้นส่วนใบตัวอย่าง ใช้แท่งแก้วที่จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ถนไฟและทิ้งให้เย็น บดชิ้นส่วน ทำการแยกเชื้อ โดยวิธี streak plate บนอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ ที่คาดว่าจะเป็เชื้อสาเหตุโรค ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ด้วยวิธีการ cross streak บนอาหาร NGA ซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรค (Agrios, 1997) โดยการปลูกเชื้อที่แยกได้บนใบด้วยวิธี detached leaf จากนั้นเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส เก็บไว้ในกลีซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 ที่แยกจากใบส้มโอ และสายพันธุ์ Xci112-1 ที่แยกจากใบมะนาวในอาหาร NGA อายุ 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อลงอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้มีค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ (จากใบอ้อย) *P. fluorescence* สายพันธุ์ C₂ (จากใบคะน้า) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ (จากใบมะนาว) และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ (จากใบมะนาว) ซึ่งทั้ง 4 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ในอาหาร NGA อายุ 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อลงอาหารเหลว NGB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 (10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร)

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี paper-disc diffusion (Anonymous, 1953) โดยนำเซลล์แขวนลอยของ *X. axonopodis* pv. *citri* แต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร NGA ที่หลอมและร้อนอุ่น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

แล้วเทลง จานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้หน้าอาหารแห้ง ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟฆ่าเชื้อ คีบแผ่นกระดาษกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ แต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 แผ่น โดยวาง 4 แผ่นต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ (ซ้ำ) ใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อหยดลงบนแผ่นกระดาษกลมแทนเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย วางบนผิวหน้าอาหารตรงกลางจานเดียวกัน (กรรมวิธีควบคุม) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* แต่ละสายพันธุ์ 4 ซ้ำ ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) วันที่ 1 2 3 5 และ 6 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างบริเวณใสดังนี้

ความกว้างบริเวณใส

$$= \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลาง paper disc รวมบริเวณใส} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ}}{2}$$

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอ

ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ C₄ และเชื้อสาเหตุโรค 2 สายพันธุ์ คือ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 ทำการทดลองด้วยวิธี detached leaf โดยเลือกใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นใบที่มีลักษณะการเจริญเต็มที่ (ใบเพสลาด) วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial experiments in completely randomized design) โดยศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย คือ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและกรรมวิธีในการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

ปัจจัยแรก ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะมี 3 ชนิด คือ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ปัจจัยที่สองกรรมวิธีในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอมี 16 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบ รอนจนแห้งจากนั้นหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคทันทีด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 2 หยดเซลล์แวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ด้านบนใบ จากนั้น 1 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แวนลอยเชื้อสาเหตโรคด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 3 หยดเซลล์แวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ด้านบนใบ จากนั้น 2 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แวนลอยเชื้อสาเหตโรคด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 4 หยดเซลล์แวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ด้านบนใบ จากนั้น 4 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แวนลอยเชื้อสาเหตโรคด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 5 หยอดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบ จากนั้น 6 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 6 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบและใต้ใบ รोजनแห่ง
จากนั้นหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคทันทีด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 7 หยอดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 1 วัน จึงหยอดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคที่ด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 8 หยดเซลล์แวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 2 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 9 หยอดเซลล์แวนดอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 4 วัน จึงหยอดด้วยเซลล์แวนดอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 10 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏย์ด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 6 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 11 หยดเซลล์แวนดอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบรอนแห่ง จึงหยดด้วยเซลล์
แวนดอยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 12 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบจากนั้น 1 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 13 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบ จากนั้น 2 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบ

กรรมวิธีที่ 14 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ รोजनแห้ง จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 15 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 1 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบและใต้ใบ

กรรมวิธีที่ 16 หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคด้านบนใบและใต้ใบ จากนั้น 2 วัน จึงหยดด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบและใต้ใบ

คิดเป็นทริทเมนต์คอมบินเนชันเท่ากับ 64 ทริทเมนต์คอมบินเนชัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 ใบ) นำใบส้มโอมาล้างด้วยน้ำ แล้วแช่ฆ่าเชื้อในคลอโรก อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 90 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก 2 - 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มใบ ชีกริมใบละ 4 จุด ชีกริมหนึ่งของใบหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุดแผล อีกชีกริมหนึ่งของใบเป็นชุดควบคุมโดยหยดน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแทนการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ใช้ในการทดลอง เตรียมให้มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุดแผล เก็บใบส้มโอบนถุงพลาสติกที่ใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร และมัดปากถุงเพื่อให้ความชื้นเหมาะสมแก่การเกิดโรค บันทึกผลการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 3 วัน บันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงโรค โดยจัดระดับความรุนแรงของโรค ดังนี้ ระดับที่ 0 (ไม่เกิดโรค) ระดับที่ 1 (เกิดจุดสีเทาที่แผล) ระดับที่ 2 (เกิดจุดสีขาวเริ่มพองบริเวณแผล) ระดับที่ 3 (เกิดจุดสีขาวพองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร) ทั้งนี้ ในกรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนเป็นเวลา 4 วันเป็นต้นไป จะทำการทดลองที่ต้นส้มโอ เพราะเนื่องจากวิธี detached leaf ต้องเก็บใบส้มโอมานำในห้องปฏิบัติการ ใบส้มโอที่เก็บมาจะมีอายุได้ประมาณ 6-7 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มเน่า ทำให้ไม่สามารถตรวจผลได้จึงต้องทำการทดลองที่

ต้นส้มโอ โดยหลังจากหยดเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามแต่ละกรรมวิธีแล้ว ใช้ถุงพลาสติกหุ้มทั้งกิ่ง เพื่อให้มีความชื้นเหมาะสมแก่การเกิดโรค

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

4.1 การทำเครื่องหมายให้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค

4.1.1 การทำเครื่องหมายให้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค

เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค จึงทำการคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้านทานต่อสารชนิดต่างๆ โดยเชื้อสาเหตุโรคให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ คือ streptomycin วิธีการดังนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร NGA อายุ 24-36 ชั่วโมง นำมา streak บนอาหาร NGA ที่มีส่วนผสม streptomycin ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 ppm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปและโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อที่เจริญบนอาหารมา streak บนอาหาร NGA ที่มีส่วนผสมของ streptomycin ความเข้มข้น 10 ppm อีก 2-3 ครั้ง นำเชื้อที่ต้านทาน streptomycin ความเข้มข้น 10 ppm มาชักนำให้ต้านทานที่ความเข้มข้น 30 50 70 และ 100 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 1 ชนิด คือ tetracycline และต้านทานต่อสารเคมี 1 ชนิด คือ copper oxychloride (ชื่อการค้า : พานาบล็อกซ์ ผลิตโดยบริษัท พานาแลบ จำกัด) หรือ copper hydroxide (ชื่อการค้า : โคไฮด์ ดีเอฟ ผลิตโดยบริษัท เจียไต่ จำกัด) ในแต่ละสายพันธุ์ มีวิธีการดังนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร NGA อายุ 24-36 ชั่วโมง นำเชื้อ streak บนอาหาร NGA ที่มีส่วนผสม tetracycline ความเข้มข้น เริ่มต้น 10 ppm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ใช้ลูปและโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อที่เจริญบนอาหารมา streak บนอาหาร NGA ที่มีส่วนผสมของ tetracycline ความเข้มข้น 10 ppm อีก 2-3 ครั้ง นำเชื้อที่ต้านทาน tetracycline ความเข้มข้น 10 ppm มาชักนำให้ต้านทานที่ความเข้มข้น 20 30 40 และ 50 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ต้านทานต่อ tetracycline มาชักนำให้ต้านทานสารเคมี 1 ชนิด ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน แต่ชักนำให้ต้านทานที่ความเข้มข้น 30 50 70 90 120 และ 150 ppm แล้วนำโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ถูกชักนำให้ต้านทานต่อ tetracycline และสารเคมีมา streak บนอาหาร NGA ที่มี tetracycline และสารเคมีอีก 4 ครั้ง

4.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและ *X. axonopodis* pv. *citri* หลังการติดเครื่องหมาย

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยทดสอบด้วยวิธี paper-disc diffusion เช่นเดียวกับข้อ 2 ส่วนเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r (Xci133-1 ด้านทานสาร streptomycin) ทดสอบด้วยวิธี detached leaf กับใบส้มโอปั่นขาวน้ำฝัองอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำใบส้มโอมาล้างด้วยน้ำเปล่า แล้วแช่ฆ่าเชื้อในคลอรีน สัดส่วน 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 90 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก 2 - 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดแผลลึกใบละ 4 จุด ชีกหนึ่งของใบหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุด ส่วนอีกชีกหนึ่งของใบ หยดน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุด เก็บใบส้มโอบนถุงพลาสติกที่ใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร และมัดปากถุงเพื่อให้มีความชื้นเหมาะสมแก่การเกิดโรค ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ (ใบ) โดยใช้ใช้น้ำนิ่งฆ่าเป็นวิธีควบคุม บันทึกการเกิดโรค (บริเวณแผลมีจุดนูนฟูสีขาว) หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 5 วัน

4.2 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์และเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในสภาพโรงเรือน

การศึกษการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในสภาพโรงเรือน โดยทำการทดลองกับส้มโที่ปลูกในกระถางเคลือบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 75 เซนติเมตร ในแปลงทดลองภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 และ 0.7 ตามลำดับ (ปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร)

4.2.1 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเมื่อทำการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ 1 ครั้ง

ทำแผลที่ใบโดยใช้เข็มจิ้มใบชีกละ 1 จุด แล้วฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ (C₄ ด้านทาน tetracycline และ copper oxychloride) รอนใบแห้งจึงฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ (ต้น) แต่ละซ้ำใช้ 2 กิ่ง และฉีดพ่นน้ำเป็นกรรมวิธีควบคุม

บนต้นเดียวกัน โดยใช้ 2 กิ่งต่อต้น เช่นเดียวกัน สุ่มเก็บใบส้มโอจากต้นหลังจากฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน จำนวน 4 ใบต่อซ้ำ ตัดใบเป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร โดยตัดจากตำแหน่งปลายใบ โคนใบ ขอบใบ กลางใบ และบริเวณที่ทำแผลมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม ใส่ชิ้นใบลงขวดที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการเจือจางที่ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5} คูดสารแขวนลอยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาแยกเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะและสารเคมีที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคด้านทานบ่มเชื้อไว้ 48-72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรค

4.2.2 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่อฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ครั้ง

ทำแผลโดยการใช้เข็มจิ้มใบซีกละ 1 จุด กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ mC₄ รองนแหงจึงฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r จากนั้นทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ อีก 3 ครั้ง ในวันที่ 5 10 และ 15 สุ่มเก็บใบส้มโอกครั้งที 1 หลังจากการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 1 วัน สุ่มเก็บใบส้มโอกครั้งที 2 3 4 และ 5 ในวันที่ 5 10 15 และ 30 ตามลำดับ (ในการสุ่มเก็บใบส้มโอกครั้งที 2 3 และ 4 ให้เก็บก่อนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ครั้งต่อไป) กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride (ครั้งเดียว) รองนแหงจึงฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r สุ่มเก็บใบเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 โดยสุ่มเก็บใบจำนวน 4 ใบต่อซ้ำ ตัดใบเป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร โดยตัดจากตำแหน่งปลายใบ โคนใบ ขอบใบ กลางใบ และบริเวณที่ทำแผลมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม ใส่ชิ้นใบลงขวดที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาทีทำการเจือจางที่ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5} คูดสารแขวนลอยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร แยกเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะและสารเคมีที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคด้านทานบ่มเชื้อไว้ 48 - 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ (ต้น) แต่ละต้นใช้ 2 กิ่ง โดยฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อย่างเดียวเป็นกรรมวิธีควบคุม 2 กิ่ง

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

ทดสอบบนต้นส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ปลูกในกระถางเคลือบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 75 เซนติเมตร (ปริมาตร 40 ลิตร) อายุ 5 ปี ที่แปลงทดลองภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม เลือกกิ่งที่เจริญเต็มที่และมีใบเพศลวดทำการทดลอง ดังนี้ ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มบนใบ ชีกละ 1 จุด แล้วจึงฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ที่เตรียมในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ มีค่า OD ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7 (ปริมาณเชื้อ 10⁸ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) รองนแห้งจึงทำการฉีดพ่นแขวนลอยของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r ที่เตรียมในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 (ปริมาณเชื้อ 10⁸ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) บันทึกจำนวนแผลต่อต้นที่เกิดขึ้น ณ จุดทำแผล และทั้งใบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 30 วัน โดยฉีดพ่นน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อแทนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นกรรมวิธีควบคุม วางแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ (ต้น) โดยแต่ละต้นเลือกใช้ 2 กิ่ง และแต่ละกิ่งใช้ 7 ใบนับจากปลายกิ่ง

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและสารเคมีในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

ทดสอบบนต้นส้มโอที่ปลูกในกระถางเคลือบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 75 เซนติเมตร (ปริมาตร 40 ลิตร) อายุ 5 ปี เลือกกิ่งที่เจริญเต็มที่และใบเพศลวดทำการทดลอง ในแปลงทดลองภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน โดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีค่า OD ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7 และเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r มีค่า OD ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 ฉีดพ่นดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ทำแผลที่ใบชีกละ 1 จุด แล้วฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ รองนแห้งจึงทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r และทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ อีก 3 ครั้ง ในวันที่ 5 10 และ 15 กรรมวิธีที่ 2 โดยทำแผลที่ใบชีกละ 1 จุด แล้วฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride (สัดส่วน 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร) 1 ครั้ง รองนแห้งจึงทำการฉีดพ่น เซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r

นับจำนวนจุดแผลต่อต้านที่เกิดขึ้นบนใบหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ (ต้น) แต่ละต้นใช้ 2 กิ่ง และแต่ละกิ่งใช้ 7 ใบนับจากปลายกิ่ง กรรมวิธีควบคุม ฉีดพ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแทนการใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5. การทดสอบประสิทธิภาพ culture filtrate ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ

การเตรียม culture filtrate ใช้วิธีดัดแปลงจาก Dhingra และ Sinclair (1994) โดยนำเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₁ (C₁ ที่ต้านทาน tetracycline และ copper hydroxide) สายพันธุ์ C₃ (สายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะและสารเคมี) สายพันธุ์ mC₄ (C₄ ที่ต้านทาน tetracycline และ copper oxychloride) ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะและสารเคมีที่แต่ละสายพันธุ์ต้านทานอายุ 24 - 48 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร NGB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองเซลล์แบคทีเรียออกโดยใช้ millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จนเหลือแต่ culture filtrate จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพ culture filtrate ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธีการ paper-disc diffusion บนอาหาร NGA ที่ผสมเชื้อสาเหตุโรค โดยนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร NGA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่หลอมและรอจนอุ่น ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อ รอให้หน้าอาหารแห้ง ใช้ปากคีบที่จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟฆ่าเชื้อ คีบแผ่นกระดาษกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่หยดด้วย culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₁, C₃ และ mC₄ ปริมาตร 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตรต่อแผ่น วางบนอาหารที่ผสมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r โดยวาง 4 แผ่น (ความเข้มข้นละ 1 แผ่น) ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 จานเลี้ยงเชื้อ (ซ้ำ) ใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อหยดลงบน แผ่นกระดาษกลม แทน culture filtrate ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์วางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อเดียวกัน (กรรมวิธีควบคุม) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีบริเวณใสตามวิธีข้อ 2 หลังการวาง แผ่นกระดาษกลม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ โดยดูการสร้างสปอร์ และตรวจลักษณะเซลล์โดยศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า หลังจากผ่านการย้อมสีแกรม และย้อมสีเอนโดสปอร์ จากนั้น ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยเลี้ยง

เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ บนอาหารNGA อายุ 48 ชั่วโมง นำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ การใช้ออกซิเจน การรีดิวส์ไนเตรท การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างเอนไซม์แคตาเลส การย่อยเจลาติน การย่อยแป้ง การรีดิวส์ไนเตรต การเจริญเติบโตในสภาพกรดและทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลแมนนิทอล ควบคุมมาตรฐานของวิธีการทดสอบโดยนำเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ATCC6633 *B. subtilis* สายพันธุ์ E7-1 7 และ *P. putida* สายพันธุ์ Sg 1 มาทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ จากนั้นนำข้อมูลเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ mC₄ ที่ได้จากการทดสอบไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic เล่มที่ 2 (Sneath, 1986) และ Bergey's Manual of Determinative เล่มที่ 8 (Holt *et al*, 1994)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทาง การเกษตร และแปลงทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาการทําวิจัย วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2550 ถึง 30 เมษายน พ. ศ. 2551

ผลและวิจารณ์

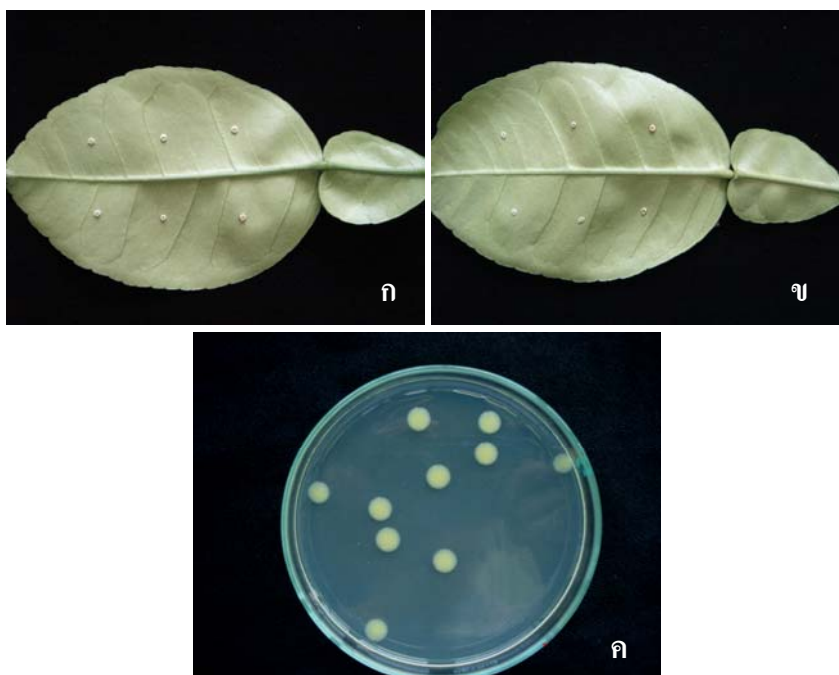
ผล

1. การแยกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

สามารถแยกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบส้มโอ และใบมะนาว ที่แสดงอาการโรคแคงเกอร์จากแปลงทดลองภาควิชาโรคพืชได้จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ Xci133-1 ที่แยกจากใบส้มโอ และสายพันธุ์ Xci112-1 ที่แยกได้จากใบมะนาว โดยโคโลนีมีลักษณะ สีเหลือง กลมมน ขอบเรียบ เมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่แยกได้โดยการปลูกเชื้อบนใบด้วยวิธี detached leaf อายุใบ 2 สัปดาห์ พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้ใบส้มโอแสดงอาการโรคหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงระดับความรุนแรงการเกิดโรคเท่ากันและทำให้เกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิบัณในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิบัณในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีทดสอบ paper-disc diffusion ในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียปฏิบัณ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทั้งสายพันธุ์ Xci133-1 และสายพันธุ์ Xci112-1 ได้ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างบริเวณใสกว้างที่สุดวันที่ 5 และวันที่ 6 เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.97 เซนติเมตร รองลงมาคือเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ ตามลำดับ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ มีความกว้างบริเวณใสกว้างที่สุดวันที่ 3 เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.93 เซนติเมตร และลดลงในวันที่ 5 และวันที่ 6 เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ มีความกว้างบริเวณใสกว้างที่สุดวันที่ 1 และวันที่ 2 เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.77 เซนติเมตร และลดลงในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 6 ส่วน และ *P. fluorescence* สายพันธุ์ C₂ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ (ตารางที่1) (ภาพที่2)



ภาพที่ 1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและลักษณะของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชที่เป็นโรค

- ก. ลักษณะแผลเมื่อปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มที่แยกจากใบส้มโอ หลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง
- ข. ลักษณะแผลเมื่อปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci112-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มที่แยกจากใบมะนาว หลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน บนใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง
- ค. ลักษณะโคโลนีเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ บนอาหาร NGA อายุ 3 วัน

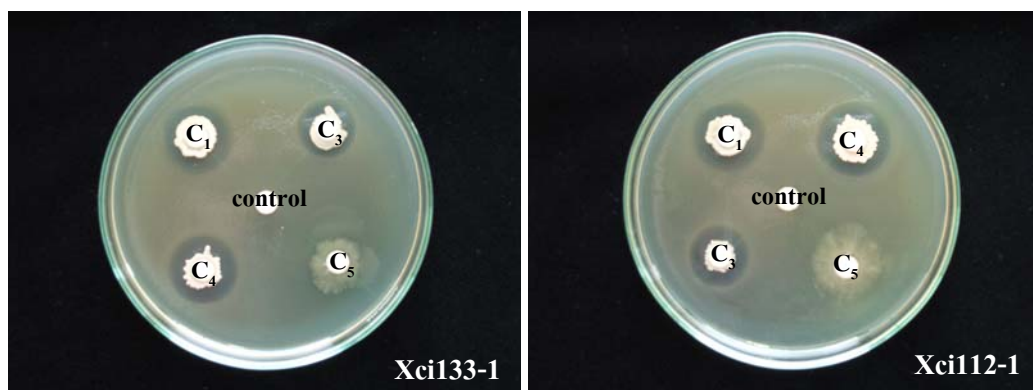
ตารางที่ 1 ความกว้างบริเวณใสที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ และ สายพันธุ์ Xci112-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว โดยการทดสอบด้วยวิธี paper-disc diffusion บนอาหาร NGA หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 5 และ 6 วัน

สายพันธุ์เชื้อ แบคทีเรีย ปฏิชีวนะ	สายพันธุ์เชื้อ สาเหตุโรค	ความกว้างบริเวณใส (เซนติเมตร) ^{1/}				
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 6
<i>Bacillus</i> sp. C ₁	Xci133-1	0.84	0.92	0.93	0.89	0.86
	Xci112-1	0.85	0.90	0.93	0.89	0.84
	ค่าเฉลี่ย	0.845	0.91	0.93	0.89	0.85
<i>P.</i> <i>fluorescence</i> C ₂	Xci133-1	0	0	0	0	0
	Xci112-1	0	0	0	0	0
	ค่าเฉลี่ย	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> sp. C ₃	Xci133-1	0.78	0.78	0.78	0.69	0.69
	Xci112-1	0.76	0.76	0.73	0.71	0.67
	ค่าเฉลี่ย	0.77	0.77	0.755	0.70	0.68
<i>Bacillus</i> sp. C ₄	Xci133-1	0.85	0.94	0.94	0.94	0.94
	Xci112-1	0.92	0.94	0.97	1.00	1.00
	ค่าเฉลี่ย	0.885	0.94	0.955	0.97	0.97

1/ ความกว้างบริเวณใส

= $\frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลาง paper disc รวมบริเวณใส} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ}}{2}$



ภาพที่ 2 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ *P. fluorescence* สายพันธุ์ C₂ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ C₄ และ กรรมวิธีควบคุม (control) ที่ระยะเวลา 6 วัน บนอาหาร NGA

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอ

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการประเมินโรคในทรีทเมนต์คอมบินเนชันต่าง ๆ มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่า มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างปัจจัยหลักที่ทำการทดสอบ คือ มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณและกรรมวิธีในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอ

จากการประเมินการเกิดโรคโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านบนใบส้มโอ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁, C₃ และ C₄ ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์สาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 บนใบส้มโอ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁, C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรค โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้น้ำฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิบัณ) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ที่ทำการหยดในแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธีที่ 1 - 16) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 37.5 25 25 12.5 100 43.75 18.75 12.5 6.25 100 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 61.33 เปอร์เซ็นต์ โดยในชุดควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 100 93.75 79.25 79.25 100 100 93.75 93.75 79.25 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 94.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อประเมินประสิทธิภาพกรรมวิธีในการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่า กรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณด้านบนใบอย่างเดียวก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรค สายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 5) และกรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 10) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁, C₃, C₄ และชุดควบคุม ในกรรมวิธีที่ 5 เท่ากับ 25 25 12.5 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 35.44 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ 10 เท่ากับ 18.75 31.25 6.25 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 33.88 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) เมื่อมาพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ในกรรมวิธีที่ 5 และ กรรมวิธีที่ 10 โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค เท่ากับ 84.23 และ 92.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากการประเมินการเกิดโรคโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านใต้ใบส้มโอ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์สาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 บนใบส้มโอ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเกิดโรค โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ใช้น้ำมาเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิปักษ์) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ที่ทำการหยดในแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธีที่ 1 – 16) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 81.25 25 12.5 12.5 100 62.5 18.75 18.25 12.5 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 65.2 เปอร์เซ็นต์ โดยในชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 100 100 81.25 79.25 100 100 100 93.75 81.25 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 95.58 เปอร์เซ็นต์ เมื่อประเมินประสิทธิภาพกรรมวิธีในการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่า กรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบอย่างเดียวก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรค สายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 5) และกรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 10) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ C₄ และชุดควบคุม ในกรรมวิธีที่ 5 เท่ากับ 25 31.25 12.5 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ 10 เท่ากับ 18.75 25 12.5 และ 81.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 34.38 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เมื่อมาพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ในกรรมวิธีที่ 5 และ กรรมวิธีที่ 10 โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค เท่ากับ 84.23 และ 84.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

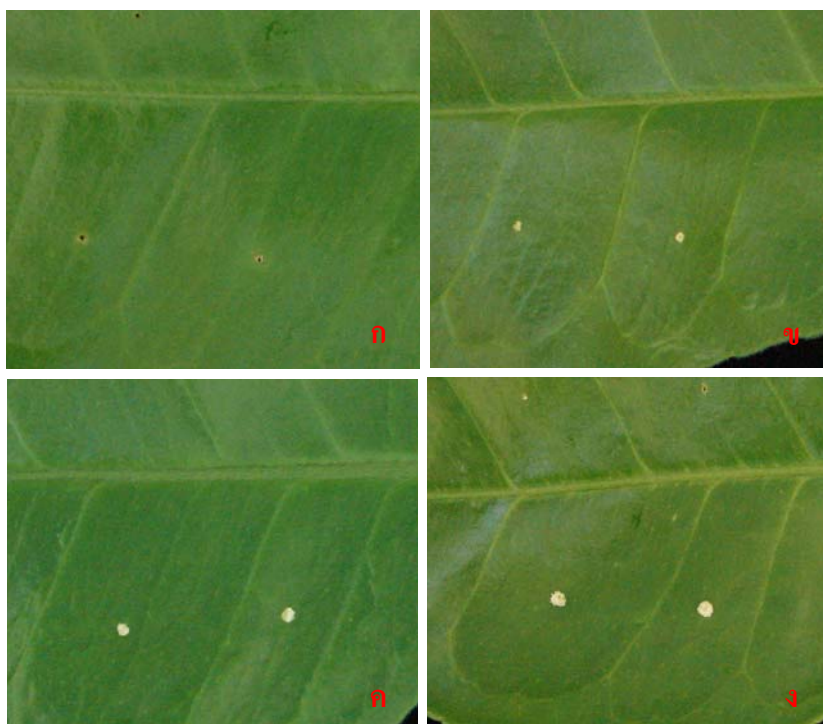
จากการประเมินการเกิดโรคโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านบนใบส้มโอ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์สาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci112-1 บนใบส้มโอ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเกิดโรค โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ใช้น้ำมาเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิปักษ์) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ที่ทำการหยดในแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธีที่ 1 – 16) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 68.75 37.5 25 12.5 100 43.75 18.75 12.5 12.5 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 64.45 เปอร์เซ็นต์ โดยในชุดควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 100 85.25 79.25 79.25 100 100

93.75 93.75 79.25 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 94.02 เปอร์เซ็นต์ เมื่อประเมินประสิทธิภาพกรรมวิธีในการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่า กรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบอย่างเดียวก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci112-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 5) และกรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci112-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 10) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ C₄ และชุดควบคุม ในกรรมวิธีที่ 5 เท่ากับ 25 25 12.5 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 35.44 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ 10 เท่ากับ 25 31.25 12.5 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) เมื่อมาพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ในกรรมวิธีที่ 5 และ กรรมวิธีที่ 10 โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค เท่ากับ 84.23 และ 84.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากการประเมินการเกิดโรคโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านใต้ใบส้มโอ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์สาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci112-1 บนใบส้มโอ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเกิดโรค โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ใช้น้ำมาเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิชีวนะ) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ที่ทำการหยดในแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธีที่ 1 – 16) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 100 50 31.25 18.75 100 62.5 18.75 18.25 18.75 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 71.06 เปอร์เซ็นต์ โดยในชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 100 100 81.25 79.25 100 100 100 93.75 81.25 100 100 100 100 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 95.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อประเมินประสิทธิภาพกรรมวิธีในการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่า กรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบอย่างเดียวก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 (กรรมวิธีที่ 5) และกรรมวิธีที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 เป็นเวลา 6 วัน (กรรมวิธีที่ 10) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ C₄ และชุดควบคุม ในกรรมวิธีที่ 5 เท่ากับ 25 31.25 18.75 และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยเท่ากับ 38.56 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ 10 เท่ากับ 25 25 18.75 และ 81.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เฉลี่ยเท่ากับ 37.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เมื่อมาพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ในกรรมวิธีที่ 5 และ กรรมวิธีที่ 10 โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค เท่ากับ 76.34 และ 76.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากการศึกษาระดับความรุนแรงของโรคบนใบส้มโอ โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรค เป็น 3 ระดับ คือ ระดับที่ 0 (ไม่เกิดโรค) ระดับที่ 1 (เกิดจุดสีขาวที่แผล) ระดับที่ 2 (เกิดจุดสีขาวเริ่มพุ่มบริเวณแผล) ระดับที่ 3 (เกิดจุดสีขาวพุ่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร) เมื่อหยดเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ที่ด้านบนใบก่อนหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 พบว่า เมื่อทำการหยดเป็นเวลา 1 2 4 และ 6 วัน เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยด้านบนใบอยู่ที่ระดับ 1 ด้านใต้ใบอยู่ที่ระดับ 1.9 ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ ชุดควบคุมระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยด้านบนใบเท่ากับ 1.78 1.69 และ 2.22 ตามลำดับ ด้านใต้ใบเท่ากับ 2.11 2.22 และ 2.81 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ส่วนการหยดเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ที่ด้านบนใบและใต้ใบก่อนหยดเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 พบว่า เมื่อทำการหยดเป็นเวลา 1 2 4 และ 6 วัน เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยด้านบนใบ เท่ากับ 1.29 ด้านใต้ใบ เท่ากับ 1.48 ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ กรรมวิธีควบคุมระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยด้านบนใบเท่ากับ 1.49 1.77 และ 2.41 ตามลำดับ และระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยด้านใต้ใบ เท่ากับ 1.83 2 และ 2.65 ตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 ระดับความรุนแรงโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอที่ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มและหยดเชื้อสาเหตุโรค เป็นระยะเวลา 3 วัน

- ก ระดับที่ 0 (ไม่เกิดโรค)
- ข ระดับที่ 1 (เกิดจุดสีขาวที่แผล)
- ค ระดับที่ 2 (เกิดจุดสีขาวฟูบริเวณแผล)
- ง ระดับที่ 3 (เกิดจุดสีขาวฟูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านบนใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ *Bacillus* sp.

(Ab) สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอ ^{1/}				ค่าเฉลี่ย อิทธิพลของ กรรมวิธี
	C ₁	C ₃	C ₄	น้ำ	
1. Ab + Xac (บนใบ)	100 a ^{2/}	100 a	100 a	100 a	100 (a) ^{3/}
2. Ab 1 วัน + Xac (บนใบ)	62.5 c	81.25 b	37.5 d	100 a	70.31 (b)
3. Ab 2 วัน + Xac (บนใบ)	43.75 b	37.5 b	25 c	93.75 a	50 (d)
4. Ab 4 วัน + Xac (บนใบ)	31.25b	43.75b	25b	79.25 a	44.81 (de)
5. Ab 6 วัน + Xac (บนใบ)	25b	25b	12.5c	79.25 a	35.44 (fg)
6. Ab + Xac (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
7. Ab 1 วัน. + Xac (บนและใต้ใบ)	43.75 c	62.5 b	43.75 c	100 a	62.5 (c)
8. Ab 2 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	31.25 b	43.75 b	18.75 c	93.75 a	46.88 (de)
9. Ab 4 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	25 b	37.5 b	12.5 c	93.75 a	42.19 (ef)
10. Ab 6 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	18.75 c	31.25 b	6.25 d	79.25 a	33.88 (g)
11. Xac + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
12. Xac 1 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
13. Xac 2 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
14. Xac + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
15. Xac 1 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
16. Xac 2 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	67.58 (c) ^{4/}	72.66 (b)	61.33 (d)	94.94 (a)	

$$1/ \text{ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนจุดแผลบนใบที่แสดงอาการโรค} \times 100}{\text{จำนวนจุดที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

ตารางที่ 2 (ต่อ)

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

4/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านใต้ใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ *Bacillus* sp.

(Ab) สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอ ^{1/}				ค่าเฉลี่ย อิทธิพลของ กรรมวิธี
	C ₁	C ₃	C ₄	น้ำ	
1. Ab + Xac (บนใบ)	100 a ^{2/}	100 a	100 a	100 a	100 (a) ^{3/}
2. Ab 1 วัน + Xac (บนใบ)	100 a	100 a	81.25b	100 a	100 (a)
3. Ab 2 วัน + Xac (บนใบ)	62.5 c	75 b	25 d	100 a	64.06(c)
4. Ab 4 วัน + Xac (บนใบ)	43.75 b	37.5 b	12.5 c	81.25 a	43.75(de)
5. Ab 6 วัน + Xac (บนใบ)	25 b	31.25 b	12.5 c	79.25 a	37(ef)
6. Ab + Xac (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
7. Ab 1 วัน. + Xac (บนและใต้ใบ)	75 b	75 b	62.5 c	100 a	78.13 (b)
8. Ab 2 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	56.25 b	56.25 b	18.75 c	100 a	57.81 (c)
9. Ab 4 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	31.25 b	43.75 b	18.25 c	93.75 a	46.75 (d)
10. Ab 6 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	18.75 c	25 b	12.5 d	81.25 a	34.38 (f)
11. Xac + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
12. Xac 1 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
13. Xac 2 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
14. Xac + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
15. Xac 1 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
16. Xac 2 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	75.78 (b) ^{4/}	77.73 (b)	65.2 (c)	95.58 (a)	

$$1/ \text{ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนจุดแผลบนใบที่แสดงอาการโรค} \times 100}{\text{จำนวนจุดที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

ตารางที่ 3 (ต่อ)

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

4/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านบนใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ *Bacillus* sp.

(Ab) สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci112-1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอ ^{1/}				ค่าเฉลี่ย อิทธิพลของ กรรมวิธี
	C ₁	C ₃	C ₄	น้ำ	
1. Ab + Xac (บนใบ)	100 a ^{2/}	100 a	100 a	100 a	100 (a) ^{3/}
2. Ab 1 วัน + Xac (บนใบ)	81.25 b	68.75 b	68.75 b	100 a	79.69 (b)
3. Ab 2 วัน + Xac (บนใบ)	50 b	56.25b	37.5 c	85.25 a	57.25 (c)
4. Ab 4 วัน + Xac (บนใบ)	25 b	31.25 b	25 b	79.25 a	40.13 (de)
5. Ab 6 วัน + Xac (บนใบ)	25 b	25b	12.5c	79.25 a	35.44 (e)
6. Ab + Xac (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
7. Ab 1 วัน. + Xac (บนและใต้ใบ)	43.75 c	62.5 b	43.75 c	100 a	60.94 (c)
8. Ab 2 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	31.25 b	43.75 b	18.75 c	93.75 a	46.88 (d)
9. Ab 4 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	25 b	37.5 b	12.5 c	93.75 a	42.19 (de)
10. Ab 6 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	25 b	31.25 b	12.5 c	79.25 a	37 (e)
11. Xac + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
12. Xac 1 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
13. Xac 2 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
14. Xac + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
15. Xac 1 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
16. Xac 2 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	69.14 (b) ^{4/}	72.27 (b)	64.45 (c)	94.02 (a)	

$$1/ \text{ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนจุดแผลบนใบที่แสดงอาการโรค} \times 100}{\text{จำนวนจุดที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

ตารางที่ 4 (ต่อ)

- 2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test
- 3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test
- 4/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้านใต้ใบของใบส้มโอที่ทำแผลแล้วหยดเชื้อ *Bacillus* sp.

(Ab) สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci112-1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอ ^{1/}				ค่าเฉลี่ย อิทธิพลของ กรรมวิธี
	C ₁	C ₃	C ₄	น้ำ	
1. Ab + Xac (บนใบ)	100 a ^{2/}	100 a	100 a	100 a	100 (a) ^{3/}
2. Ab 1 วัน + Xac (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
3. Ab 2 วัน + Xac (บนใบ)	62.5 c	75 b	50 d	100 a	70.31 (c)
4. Ab 4 วัน + Xac (บนใบ)	43.75 b	50 b	31.25 c	81.25 a	51.56 (de)
5. Ab 6 วัน + Xac (บนใบ)	25 c	31.25 b	18.75 d	79.25 a	38.56 (f)
6. Ab + Xac (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
7. Ab 1 วัน. + Xac (บนและใต้ใบ)	75 b	75 b	62.5 c	100 a	81.25 (b)
8. Ab 2 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	56.25 b	56.25 b	18.75 c	100 a	57.81 (d)
9. Ab 4 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	31.25 b	43.75 b	18.25 c	93.75 a	46.75 (e)
10. Ab 6 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	25 c	25 b	18.75 c	81.25 a	37.5 (f)
11. Xac + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
12. Xac 1 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
13. Xac 2 วัน + Ab (บนใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
14. Xac + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
15. Xac 1 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
16. Xac 2 วัน + Ab (บนและใต้ใบ)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 (a)
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	76.17 (b) ^{4/}	78.52 (b)	71.06 (c)	95.19 (a)	

$$1/ \text{ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนจุดแผลบนใบที่แสดงอาการโรค} \times 100}{\text{จำนวนจุดที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

ตารางที่ 5 (ต่อ)

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

4/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษร (ในวงเล็บ) ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

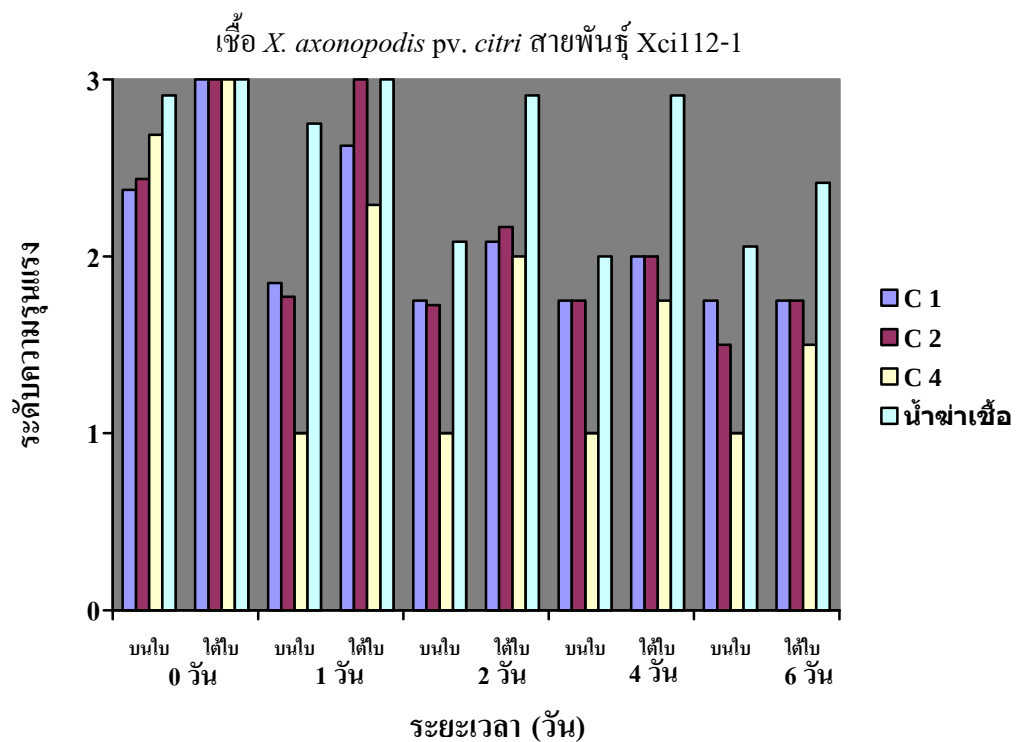
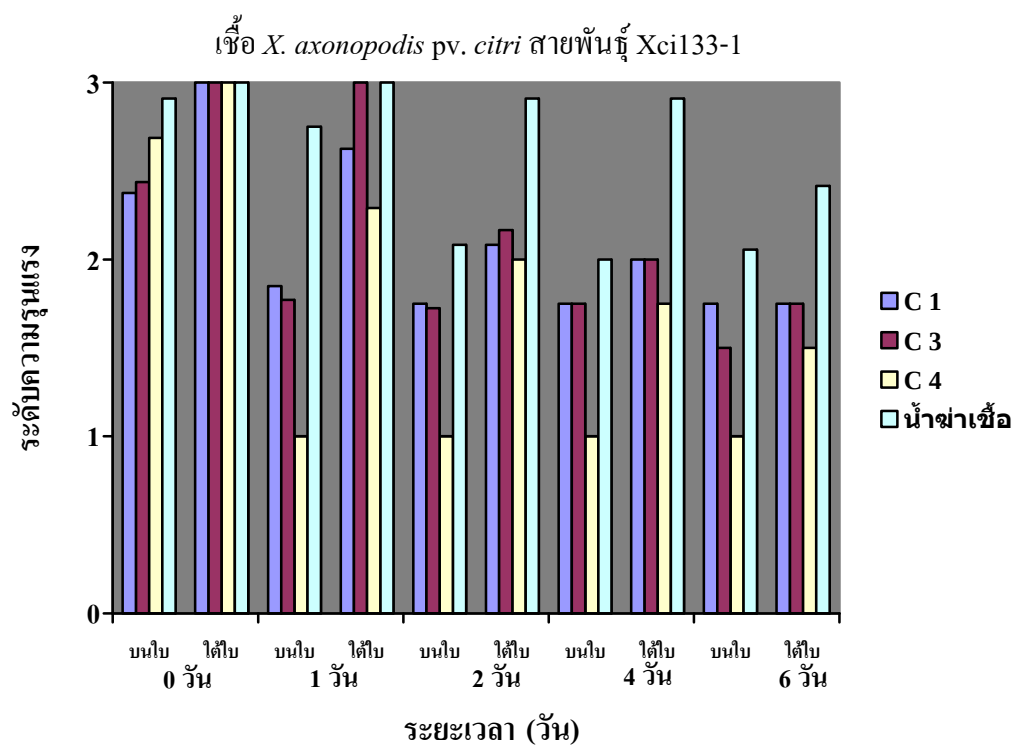
($P < 0.05$) วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ด้านบนใบ และใต้ใบส้มโอ เมื่อทำการทดสอบโดยหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ C₄ ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Xac) สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 ด้านบนใบและใต้ใบที่ระยะเวลาต่างๆ

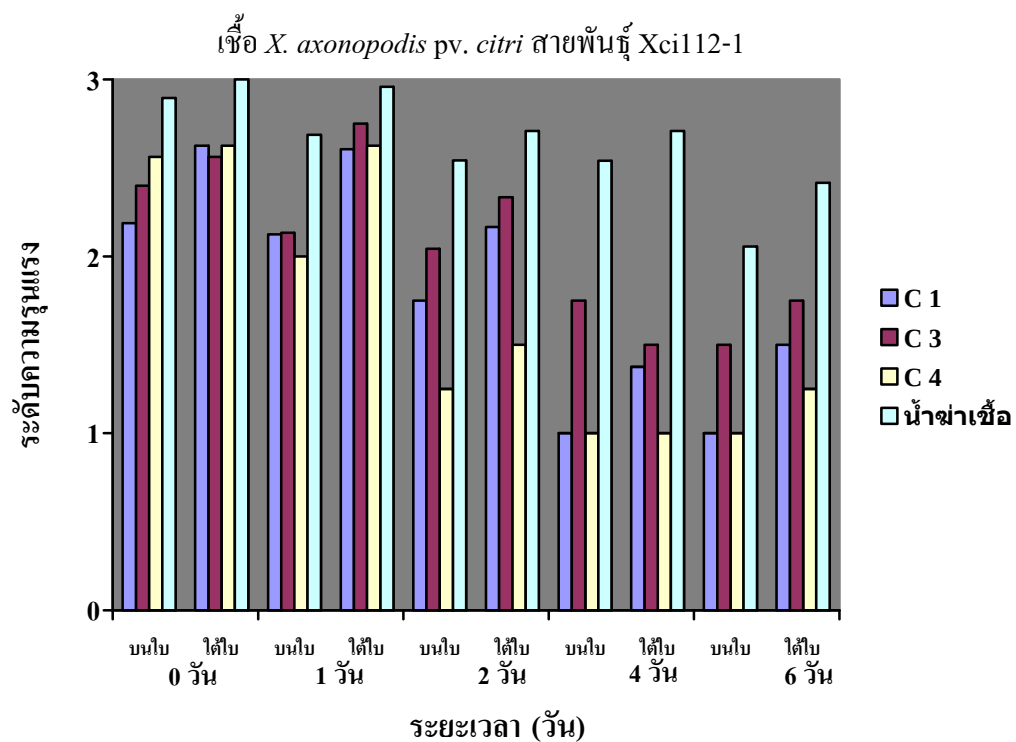
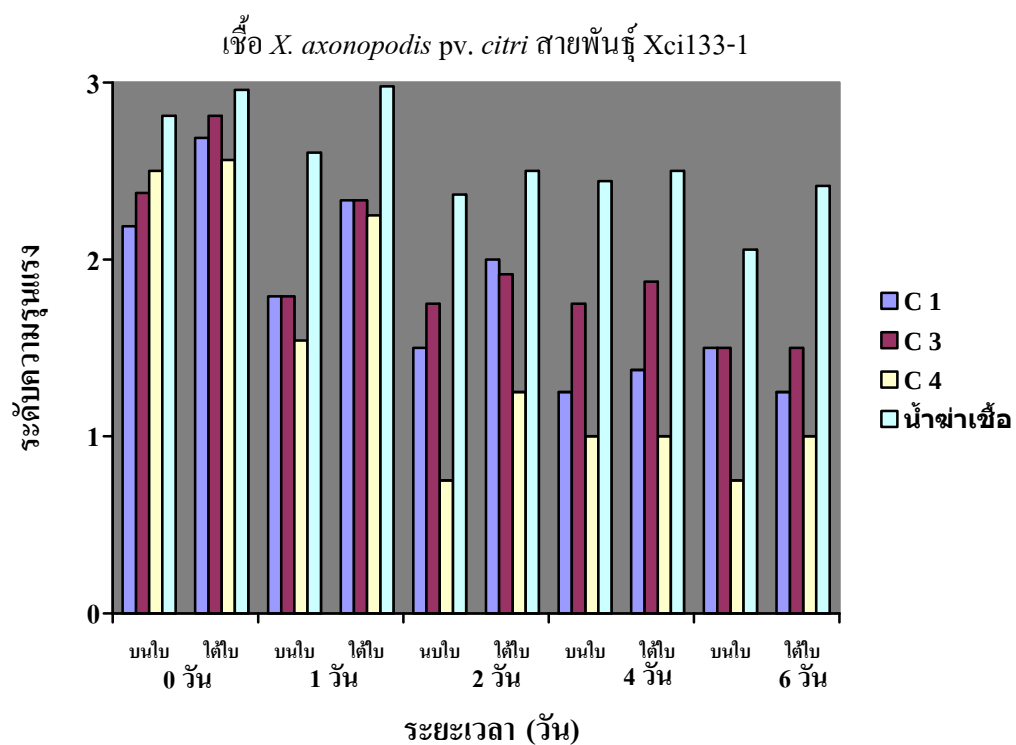
กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนส้มโอ ^{1/}			
	Xci133-1		Xci112-1	
	ด้านบนใบ	ด้านใต้ใบ	ด้านบนใบ	ด้านใต้ใบ
1. C ₄ + Xac (บนใบ)	0	0	0	0
2. C ₄ 1 วัน + Xac (บนใบ)	62.5	18.75	31.25	0
3. C ₄ 2 วัน + Xac (บนใบ)	73.33	75	56.01	50
4. C ₄ 4 วัน + Xac (บนใบ)	68.45	84.62	68.45	61.54
5. C ₄ 6 วัน + Xac (บนใบ)	84.23	84.23	84.23	76.34
6. C ₄ + Xac (บนและใต้ใบ)	0	0	0	0
7. C ₄ 1 วัน. + Xac (บนและใต้ใบ)	56.25	37.5	56.25	37.5
8. C ₄ 2 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	80	81.25	80.27	81.25
9. C ₄ 4 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	86.67	80.53	86.67	80.53
10. C ₄ 6 วัน + Xac (บนและใต้ใบ)	92.11	84.62	84.23	76.93
11. Xac + C ₄ (บนใบ)	0	0	0	0
12. Xac 1 วัน + C ₄ (บนใบ)	0	0	0	0
13. Xac 2 วัน + C ₄ (บนใบ)	0	0	0	0
14. Xac + C ₄ (บนและใต้ใบ)	0	0	0	0
15. Xac 1 วัน + C ₄ (บนและใต้ใบ)	0	0	0	0
16. Xac 2 วัน + C ₄ (บนและใต้ใบ)	0	0	0	0

^{1/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค

$$= 100 - \left(\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอที่หยด Ab-B C}_4 \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนใบส้มโอที่หยดน้ำนึ่งมาเชื้อ}} \right)$$



ภาพที่ 4 ระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอที่มีการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บน
 แผลด้านบนใบก่อนการหยดเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์
 Xci133-1 และ Xci112-1 เป็นเวลา 0 1 2 4 และ 6 วัน



ภาพที่ 5 ระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอที่มีการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บน
 แผลด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนการหยดเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
 สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 เป็น เวลา 0 1 2 4 และ 6 วัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

4.1 การทำเครื่องหมายให้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อสาเหตุโรค

แบคทีเรียปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁, C₃ และ C₄ ซึ่งแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและสารเคมีได้ ดังนี้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ ต้านทานต่อ tetracycline และ copper hydroxide (mC₁) ที่ความเข้มข้น 50 ppm และ 150 ppm ตามลำดับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ ไม่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและสารเคมี ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ต้านทานต่อ tetracycline และ copper oxychloride (mC₄) ที่ความเข้มข้น 50 ppm และ 80 ppm ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 ต้านทานต่อ streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 ppm

หลังจากการทำเครื่องหมายให้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแล้ว นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่สามารถติดเครื่องหมายได้ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₁ และ mC₄ มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี paper-disc diffusion บนอาหาร NGA ที่ผสมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 โดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส 3 วัน หลังจากวางแผ่นกระดาษกลมที่หยดเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₁ และ mC₄ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.86 และ 1.1 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอหลังจากการทำเครื่องหมาย พบว่ายังสามารถทำให้ใบส้มโอเกิดโรคได้ โดยเกิดจุดเนื้องานฟูสีขาวที่จุดปลูกเชื้อสาเหตุโรค

4.2 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์และเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในสภาพโรงเรือน

4.2.1 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 1 ครั้ง

ผลการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ บนใบส้มโอที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 30 วัน โดยปริมาณเชื้อในวันที่ 1 3 7 10 15 และ 30 วัน เท่ากับ 1.7×10^7 1.7×10^7 1.9×10^6 7×10^6 3.9×10^6 และ 7.3×10^4 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของปริมาณเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 15 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังการฉีดพ่น 15 วัน ส่วนการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ พบว่า ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในวันที่ 1 3 7 10 15 และ 30 เท่ากับ 8.8×10^3 3.9×10^5 4×10^6 2.6×10^7 1.6×10^7 และ 2×10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรคตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 10 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากวันที่ 10 ถึงวันที่ 30 การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรค ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคในใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ พบว่าปริมาณเชื้อในวันที่ 1 3 7 10 15 และ 30 เท่ากับ 2.4×10^7 2×10^7 1.1×10^7 7.1×10^7 8.2×10^7 และ 9.3×10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ โดยการลดลงของเชื้อสาเหตุโรคในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หลังจากวันที่ 7 จนถึงวันที่ 10 การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรคมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากวันที่ 10 จนถึงวันที่ 30 การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรค ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (กรรมวิธีควบคุม) พบว่า ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะมีปริมาณน้อยกว่าบนใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังจากวันที่ 7 ถึงวันที่ 30 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (ตารางที่ 7) (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 7 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน

กรรมวิธี	แบคทีเรีย	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม)					
		1	3	7	10	15	30
Ab+Xac	C ₄ ^{1/}	1.7×10 ⁷ a ^{4/}	1.7×10 ⁷ a	1.9×10 ⁶ a	7×10 ⁶ a	3.9×10 ⁶ a	7.3×10 ⁴ b
	Xac ^{2/}	8.8×10 ³ d ^{(b)5/}	3.9×10 ⁵ c ^(b)	4×10 ⁶ b ^(a)	2.6×10 ⁷ a ^(a)	1.6×10 ⁷ a ^(a)	2×10 ⁷ a ^(a)
Xac							
(กรรมวิธีควบคุม)	Xac ^{3/}	2.4×10 ⁷ b ^(a)	2×10 ⁷ b ^(a)	1.1×10 ⁷ b ^(a)	7.1×10 ⁷ a ^(a)	8.2×10 ⁷ a ^(a)	9.3×10 ⁷ a ^(a)

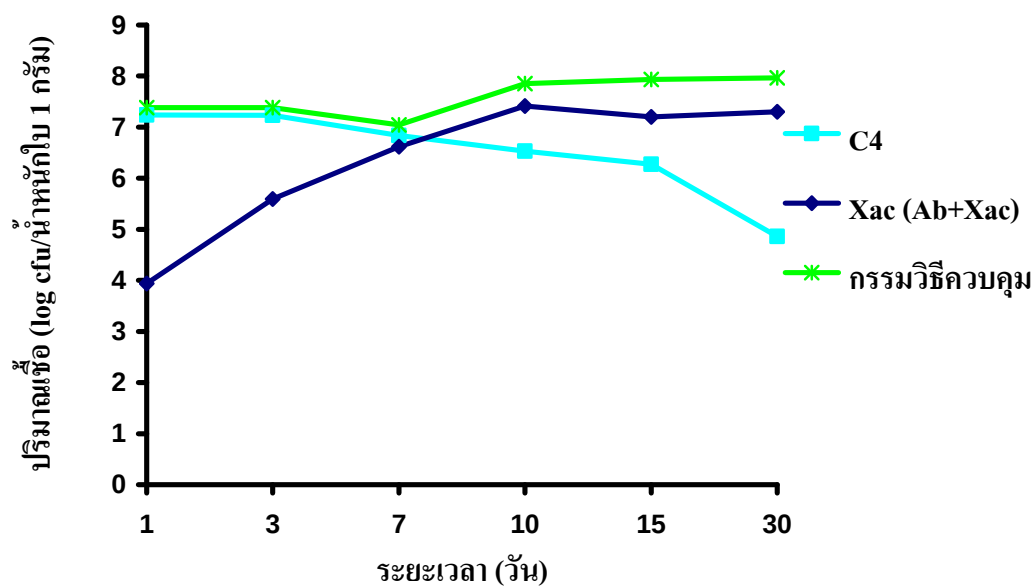
1/ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄

2/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบเดียวกันที่มีการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์

3/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์

4/ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (P<0.05)

5/ อักษรในวงเล็บที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ วิเคราะห์โดยวิธี t test (P<0.05)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ (C₄) และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r (Xac (Ab+Xac)) บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (กรรมวิธีควบคุม) ในสภาพโรงเรือนที่ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 1 ครั้ง

4.2.2 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 1 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ บนใบที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 4 ครั้ง ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 30 วัน โดยปริมาณเชื้อในวันที่ 1 5 10 15 และ 30 เท่ากับ 8.5×10^6 7.2×10^6 6.3×10^6 6.3×10^6 2.6×10^5 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของปริมาณเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 15 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังการฉีดพ่น 15 วัน ส่วนการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรบบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ พบว่า ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในวันที่ 1 5 10 15 และ 30 วัน เท่ากับ 1.3×10^6 3.9×10^6 2.2×10^7 1.5×10^7 1.6×10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัมตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรคตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 การเพิ่มขึ้นของเชื้อสาเหตุโรค ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 7)

กรรมวิธีที่ 2 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรบบนใบที่ฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride พบว่าปริมาณเชื้อในวันที่ 1 5 10 15 และ 30 วัน เท่ากับ 2.5×10^5 1.5×10^6 1.5×10^7 2×10^7 2.7×10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 10 เชื้อสาเหตุโรคมีปริมาณเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังจากวันที่ 10 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 7)

กรรมวิธีควบคุม ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในวันที่ 1 5 10 15 และ 30 วัน เท่ากับ 1.38×10^5 2.90×10^6 2.85×10^8 7.70×10^8 3.25×10^9 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ โดยเชื้อสาเหตุโรคมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มปริมาณขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อสาเหตุโรบบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ บนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะหรือสารเคมีใดๆ โดยนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ในวันที่ 1 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรบบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ บนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะหรือสารเคมีใดๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในวันที่ 5

ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และไม่มีการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์หรือสารเคมีใดๆ มีปริมาณไม่แตกต่างทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีปริมาณมากกว่าบนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride ส่วนในวันที่ 10 15 และวันที่ 30 ปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีปริมาณมากที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และบนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride ส่วนปริมาณเชื้อสาเหตุโรคบนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และบนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride มีปริมาณเชื้อสาเหตุโรคไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ครั้งบนใบที่ฉีดพ่น copper oxychloride และบนใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ระยะเวลา 1 3 7 10 15 และ 30 วัน

กรรมวิธี	แบคทีเรีย	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม)				
		1	5	10	15	30
Ab+Xac	C ₄ ^{1/}	8.5×10 ⁶ a ^{5/}	7.2×10 ⁶ a	6.3×10 ⁶ a	6.3×10 ⁶ a	2.6×10 ⁵ b
	Xac ^{2/}	1.3×10 ⁵ c ^{(a) 6/}	3.9×10 ⁶ b ^(a)	2.2×10 ⁷ a ^(b)	1.5×10 ⁷ a ^(b)	1.6×10 ⁶ a ^(b)
CuCl ₂ +Xac	Xac ^{3/}	2.5×10 ⁵ c ^(a)	1.5×10 ⁶ b ^(b)	1.5×10 ⁷ a ^(b)	2×10 ⁷ a ^(b)	2.7×10 ⁷ a ^(b)
Xac (Control)	Xac ^{4/}	1.4×10 ⁵ e ^(a)	2.9×10 ⁶ d ^(a)	2.9×10 ⁸ c ^(a)	7.7×10 ⁸ b ^(a)	3.3×10 ⁹ a ^(a)

1/ C₄ คือ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄

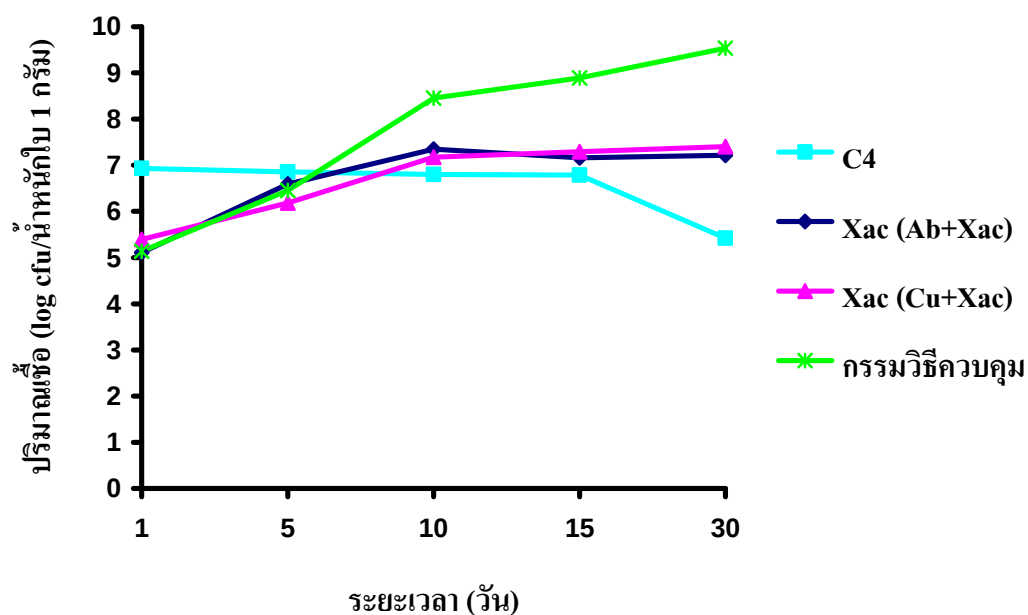
2/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบเดียวกันที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบที่ฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride

4/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r บนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5/ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (P<0.05)

6/ อักษรในวงเล็บที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (P<0.05)



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ (C₄) และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 strep^r (Xac (Ab+Xac)) บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ และบนใบที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride (Xac (Cu+Xac)) และบนใบที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (กรรมวิธีควบคุม) ในสภาพโรงเรือน หลังการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ 1 3 7 10 15 และ 30 วัน

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

ทดสอบบนต้นส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยใช้เข็มฉีดยาจุ่มใบให้เป็นแผล แล้วฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ รอนจนแห้งจึงฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค ผลการศึกษาพบว่า ต้นที่ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 75.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นที่ทำแผลบนใบแล้วฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว โดยใบฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค เกิดจุดแผลสีน้ำตาลมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ เป็นลักษณะอาการโรคแคงเกอร์ของส้มโอ กระจายทั่วไป จำนวนเฉลี่ย 35.25 แผลต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีควบคุมที่พบจุดแผลโรคแคงเกอร์ กระจายทั่วไป จำนวนเฉลี่ย 146.5 แผลต่อต้น ส่วนจุดที่มีการทำแผล เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยจุดที่ทำแผลทั้ง 14 จุดต่อต้น ใบที่ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ก่อนการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค เกิดจุดแผลสีน้ำตาลมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ เช่นเดียวกับใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 8)

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะกับสารเคมีในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน

ทดสอบบนต้นส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะกับสารเคมีในการควบคุมโรคโดยใช้เข็มฉีดยาจุ่มใบให้เป็นแผล แล้วฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ หรือฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride รอนจนแห้งจึงฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค และในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจะทำการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะอีก 3 ครั้ง ทุกๆ 5 วัน ผลการศึกษา พบว่า ต้นที่ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 84.82 เปอร์เซ็นต์ โดยเกิดจุดแผลสีน้ำตาลมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ เป็นลักษณะอาการโรคแคงเกอร์ของส้มโอ กระจายทั่วไป จำนวนเฉลี่ย 9.27 แผลต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับต้นที่ทำแผลที่ใบแล้วฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) ซึ่งเกิดจุดแผลกระจายทั่วไป จำนวนเฉลี่ย 61.09 แผลต่อต้น และต้นที่ทำแผลที่ใบแล้วฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride ก่อนฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจุดที่ทำแผลทั้ง 14 จุด ทุกกรรมวิธีไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรค โดยเกิดจุดแผลสีน้ำตาลมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ ทั้ง 14 จุด (ตารางที่ 10) (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน เมื่อนิพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ครั้ง ก่อนการนิพ่นเชื้อสาเหตุโรค

กรรมวิธี	ณ จุดทำแผล		บริเวณทั่วไป	
	จำนวนจุดแผลต่อต้น	% การยับยั้งการเกิดโรค ^{1/}	จำนวนจุดแผลต่อต้น	% การยับยั้งการเกิดโรค
Ab ^{2/} + Xac	14	0	35.25	75.93
กรรมวิธีควบคุม (Xac)	14	0	146.5	0
F-Test	ns ^{3/}		* ^{4/}	
C.V. =	0 %		12.19 %	

1/ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค

$$= 100 - \left(\frac{\text{จำนวนแผลโรคแคงเกอร์ในแต่ละกรรมวิธี} \times 100}{\text{จำนวนแผลโรคแคงเกอร์ในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

2/ Ab คือ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄

3/ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4/ * คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติของค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง วิเคราะห์โดยวิธี t test (P<0.05)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ และ copper oxychloride ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน เมื่อนิฉนพนแบคทีเรียปฏิบัฏ์ 4 คร้งทุก 5 วัน และสารเคมี copper oxychloride 1 คร้ง ก่อนการนิฉนพนเชื้อสาเหตุโรค

กรรมวิธี	ณ จุดทำแผล		บริเวณทั่วใบ	
	จำนวนจุดแผลต่อน้	% การยับยั้งการเกิดโรค ^{1/}	จำนวนจุดแผลต่อน้	% การยับยั้งการเกิดโรค
Ab ^{2/} + Xac	14	0	9.27 ^{b3/}	84.82
CuCl ₂ + Xac	14	0	0 ^c	100
กรรมวิธีควบคุม (Xac)	14	0	61.09 ^a	0
F-Test	ns ^{4/}		* ^{5/}	
C.V. =	0 %		9.18 %	

1/ เปอร์เซนต์การยับยั้งการเกิดโรค

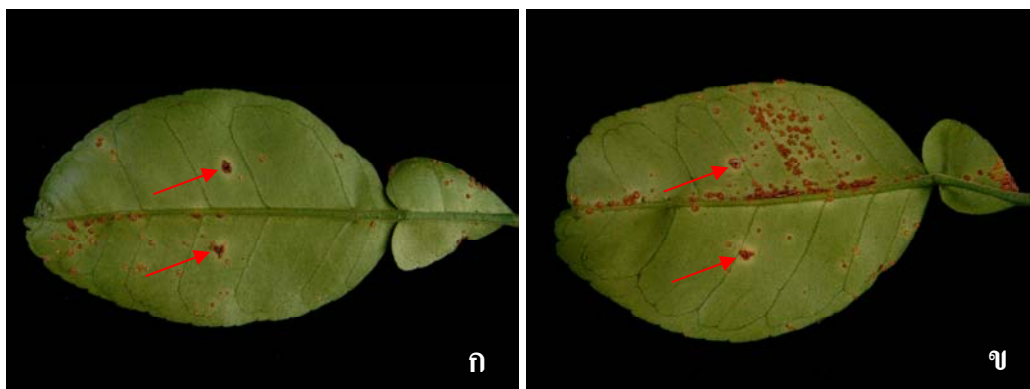
$$= 100 - \left(\frac{\text{จำนวนแผลโรคแคงเกอร์ในแต่ละกรรมวิธี} \times 100}{\text{จำนวนแผลโรคแคงเกอร์ใน กรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

2/ Ab คือ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄

3/ อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (P<0.05)

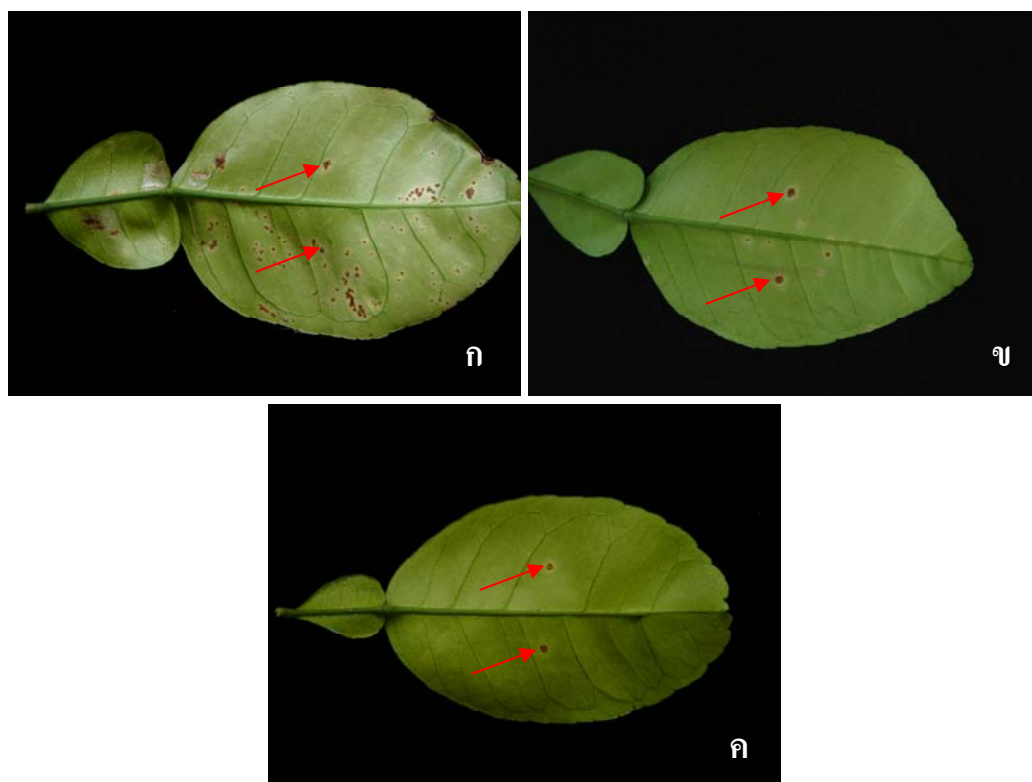
4/ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5/ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 8 การเกิดโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอ เมื่อมีการฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 30 วัน

- ก. ลักษณะอาการโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอที่ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ก่อนการฉีดพ่นแบคทีเรียเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 โดยพบการเกิดโรค ณ จุดปลูกเชื้อ (ศรชี้) และบริเวณทั่วไปเป็นจำนวนน้อย
- ข. ลักษณะอาการโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอที่ฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 อย่างเดียว โดยพบการเกิดโรค ณ จุดปลูกเชื้อ (ศรชี้) และบริเวณทั่วไปเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 9 การเกิดโรคแคงเกอร์ด้านใต้ใบส้มโอ เมื่อมีการฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ และเมื่อมีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 30 วัน

- ก. ลักษณะอาการใบส้มโอเป็นโรคแคงเกอร์ที่ฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 อย่างเดียว โดยพบการเกิดโรค ณ จุดปลูกเชื้อ (ศรชี้) และบริเวณทั่วใบเป็นจำนวนมาก
- ข. ลักษณะอาการใบส้มโอเป็นโรคแคงเกอร์ที่ฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 และเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ 4 ครั้ง โดยพบการเกิดโรค ณ จุดปลูกเชื้อ (ศรชี้) และบริเวณทั่วใบเป็นจำนวนน้อย
- ค. ลักษณะอาการแผ่นใบส้มโอเป็นโรคแคงเกอร์ที่ฉีดพ่นสาร copper oxychloride ก่อนการฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 โดยพบการเกิดโรค ณ จุดปลูกเชื้อ (ศรชี้) ไม่เกิดโรคบริเวณทั่วใบ

5. การทดสอบประสิทธิภาพ culture filtrate ของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ

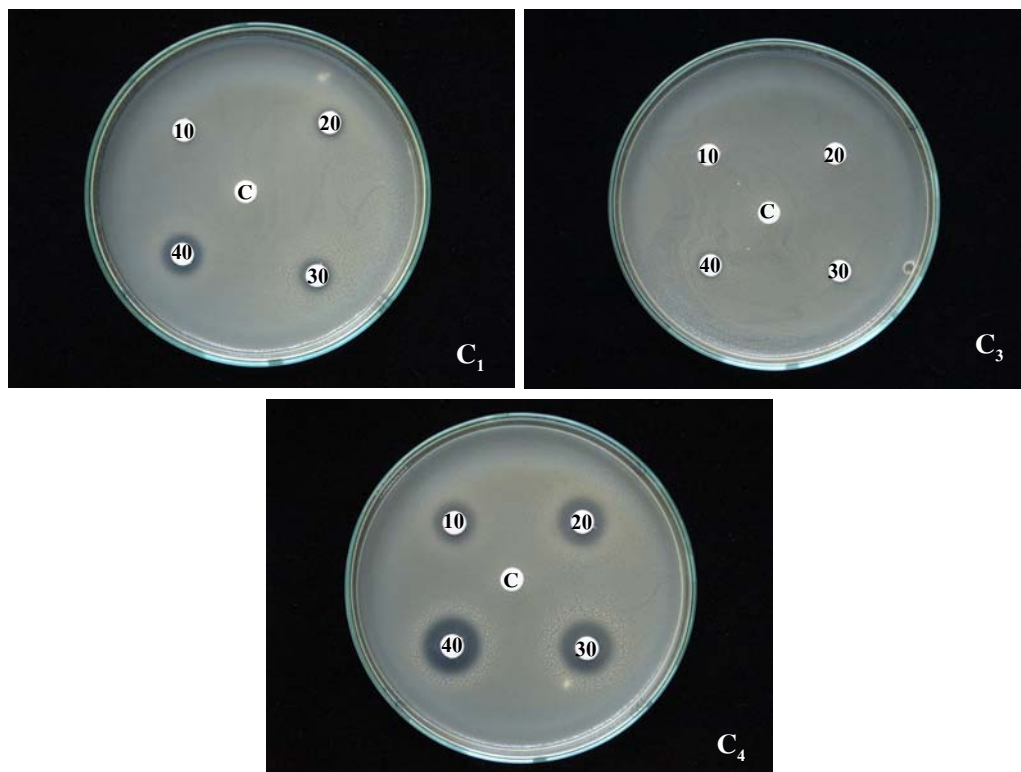
เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะออกจากอาหาร NGB ที่เลี้ยงเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใส (culture filtrate) ซึ่งมีสารที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี paper-disc diffusion บนอาหาร NGA ที่ผสมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 พบว่า เกิดบริเวณใสรอบแผ่นกระดาษกลมที่ได้หยดส่วนใสของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร รองลงไป ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ มีค่าความกว้างบริเวณใสเท่ากับ 1.1 และ 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณของสารให้สูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นด้วย (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 11 ความกว้างบริเวณใสที่เกิดจาก culture filtrate จากแบคทีเรียปฏิชีวนะปริมาณ 10 20 30 40 ไมโครลิตร ต่อแผ่นกระดาษกลม ซึ่งเกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 สาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอบนอาหาร NGA เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียปฏิชีวนะ (<i>Bacillus</i> sp.)	ความกว้างบริเวณใส (เซนติเมตร) ^{1/}			
	10 μ l	20 μ l	30 μ l	40 μ l
C ₁	0.6	0.8	1	1.1
C ₃	0	0	0.1	0.2
C ₄	1.1	1.4	1.5	1.6
กรรมวิธีควบคุม	0	0	0	0

1/ ความกว้างบริเวณใส

$$= \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางแผ่นกระดาษกลมรวมบริเวณใส} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางแผ่นกระดาษกลม}}{2}$$



ภาพที่ 10 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 บนอาหาร NGA โดย culture filtrate จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C_1 C_3 และ C_4 ที่ปริมาตร 0 (C กรรมวิธีควบคุม) 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตรต่อแผ่นกระดาษกลม

6. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการทดสอบสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก และสร้างเอนโดสปอร์ ไม่สามารถเจริญในสภาพไม่มีอากาศ และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่เกิดออกซิเดส สร้างเอนไซม์ แคตาเลส สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สามารถรีดิวส์ไนเตรท ย่อยเจลาติน สามารถย่อยแป้ง สร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแมนนิทอล เจริญเติบโตที่ pH 5.7 เมื่อเทียบเคียงคุณสมบัติต่าง ๆ กับแบคทีเรียในสกุล *B. subtilis* ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่มที่ 8 ควบคุมมาตรฐานของวิธีการทดสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ร่วมทดสอบ คือ *B. subtilis* สายพันธุ์ ATCC6633 *B. subtilis* สายพันธุ์ E7-1 7 และ *P. putida* สายพันธุ์ Sg 1 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ C₄ มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. subtilis* (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄

คุณสมบัติ	Bergey's Manual <i>B.</i> <i>subtilis</i>	แบคทีเรีย ปฏิปักษ์ สายพันธุ์ C ₄	<i>B.</i> <i>subtilis</i> ATCC 6633	<i>B.</i> <i>subtilis</i> E7-1 7	<i>P.</i> <i>putida</i> Sg 1
การติดสีแกรม	+	+	+	+	-
สร้างเอนโดสปอร์	+	+	+	+	-
ตำแหน่งเอนโดสปอร์	C ^{1/}	C	N	C	-
การบวมของเซลล์แม่	-	-	N	-	-
รูปร่างของเซลล์	E ^{2/}	E	N	E	N
การเจริญในสภาพที่มีอากาศ	+	+	N	+	N
การสร้างเอนไซม์แคตาเลส	+	+	N	N	N
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-	N	N	N
การรีดิวส์ไนเตรท	+	+	+	+	-
การใช้เจลาติน	+	+	+	+	-
การย่อยแป้ง	+	+	+	+	N
เจริญเติบโตที่ pH 5.7	+	+	+	+	N
สร้างกรดจากการใช้น้ำตาลแมนนิทอล	+	+	N	N	N

+ หมายถึงเกิดปฏิกิริยา 90-100 เปอร์เซ็นต์

- หมายถึงไม่เกิดปฏิกิริยา 90-100 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตำแหน่ง endospore ตรงกลาง

^{2/} รูปร่าง endospore รูปไข่

N ไม่ได้ทำการทดสอบ

วิจารณ์

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มจำนวน 2 ชนิด คือ ส้มโอ และ มะนาว บนอาหาร NGA พบแบคทีเรียโคโลนิที่มีลักษณะกลม สีเหลืองขุ่น ขอบเรียบ ม้วนวาว ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* เมื่อทำการทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุโรคในการทำให้เกิดโรคนบนใบส้มโอ พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้เป็นเชื้อสาเหตุโรค โดยสามารถทำให้ใบส้มโอเป็นโรคแคงเกอร์ จากข้อมูลสมบัติทางชีวเคมี ความสามารถในการทำให้เกิดโรคที่แตกต่างกันบนพืชอาศัยและพื้นที่ที่พบการแพร่ระบาด (Gottwald and Graham, 2000) แสดงว่า เชื้อที่แยกจากใบส้มโอ และใบมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 อยู่ในกลุ่ม A strain โดยมีแหล่งกำเนิดอยู่ในเอเชีย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงพบการแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง

เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ *P. fluorescence* สายพันธุ์ C₂ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช เมื่อนำมาทดสอบสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยวิธี paper-disc diffusion พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีความสามารถดีที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ C₁ และ C₃ ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบ culture filtrate จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี paper-disc diffusion พบว่า เกิดบริเวณใส แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค เป็นลักษณะการทำลายชีวิต (antibiosis) (นิพนธ์, 2546) โดยความสามารถของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ และ C₁ มีความสามารถในการยับยั้งใกล้เคียงกัน แต่เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ มีความสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้น้อยกว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ เห็นได้จากการลดลงของบริเวณใสในวันที่ 5 และ 6 เนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคที่แตกต่างกัน (Giancarlo and Rolando, 1993) หรือเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ สร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคได้น้อยกว่า เห็นได้จากการทดสอบประสิทธิภาพ culture filtrate จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ พบว่า เมื่อหยด culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₄ ในปริมาณที่เท่ากัน culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ มีความกว้างบริเวณใส น้อยกว่า culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ทุกปริมาตรที่ทดสอบ และเมื่อเพิ่ม

ปริมาตรของ culture filtrate จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้สูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้ culture filtrate จากเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายได้นั้น เชื้ออาจสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น polymyxin difcidin subtilin myobacilin หรือปล่อยโปรตีนที่มีฤทธิ์ไปต่อต้านหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (antimicrobial) เช่น bacteriosin chitinase glucanase (ชาพูเราะห์, 2546) ดังนั้น ควรศึกษาเชื้อ *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ว่ามีการผลิตเป็นสารชนิดใดออกมาบ้างใน culture filtrate ของแต่ละเชื้อที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค

การทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอด้วยวิธี detached leaf พบว่า การหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนหรือหลังการหยดเชื้อสาเหตุโรคมีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรค โดยการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคจะสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ ส่วนการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังการหยดเชื้อสาเหตุโรคจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ การใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ หยดลงบนใบที่ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้ม พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคดีที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ C₁ และ C₃ ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบส้มโอในการทดสอบด้วยวิธี detached leaf นี้ สอดคล้องกับการทดสอบแบบ paper-disc diffusion บนอาหาร NGA จากการเปรียบเทียบการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์หยดลงบนใบที่ทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มด้านบนใบด้านเดียว และหยดด้านบนใบและใต้ใบ พบว่า การหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทางด้านบนใบและด้านใต้ใบก่อนหยดเชื้อสาเหตุโรค จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้านบนใบเพียงอย่างเดียว ส่วนระยะเวลาการหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนหยดเชื้อสาเหตุโรคมีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคเช่นกัน โดยพบว่า ระยะเวลาที่หยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนหยดเชื้อสาเหตุโรคที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 6 วัน เมื่อศึกษาระดับความรุนแรงของโรค พบว่า การหยดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการหยดเชื้อสาเหตุโรคไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพลดความรุนแรงของโรคทางด้านบนใบและใต้ใบได้ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปัจจัยสำคัญในการยับยั้งการเกิดโรคโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์แล้ว ยังขึ้นกับบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สัมผัส และระยะเวลาที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สัมผัสกับพืชก่อนการสัมผัสกับเชื้อสาเหตุโรค ทั้งนี้ การปรับตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมบนผิวใบพืช และการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ซึ่ง Blakeman (1991) และ Beattie and Lindow (1999) กล่าวว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อตกสู่ผิวใบบางส่วนไม่

สามารถปรับตัวได้ เพราะอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมรอบเซลล์ที่เปลี่ยน เช่น แหล่งอาหาร อุณหภูมิ ความชื้น แหล่งอาศัย ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงในระยะแรก เมื่อเวลาผ่านไป เชื้อมีการปรับตัวมีชีวิต รอด จึงสามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้น ดังนั้นถ้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถครอบครองผิวพืชได้ ก่อนเชื้อสาเหตุโรคไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง จะช่วยให้การยับยั้งการเกิดโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปใช้ในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ส้มโอ ควรฉีดพ่นอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนเชื้อสาเหตุโรคสัมผัสกับส้มโอ หรือก่อนการเป็นโรค และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจะสูงขึ้นหากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้สัมผัสกับใบส้มโอก่อนเชื้อสาเหตุโรค 6 วัน และการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ทั่วถึงทั้งด้านบนใบและใต้ใบจะทำให้การเกิดโรคลดลงมากกว่า การฉีดพ่นด้านบนใบด้านเดียว

ในการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคจึงทำการติดเครื่องหมายให้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค โดยการติดเครื่องหมายด้วยสาปฏิจีวนะ และสารเคมีที่ความเข้มข้นต่างกัน เพื่อการติดตามเชื้อทั้ง 2 บนใบเดียวกัน โดยผลการติดเครื่องหมายให้กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁, C₃ และ C₄ พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ ด้านทานต่อ tetracycline และ copper hydroxide (mC₁) สายพันธุ์ C₃ ไม่สามารถด้านทานสารปฏิชีวนะและสารเคมีได้ สายพันธุ์ C₄ ด้านทานต่อ tetracycline และ copper oxychloride (mC₄) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ด้านทานสารปฏิชีวนะและสารเคมีมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ยังสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ แสดงว่าการด้านทานสารปฏิชีวนะและสารเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีผลต่อการสร้างสารพิษ

จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ บนใบส้มโอในสภาพโรงเรือน โดยการแยกเชื้อจากบริเวณผิวใบ ซึ่งมีการตรวจหาเชื้อทั้งใบในส่วนปลายใบ โคนใบ ขอบใบ และกลางใบ ซึ่งรวมบริเวณที่ทำแผล พบว่า บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 1 ครั้ง และ 4 ครั้ง เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า 30 วัน โดยในวันที่ 30 สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ มีปริมาณ เท่ากับ 7.3×10^4 และ 2.6×10^5 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ตามลำดับ การมีชีวิตอยู่บนใบพืชได้นาน อาจเป็นเพราะบริเวณผิวใบส้มโอมีการปลดปล่อย exudates ออกมา ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ จึงมีการปรับตัวให้คงความมีชีวิตรอดที่ผิวใบได้ นอกจากนี้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์จึงมีชีวิตอยู่ได้นาน แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อที่อาศัยอยู่บนใบพืชจะลดความรวดเร็วในการเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่ผันแปร

ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นในอากาศ ปริมาณแสงแดด (Brien and Lindow, 1989) ส่วนการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ส้มโอ บนใบที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์เพียงครั้งเดียว บนใบที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์เพียง 4 ครั้ง และใบที่ฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride พบว่า เชื้อสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า 30 วัน เนื่องจากในวันที่ 30 สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคได้ทั้ง 3 กรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์และสารเคมี copper oxychloride (กรรมวิธีควบคุม) พบเชื้อสาเหตุโรคปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ กรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์เพียงครั้งเดียว ใบที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์เพียง 4 ครั้ง และกรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride ตามลำดับ และในทุกกรรมวิธีปริมาณเชื้อสาเหตุโรคจะเพิ่มมากขึ้นจากวันที่ทำการปลูกเชื้อ เนื่องจากส้มโอเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้จนกว่าส่วนของพืชที่เชื้ออาศัยจะตาย และถูกย่อยสลายไปซึ่ง Pruvost et al. (2002) ได้ศึกษา พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สามารถมีชีวิตอยู่บนใบ Mexican lime บริเวณแผลที่ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นได้ 18 เดือน โดยเดือน 1 ถึง 6 จะพบเชื้อสาเหตุโรคประมาณ 10^7 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ในเดือนที่ 8 ถึง 10 ปริมาณเชื้อจะลดลง 10 เท่า และในเดือนที่ 18 ปริมาณเชื้อจะลดลง 15 เท่า ส่วนบริเวณผิวใบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ดังนั้น การนำ เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ไปใช้ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในสภาพแปลงปลูก ควรฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มากกว่า 1 ครั้ง เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ให้มากขึ้น ทำให้การครอบครองพื้นที่และการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคได้ดีขึ้น เนื่องจากการทดลองการฉีดพ่น 1 ครั้ง ปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 30 แต่การฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ จำนวน 4 ครั้ง ปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีปริมาณเพิ่ม ตั้งแต่ วันที่ 1 จนถึงวันที่ 5 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อสาเหตุโรคจะคงที่จนถึงวันที่ 30

จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยทำให้การเกิดโรคลดลง ทั้งนี้พบว่า ปัจจัยที่สำคัญในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบได้แก่ จำนวนครั้งที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์ ซึ่งพบว่า การฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์จำนวน 4 ครั้ง โดยฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์ 1 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค หลังจากนั้นฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์อีก 3 ครั้ง ทุกๆ 5 วัน สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์ครั้งเดียว ก่อนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคบริเวณทั่วผิวใบจากการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักย์จำนวน 4 ครั้ง และการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอย

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 1 ครั้ง เท่ากับ 84.82 และ 75.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride 1 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคที่บริเวณใบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่บริเวณทำแผลโดยใช้เข็มจิ้มนั้น การฉีดพ่นสารเคมี copper oxychloride และการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ จำนวน 1 ครั้ง และ 4 ครั้ง ไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ เนื่องจากในการทดสอบในสภาพโรงเรือนใช้วิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยการใช้เข็มจิ้มให้เป็นแผลแล้วฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคทำให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าสู่พืชและทำให้เกิดโรคอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเรื่องระยะเวลาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ สุจินต์ (2545) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ CPL₁₁ ที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ โดยการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนจากนั้น 72 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค และหลังจากนั้น 72 ชั่วโมงจึงฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อีกครั้ง สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยมีการเกิดโรค 21.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีควบคุม เกิดโรค 51.37 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยเรื่องของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเฉพาะเรื่องของความชื้น เห็นได้จากการทดสอบโดยวิธี detached leaf ซึ่งใส่ใบส้มโอไว้ในถุงขึ้น ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ พบการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบในโรงเรือนมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศช่วงที่ทำการทดลองระหว่าง 63 – 80.5 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 74.15 เปอร์เซ็นต์ (ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับ 91 และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์) พบการเกิดโรคน้อยกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ควรศึกษาผลของสภาพแวดล้อมต่อเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอ ดังนั้น ควรทำการศึกษาและพัฒนาการนำไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและตัวเกษตรกร และพัฒนาไปสู่การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปใช้ในการควบคุมโรคสภาพแปลงปลูก ควรมีการศึกษานิตและโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใน culture filtrate ที่ผลิตได้จากเชื้อปฏิปักษ์ ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ศึกษาการผลิตเพื่อนำไปใช้ในชุมชนโดยการใช้อาหารที่เหมาะสมและมีราคาไม่แพง เช่น กากน้ำตาล น้ำเวย์ที่ได้จากการทำน้ำเต้าหู้ (วิจิตราและคณะ, 2542) หรือนมพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งเป็นสิ่งที่เกษตรกรสามารถหาได้เอง รวมไปถึงการกำหนดอัตราการใช้ที่เหมาะสม และการพัฒนาผลิตรูปแบบของชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์

สรุป

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ *P. fluorescence* สายพันธุ์ C₂ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ซึ่งเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคดีที่สุด ซึ่งมีความกว้างบริเวณใสกว้างที่สุดในวันที่ 5 และ 6 มีค่าเท่ากับ 0.97 เซนติเมตร

ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบส้มโอของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ เมื่อทำแผลแล้วหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ด้านบนใบและใต้ใบ ช่วยลดความรุนแรงของโรค และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีกว่าการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ด้านบนใบอย่างเดียวและการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นระยะเวลา 6 วัน ก่อนการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ สาเหตุเกิดจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ Xci133-1 และ Xci112-1 ด้านบนใบ เท่ากับ 92.11 และ 84.23 ตามลำดับ และด้านใต้ใบ เท่ากับ 84.62 และ 76.93 ตามลำดับ ส่วนการทำแผลแล้วหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคก่อนการหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ C₃ และ C₄ มาติดเครื่องหมาย พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₃ ไม่สามารถทำการติดเครื่องหมายได้ ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ สามารถต้านทานต่อ tetracycline และ copper hydroxide (mC₁) และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ สามารถต้านทานต่อ tetracycline และ copper oxychloride (mC₄) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ยังคงศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ส้มโอในสภาพโรงเรือน พบว่า การฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ ก่อนการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค หลังจากนั้นฉีดพ่นอีก 3 ครั้ง ทุกๆ 5 วัน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้ดี ทำให้เกิดโรคลดลง 84.82 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นที่ฉีดพ่นเซลล์

แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีการเกิดโรคเฉลี่ย 9.27 จุดต่อต้น ส่วนต้นที่ไม่ได้ฉีดพ่น เซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ มีการเกิดโรคเฉลี่ย 61.09 จุดต่อต้น

การอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ เมื่อฉีดพ่น 1 ครั้ง ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถอยู่รอดได้หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 30 วัน มีปริมาณเชื้อ 7.2×10^4 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม เมื่อฉีดพ่น 4 ครั้ง ทุกๆ 5 วัน พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ mC₄ สามารถอยู่รอดได้หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 30 วัน มีปริมาณเชื้อ 2.6×10^5 หน่วยโคโลนีต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม

การทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate จากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่า culture filtrate จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₁ และ C₃ ตามลำดับ โดยปริมาณของ culture filtrate ที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เพิ่มขึ้น

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา สันฐานวิทยาและชีวเคมี เทียบเคียงกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆคือ *B. subtilis* สายพันธุ์ ATCC 6633 *B. subtilis* สายพันธุ์ E7-17 *P. putida* สายพันธุ์ Sg 1 และจัดจำแนกตามหลักของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่มที่ 8 พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C₄ คือ *B. subtilis*

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณินันต์ย์ เจริญวรกร. 2527. โรคของส้มโอและการผลิตพันธุ์ส้มโอให้ปราศจากโรค.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑามาศ อ่อนวิมล. 2547. สวนส้ม. สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชาพุระเหห์ สาเมาะ. 2546. การเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus subtilis* ต่อเชื้อ *Ralstonia*

solanacearum สาเหตุของโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศ. แหล่งที่มา: http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4902-1-48G12/SEMREP/Sm_404652038.doc, 10 เมษายน 2550.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. ทางเลือกใหม่ของเกษตรกร, น. 226-236

ใน เรื่องนำรู้สำหรับประชาชนเล่มที่ 21. ชมรมนักเรียนทุนมูลนิธิอานันทมหิดล, กรุงเทพฯ.

_____. 2546. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี, น. 55-88. ใน จิระเดช แจ่ม

สว่าง. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ทวีศักดิ์ ด่วงทอง. 2549. ส้มโอไม้ผลเศรษฐกิจ. แหล่งที่มา: <http://web.ku.ac.thagri/somo2/sol.htm>, 25 ธันวาคม 2549.

เปรมปรี ฌ สงขลา. 2544. คู่มือการลงทุนทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ. บริษัทฐานการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

พ่ายพ์ ย้งปักย์. 2544. ข้อมูลจำเพาะ. เมืองไม้ผล 157 (8): 81-82 น.

ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์. 2545. ผลไม้ไทยๆ. สหมิตรพรินติ้ง, กรุงเทพฯ.

_____. 2546. หลายเรื่อง-หลายรสไม่ผลไทย. *เคหการเกษตร* 25 (8): 382-384 น.

ภาควิชาโรคพืช. 2544. **บทปฏิบัติการ โรคพืชวิทยาเบื้องต้น (015281)**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม

วิจิตรา ลีละสุกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ลัดดา นิลรัตน์ และวัชรินทร์ รุกขไชยศิริ. 2542. **การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว**. ภาควิชาเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศศิธร วุฒินิชย์. 2545. **โรคผักและการควบคุมโรค**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมชาย สุนทรสิงห์ และ ทวีศักดิ์ ด่วงทอง. 2531. **ส้มโอ**. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม การเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม.

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 2541. **ส้มโอ**. เอกสารวิชาการที่ 21 เรื่อง ชุมชุมสหกรณ์ การเกษตรแห่งประเทศไทย. น. 1-10.

สุจินต์ แก้วนิล. 2545. **การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2535. **ส้มโอ**. เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร เล่มที่ 49. น. 11-12 .

_____. 2550. **ส้มโอ**. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/export/QVExp.xls>, 15 สิงหาคม 2550.

อรพรรณ วิเศษสังข์ และ จุมพล สาระนาค. 2548. **โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม**. *เคหเกษตร*. 29 (8): 206-208.

Agrios, G.N. 1997. **Plant Pathology**. Academic Press, New York.

- Alva, A.K., J.H. Graham and C.A. Anderson. 1995. Soil pH and copper effects on young 'Hamlin' orange trees. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 59: 481–487.
- Anonymous. 1953. **Manual of Microbiological Methods.** McGraw-Hill Book Co., New York 315 p.
- Anonymous. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. OEPP/EPPO, Bulletin. Paris. pp. 289–294.
- Arwiyonto, T., K. Sakata, M. Goto, S. Tsuyumu and Y. Takikawa. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** 60: 288-294
- Assis, S.M.P., R.L.R. Mariano Michereff, S. J. and R.S.B. Coelho. 1996. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: T. Wenhua et al. (Eds.). **Advances in Biological Control of Plant Diseases.** Beijing. pp. 347-353.
- _____. 1997. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phyloplane in the field. Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present Status and Future Prospects. Japan : **OECD.** pp. 345-348.
- Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. **Biological Control of Plant Pathogens.** W.H. Freeman Co., San Francisco. 433 p.
- Beattie, G.A. and S.E. Lindow. 1999. Bacterial colonization of leaves : A spectrum of strategies. **Phytopathol.** 89 : 353-359.
- Blakeman, J.P. 1991. Foliar plant pathogens: epiphytic growth and interaction on leaves **J. Appl. Bacteriol.** 70 : 495S-59S

- Brien, O. and S.E. Lindow. 1989. Effect of plant species and environmental condition on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathol.** 79: 619-27.
- Chakravarti, B.P., S. Porwal and M. Rangarajan. 1966. Studies on citrus canker in Rajasthan. **Labdev. J. Sci. Tech.** 4: 262-265.
- Das A.K. 2003. Citrus canker – A review. **J. Appl. Hort.** 5: 52-60
- Desai, V.T., S.A. Ranpise, C.V. Pujari and S.B. Rajjadhav. 1999. pp. 38-41. In "**Saisarbati**" **promising acid lime cultivar for western Maharashtra.** Proc. Natl. Symp. Citric. Nagpur, Maharashtra.
- Dhingra, O.D. and J.B. Sinclair. 1994. **Basic plant pathology methods 2nd ed.** CCR Press, Boca Raton. 434 p.
- Dye, D.W., J.F. Bradbury, M. Goto, A.C Hayword, R.A. Lelliot and M.N. Schroth. 1980. International standards for naming pathovers for phytopathogenic bacteria and a list of pathover names and pathotype strains. **Rev. Plant Pathol.** 53: 153-168.
- Fawcett, H.S. and A.E. Jenkins. 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology** 23: 820-824.
- Giancarlo L. and L. Rolando. 1993. **Biotechnology of Antibiotic and other Bioactive Microbial Metabolites.** Plenum Press, New York.
- Goto, M. 1992. Citrus canker, pp.170-280. In J. Kumar, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, eds. **Plant Diseases of International Importance. Volume III. Diseases of Fruit Crops.** Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

- Gottwald, T.R. 2000. **Citrus canker. Available Source.** Available Source:
[http://www.apsnet.org/education/lessons PlantPath/CitrusCanker/pathbio.htm](http://www.apsnet.org/education/lessons%20PlantPath/CitrusCanker/pathbio.htm), January 10, 2007
- _____ and J.H. Graham. 2000. Canker. pp. 5-8. *In* L.W. Timmer, S.M. Garnsey and J.H.Graham, eds. **Compendium of citrus diseases 2nd ed.** APS Press.
- _____, J.H. Graham, G. Hughes, X. Sun and T. Riley. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology** 91: 30-34.
- Graham, J.H., T.R. Gottwald, T.D. Riley and M.A. Bruce. 1992. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. **Phytopathology** 82: 452–457.
- _____, _____, _____, J. Cubero and D.L. Drouillard. 2000. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). Proc.Intn. **Citrus canker Res.Workshop** Pierce, Florida.
- Holt, K., P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.** The Williams and Wikins Co., Baltimore. 787 p.
- Kalita, P., L.C. Bora and K.N. Bhagabati. 1996. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopath.** 49: 234-237.
- Kishun, R. and J.N. Chand. 1987. Studies on germplasm resistance and chemical control of citrus canker. **Indian J. Hort.** 44: 126-132.
- Kuhara, S. 1978. Present epidemic status and control of citrus canker disease *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. in Japan. **Rev. Plant Prot. Res.** 11: 132-142

- Koizumi, M. 1985. Citrus canker: the world situation, pp. 2-7. In L.W. Timmer, ed.
Citrus canker: An International Perspective. University of Florida, Lake Alfred.
- Jacobsen, B.J. and A. Backman. 1993. Biological and cultural plant disease controls :
 Alternative and supplements to chemical in IPM system. **Plant Dis.** 77 : 311-315.
- Leite, R.P. and S.K. Mohan, 1984. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in
 soil and in association with some gramineous plants. **Proc. Intn. Soc. Citric.**
 2: 365-368.
- Liu, F.Q. and J.S. Wang. 1998. A preliminary study on controlling rice bacterial leaf blight
 with a virulent gene deleted strain Du 728. **Chinese Journal of Biological Control**
 14 : 115-118.
- Norman, W.A., N.W. Schaad , E. Postnikovaa, B .B. Lacy, A. Sechlara, I. Agarkovac, E. Paul, A.
 Stromberg, K. Verlyn, B. Stromberg and K. A. Vidaver. 2005. Reclassification of
Xanthomonas campestris pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye1978 forms A, B/C/D, and E as
X. smithii subsp. *citri* (ex Hasse) sp. **Systematic and Applied Microbiology**
 28: 494–518
- Prasad, M.B.N.V., R. Singh, A. Rekha and R. Chand. 1997. Evaluation of lemon cultivars and
 acid lime x lemon hybrids for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Scientia**
Hort. 71: 367-372.
- Pruvost, O., C. Boher, C. Brocherieux, M. Nicole and F. Chiroleu. 2002. Survival of
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* in leaf lesions under subtropical environmental
 conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology** 92: 336–346.
- Ramakrishnan, T.S. 1954. **Common Diseases of Citrus in Madras State.** Govt. of
 Madras publication, Madras.

- Rao, Y.P. and M.K. Hingorani. 1963. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. **Indian Phytopath.** 16: 362-364
- Rinaldi, D.A.M.F. and R.P. Leite. 2000. Adaptation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. **Proc. Int. Soc. Citric.** 2: 1064-1069.
- Rodriguez, G.S., J.G. Garza- Lopez, J.J. Stapleton and E.L. Civerolo. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. **Plant Dis.** 69: 808-810.
- Schaad, N.W. 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Bacteriology.** Committee of American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 245 p.
- _____, E. Postnikova, G. Lacy, A. J. Sechler, I. Agarkova, P. Stromberg, V. Strombuer and A. Vidaver. 2005. Reclassification of *Xanthomonas* species pathogenic on citrus. **Systematic and Applied Microbiology** 28: 494-518.
- Sinclair, J.B. 1968. Eradication of citrus canker from Louisiana. **Plant Dis. Rep.** 52: 667-670
- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci, pp. 1104-1131. In P.H.A. Sneath (ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1**
- Stall, R.E. 1988. Canker, pp. 6-7. In J.O. Whiteside, ed. **Compendium of citrus diseases.** American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- _____, J.W. Miller, G.M. Marco and B.I. Canteros de Echenique. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. **Proc. Fl. State Hort. Soc.** 93: 10-14.

- Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: G. Stacey and N. T. Keen, **Plant-Microbe Interactions** New York: Chapman and Hall. pp. 187-235.
- Timmer, L.W., T.R. Gottwald and S.E. Zitko. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. **Plant Dis.** 75: 192–195.
- _____, S. M. Garnsey and J. H. Graham. 2000. **Compendium of Citrus Diseases.** 2nd ed. Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota.
- Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45: 472-489
- Zubrzycki, H.M., and D.Z.A. Diamante. 1987. Relationship between the amount of inoculum and the infection caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on citrus seedlings through natural infections in the field, pp.379-382. In W.S. Montengro and C.S. Moreira, eds. **Proc. Int. Soc. Citri.** Sao Paulo, Brazil.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิธีเตรียม

สูตรอาหารเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient glucose agar (NGA) (Schaad 1988)

Bacto-peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
glucose	2.5	กรัม
Agar	12.0	กรัม

Nutrient glucose broth (NGB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

Starch agar

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Soluble starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH	6.8-7.0	

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อแบคทีเรียให้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงบนอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้ง โดยหยดน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงว่า เชื้อนั้นสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

สารละลายไอโอดีนสำหรับทดสอบแป้ง

Crystal iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
95 % Ethanol	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย potassium iodide ด้วย ethanol ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย Crystal iodine ในสารละลาย potassium iodide แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปใช้ทดสอบ

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ catalase

การสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อใช้ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ให้เป็นออกซิเจน ทดสอบโดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีของเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่า เชื้อสร้างเอนไซม์ catalase

Hydrolysis of gelatin (gelatin liquefaction)

Beef extract	10.0	กรัม
Bacto - peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Gelatin	12.0	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ gelatinase เพื่อย่อย gelatin เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาพอุณหภูมิห้อง ย้ายหลอดเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสสังเกตการณ์แข็งตัวของเจลาติน ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้อาหารที่ทดสอบจะไม่แข็งตัว

การย้อมสีแบบแกรม

สีที่ใช้ย้อมแกรม และวิธีการย้อมแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol	20.0	กรัม

ละลาย crystal violet ใน ethanol 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเจือจางในสารละลาย ammonium oxalate 1% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

1.1.2 Gram's iodine

Orystal iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย potassium iodide ในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย iodine ในสารละลาย potassium iodide จนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปทดสอบ

1.1.3 Ethanol 95 เปอร์เซนต์

1.1.4 Safranin water Solution

Safranin	2.5	กรัม
95 % Ethanol	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย safranin ใน ethanol 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง บนสไลด์ที่สะอาดทิ้งให้แห้ง ฟิกซ์ smear โดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ย้อมด้วย crystal violet โดยหยดสีให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งล้างด้วยน้ำ หยดแกรมไอโอไดน์ลงให้ท่วมนาน 1 นาที จากนั้นเทไอโอไดน์ทิ้ง แล้วล้างด้วย ethanol 95 % นาน 15 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ซับด้วยกระดาษซับแล้วย้อมด้วยสี safranin-0 นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะรูปร่างการติดสีแกรม และการจัดเรียงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สีย้อมเอนโดสปอร์

Malachite green solution

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำไปใช้

Safranin Solution

Safranin	2.5	กรัม
95 % ethanol	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย safranin ในเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร

วิธีย้อมเอนโดสปอร์

Smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 4-5 วัน ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง ฟิกซ์ smear โดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง ย้อม smear ด้วย malachite green โดยหยดสีให้ท่วม นำสไลด์ไปอังบนไอน้ำเดือด หรืออังบนเปลวไฟ คอยเติมสี malachite green อย่าให้สีแห้ง เป็นเวลานาน 5 นาที ทิ้งสไลด์ให้เย็น จากนั้นนำไปล้างน้ำ แล้วย้อมด้วยสี safranin-0 1 นาที เทสีทิ้งล้าง

ด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์จะติดสีแดงของ safranin-0 ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

ตารางผนวกที่ 1 อุณหภูมิ ความชื้น ระหว่างการทดลองในสภาพโรงเรือน

วัน/เดือน/ปี	อุณหภูมิ		เฉลี่ย	ความชื้น		เฉลี่ย
	สูง	ต่ำ		สูง	ต่ำ	
5/1/51	30.0	16.9	23.45	98	44	71
6/1/51	29.8	18.1	23.95	97	48	72.5
7/1/51	30.9	17.2	24.05	97	40	68.5
8/1/51	32.3	17.7	25	96	39	67.5
9/1/51	32.9	17.0	24.95	95	39	67
10/1/51	34.2	18.2	26.2	96	35	65.5
11/1/51	34.0	20.6	27	95	44	69.5
12/1/51	33.5	20.5	27	94	38	66
13/1/51	33.8	18.5	26.15	96	27	61.5
14/1/51	31.8	18.1	24.95	96	45	70.5
15/1/51	31.5	21.9	26.7	95	49	72
16/1/51	30.5	18.5	24.5	96	41	68.5
17/1/51	29.0	20.7	24.85	97	47	72
18/1/51	30.2	18.7	24.2	95	46	70.5
19/1/51	33.3	19.1	26.2	97	36	66.5
20/1/51	34.1	19.4	26.75	96	28	62
21/1/51	34.0	19.0	26.5	97	29	63
22/1/51	32.2	19.1	25.65	96	48	72
23/1/51	30.9	20.0	25.45	96	44	70
24/1/51	30.3	19.2	24.75	96	48	72
25/1/51	34.0	16.9	25.45	98	44	71
26/1/51	28.4	23.4	25.9	89	62	75.5
27/1/51	29.9	19.5	24.7	96	52	74
28/1/51	33.2	23.4	28.3	94	48	71
29/1/51	34.1	22.9	28.5	97	46	71.5
30/1/51	34.0	24.5	29.25	96	48	72
31/1/51	34.1	24.7	29.4	95	48	71.5

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี	อุณหภูมิ		เฉลี่ย	ความชื้น		เฉลี่ย
	สูง	ต่ำ		สูง	ต่ำ	
1/2/51	33.6	23.1	28.35	95	50	72.5
2/2/51	33.7	24.7	29.2	93	49	71
3/2/51	34.1	22.9	28.5	96	45	70.5
4/2/51	30.7	25.0	27.85	95	66	80.5
5/2/51	25.1	23.2	24.15	95	87	91
6/2/51	29.4	23.0	26.2	94	62	78
7/2/51	32.7	21.8	27.25	94	50	72
8/2/51	33.8	23.4	28.6	94	48	71
9/2/51	34.3	23.5	28.9	96	45	70.5
10/2/51	33.5	23.5	28.5	94	45	69.5
11/2/51	32.9	23.0	27.95	95	48	71.5
12/2/51	33.9	23.6	28.75	94	45	69.5
13/2/51	33.7	22.8	28.25	94	50	72
14/2/51	31.6	24.2	27.9	94	50	72
15/2/51	31.4	24.1	27.75	94	47	70.5
16/2/51	28.8	23.2	26	93	52	72.5
17/2/51	30.8	21.7	26.25	96	50	73
18/2/51	33.6	22.7	28.15	94	43	68.5
19/2/51	31.4	23.0	27.2	94	51	72.5
19/2/51	30.3	22.5	26.4	94	45	69.5
20/2/51	28.7	21.1	24.9	96	45	70.5
21/2/51	29.3	18.9	24.1	96	40	68
22/2/51	31.5	16.4	23.95	96	34	65
23/2/51	32.5	17.9	25.2	93	33	63
24/2/51	33.9	18.5	26.2	95	32	63.5
25/2/51	34.9	23.1	29	94	44	69
26/2/51	34.2	25.4	29.8	93	48	70.5

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี	อุณหภูมิ		เฉลี่ย	ความชื้น		เฉลี่ย
	สูง	ต่ำ		สูง	ต่ำ	
27/2/51	29.6	23.1	26.35	95	62	78.5
28/2/51	29.3	22.8	26.05	93	48	70.5
29/2/51	35.0	20.9	27.95	96	39	67.5

หมายเหตุ อุณหภูมิหน่วย องศาเซลเซียส

ความชื้นหน่วย เปอร์เซ็นต์

ที่มา: สถานีตรวจอากาศกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จ. นครปฐม

ประวัติการศึกษา

ชื่อ –นามสกุล	นายณพพล สัตยาสัย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 สิงหาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี
ประวัติการศึกษา	- จบการศึกษามัธยมศึกษาจากโรงเรียนเขาสมิงวิทยาคมฯ ปี พ.ศ. 2545 - จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร กำแพงแสน ภาควิชาโรคพืช ปี พ.ศ. 2548
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการจัดการโรคพืช เพื่อผลผลิตการเกษตรที่ปลอดภัยประจำปี 2550 - สนับสนุนผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ปี 2550